

ISSN 2953-3740

VOL. 1 NÚM. 1 enero-junio 2022



REVISTA CIENTÍFICA DE ABEJAS Y APICULTORES



Centro de
**MICROBIOLOGÍA BÁSICA
Y APLICADA**
(CEMIBA)



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA





EQUIPO EDITORIAL

DIRECTOR

Sergio Ruffinengo

EDITORA GENERAL

Leticia Fernández

EDITORES DE SECCIÓN

Economía, Política y Cultura

María Emilia Estrada

Biología de las Abejas

Francisco Reynaldi

Nutrición y Sanidad de las Abejas

Natalia Damiani

Producción y Calidad de los Productos de las Abejas

Liliana M. Gallez

Polinización y Flora Apícola

Cristina R. Salgado

Abejas y Medioambiente

Sandra K. Medici

SECRETARIOS EDITORES

Danilo Rübenacker

EDITORIAL

En un mundo donde el incremento en la producción de alimentos se hace cada vez más determinante, el rol de los insectos polinizadores adquiere relevancia debido a su relación con la mejora en los rendimientos de una gran cantidad de cultivos utilizados por el ser humano. *Apis mellifera*, ocupa en la actualidad un lugar importante en la polinización de cultivos y, como productora de miel, motoriza a todo un sector productivo que ha colocado a la República Argentina entre los países exportadores y productores más importantes del mundo. La Apicultura es una actividad de gran impacto social, ambiental y económico. De allí que la articulación entre los sectores científico y productivo sea tan relevante a la hora de lograr una producción sostenible. En la sinergia que inevitablemente se genera con esa interacción, emergen muy buenas ideas y una de ellas es EUNK.

La Revista EUNK nace con el compromiso de transformarse en un espacio de referencia para la difusión científica, el desarrollo innovativo y la extensión a niveles nacional e internacional, y como fruto de un enorme esfuerzo en conjunto de productores y técnicos que conforman la Cámara de Apicultores Pampero y Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero Limitada con la cooperación de importantes Grupos de Investigación de diferentes universidades nacionales: Universidad Nacional del Sur, Universidad Nacional del Nordeste, Universidad Nacional de La Plata y Universidad Nacional de Mar del Plata. EUNK es una palabra que proviene de la lengua tehuelche, que significa “mirar lejos” y que resume nuestras expectativas en cuanto a la proyección estratégica y superadora que se busca promover. Es la primera revista digital y de libre acceso de la Argentina, que persigue como objetivo principal la publicación de estudios científicos originales acerca de las abejas, la apicultura y los/as apicultores/as, abarcando la complejidad del sector en su totalidad.

En este primer número se presentan tres trabajos bien diferenciados en cuanto al tópico que abordan. Uno de ellos, es un estudio realizado por N. Zsawarski y

colegas, sobre el efecto del ácido abscísico en abejas durante el invierno, teniendo en cuenta posibles variaciones en el desarrollo de la población, en la dinámica de la nosemosis y en la expresión génica vinculada a la nutrición y la inmunidad. En otros dos, S. Villamil, L. Marinozzi y F. Ess evaluaron el impacto de la polinización entomófila en la producción de semilla de trébol rojo y E. Caliguli y colegas analizaron distintos parámetros fisicoquímicos de mieles provenientes de la

Provincia de Mendoza.

Aprovecho este espacio para agradecer a todos/as y cada uno/a de los/as que hicieron que este proyecto empiece a rodar y a recorrer los distintos caminos que la apicultura nos impone.

Sergio Ruffinengo
Director

Derechos de Autor (c) 2022 Sergio Ruffinengo



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) [Texto completo de la licencia](#)



ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación fisicoquímica de mieles comercializadas en la provincia de Mendoza (Argentina)

Elena E. Caliguli¹, Laura V. Arévalo¹, Liliana E. Tonini¹, Alejandra Grosso¹ y Damián G. Sanchez Mantica¹

¹ Centro de Investigación, Desarrollo, Extensión y Servicios "Padre Francisco Oreglia", Facultad Don Bosco de Enología y Ciencias de la Alimentación, Universidad Católica de Cuyo. Mendoza, Argentina.

E-mail de contacto: investigacionesrodeo@donbosco.org.ar

Recibido: 3 noviembre 2021; aceptado: 2 junio 2022; publicado: 30 junio 2022

Resumen

Las mieles oriundas de una región poseen características únicas que las diferencian de otras, debido a su origen botánico normalmente. Estudiar los parámetros que permiten conocer las características intrínsecas del alimento, resulta de gran interés en la actualidad. Los objetivos del trabajo fueron evaluar muestras de miel comercializadas en la provincia de Mendoza con el fin de conocer sus características fisicoquímicas, su relación con los parámetros legislados y comparar dichas variables en las mieles provenientes de diferentes zonas de la provincia de Mendoza. Se trabajó sobre sesenta muestras (n=60) obtenidas de cinco zonas productivas correspondientes a la cosecha 2020/21 y se implementaron metodologías de análisis y trabajo estandarizadas. Las variables fisicoquímicas analizadas permitieron identificar diferencias significativas entre zonas y proponer estudios posteriores específicos sobre ciertas variables para determinar la influencia del entorno geográfico y el origen botánico.

Palabras clave: Mendoza, miel, parámetros fisicoquímicos.

Physicochemical evaluation of honeys commercialized in the province of Mendoza (Argentina)

Abstract

The honeys originating from a region have unique characteristics that differentiate them from others, due to their botanical origin, normally. Studying the parameters that allow knowing the intrinsic characteristics of the food is of great interest today. The objectives of the work were to evaluate samples of honey marketed in the province of Mendoza in order to know their physicochemical characteristics, their relationship with the legislated parameters and compare these variables in honey from different areas of the province of Mendoza. Work was carried out on sixty samples (n=60) obtained from five productive zones corresponding to the 2020/21 harvest and standardized analysis and work methodologies were implemented. The physicochemical variables analyzed made it possible to identify significant differences among zones and to propose specific subsequent studies on certain physicochemical variables in order to determine the influence of the geographical environment and the botanical origin.

Keywords: Mendoza, honey, physicochemical parameters.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción apícola representa un sector socio económico productivo de gran importancia. Argentina se ha enmarcado internacionalmente como uno de los mayores productores de miel, destacándose por su calidad y cumplimiento de los estándares establecidos por los mercados consumidores. La provincia de Mendoza está situada entre los 32° y 37°

35' de latitud sur y los 66° 30' y 70° 35' de longitud oeste en la región centro oeste de Argentina. Su clima desértico y semi árido influye directamente sobre el tipo de vegetación y la disponibilidad de alimento para las abejas, principalmente *Apis mellifera*.

Argentina históricamente se ha posicionado como exportador de miel a granel debido a varios factores, entre estos, la demanda de mercados consumidores, calidad y tipo de mieles obtenidas de alto interés en la

industria internacional, alrededor de un 95 % de la producción nacional se exporta y lo restante se destina al mercado interno (Ministerio de Hacienda de la República Argentina, 2018).

Los rendimientos de miel por colmena varían dependiendo las zonas y las condiciones ambientales. Zonas de regadío, frutales o cultivos florales inciden beneficiosamente a la producción. En regiones como la de Cuyo, los rindes en miel son menores y por lo tanto la prevalencia de la actividad es dificultosa (Sanchez Mantica, 2022).

La mayoría de los emprendimientos apícolas en la región son de pequeña y mediana escala, entre 50 hasta 500 colmenas respectivamente. Normalmente dichas explotaciones son del tipo familiar y utilizan tecnologías tradicionales. Los rindes en la provincia de Mendoza promedian los 25 kg de miel por colmena (Ministerio de Economía de la Provincia de Mendoza, 2022). Para el año 2020 se registraron más de 100000 colmenas y 500 apicultores (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina, 2020).

Múltiples proyectos buscan lograr una tipificación o caracterización de mieles según su origen tanto botánico como geográfico, con el fin de obtener un valor agregado diferencial y/o posicionarlas como producto regional. Un estudio llevado a cabo en el departamento de Malargüe al sur provincial abarca estos aspectos desde la óptica de los análisis fisicoquímicos, sensoriales y polínicos; aportando al conocimiento y descripción de las mieles obtenidas en dicho departamento (Jiménez & Greco, 2017).

La apicultura en la provincia es parte de la economía regional y es llevada a cabo fundamentalmente dentro de los oasis productivos Norte, Sur, Este, Valle de Uco y Gran Mendoza (Ministerio de Economía de la Provincia de Mendoza, 2022).

Los procesos productivos llevados por el hombre sobre la miel varían dependiendo la idiosincrasia de los mismos, zonas geográficas, niveles productivos, tecnologías existentes y poder adquisitivo de los emprendimientos.

Se puede identificar un proceso propio llevado por las abejas en la obtención de la miel como tal y en segundo lugar el trabajo del apicultor con las abejas mismas. Esto se puede traducir en un proceso primario o agrícola y posteriormente procesos como extracción y adecuación de la miel que implican una manufactura serían procesos secundarios o industriales.

En cuanto a las distintas etapas dentro de la cadena de valor de la miel, es muy importante implementar en la producción primaria, buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas apícolas con el fin de resguardar la vida y potencialidad de los apiarios y sus entornos. Las buenas prácticas de manufactura permitirán desarrollar todas aquellas etapas de procesamiento que serán esenciales para asegurar la calidad del alimento. Asentar un sistema de trazabilidad que permita conocer todo el camino que ha recorrido el alimento a lo largo del ciclo productivo hasta llegar al consumidor final, sumando a las cadenas de suministros y todas aquellas actividades relacionadas a la cadena productiva. Estas herramientas permitirán poder llevar adelante un seguimiento continuo de las producciones, prevenir posibles amenazas y tomar medidas correctivas ante desvíos (Sanchez Mantica, 2022).

El Código Alimentario Argentino (CAA) en su artículo 782 (Res. 2256, 16/12/1985) denomina a la Miel o Miel de abejas como el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas

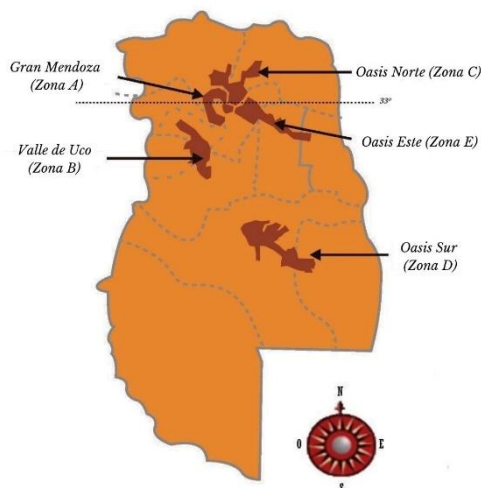


Fig 1. Zonas de la provincia de Mendoza

propias, almacenándolo en panales, donde madura hasta completar su formación (Código Alimentario Argentino, 1985).

La composición global de una miel depende del origen botánico, las características del clima, la raza de abejas, entre otros factores. Se han identificado más de 180 sustancias diferentes en la miel, algunas de las cuales en exclusividad (Crane, 1985).

El principal ácido presente en las mieles es el glucónico y otros en cantidades menores como el fórmico, acético, cítrico, láctico, maleico, málico, oxálico, piroglutámico y succínico. El pH de las mieles de flores varía entre 3,3 a 4,6. Las mieles provenientes de mielada debido a su mayor contenido de minerales, tienen un valor de pH más alto, que varía entre 4,5 y 6,5 (Bogdanov, 2011). Mieles analizadas en la provincia de Formosa (Argentina) presentaron valores de pH comprendidos desde 3,3 hasta 5,3 y de acidez libre entre 9,75 y 59,25 meq/kg (Cabrera & Santander, 2022).

En mieles argentinas provenientes de la provincia de Mendoza fueron reportados valores comprendidos entre 0,37 y 0,62 g% de contenido proteico (Fattori, 2004). Muestras analizadas por metodologías de alta resolución mostraron que los aminoácidos predominantes son la prolina seguido de la fenilalanina, advirtiendo la influencia de las reacciones de Maillard en dichas concentraciones (Quintas *et al*, 2021).

Respecto a cenizas de la miel se han observado compuestos tales como K_2O , Na_2O , CaO , MgO y P_2O_5 ; Cl, S, B, Si y Al; metales pesados tales como Cd, Pb y Zn en mayor proporción en las mieles de mielada y compuestos de P entre los cuales predominan los fosfatos alcalinos. En mieles argentinas se han reportado en cuanto minerales valores de hasta 5 mg% de Na, 26 mg% de K, 5 mg% de Ca, 2 mg% de Mg, 300 µg% de Fe, 80 µg% de Mn y 132 µg% de Cu (Fattori, 2004).

Recientemente un estudio evaluó la calidad de las mieles comercializadas en la provincia de Mendoza, focalizándose desde la óptica de la legislación vigente y los parámetros de calidad aplicables en miel (Sanchez Mantica, 2022). En él se destaca que los valores analíticos promedio obtenidos se encontraron dentro de los parámetros legislados, aunque, variables como hidroximetilfurfural, acidez libre, cenizas y color presentaron valores por encima de las tolerancias y valores por debajo de los especificados en las normas en cuanto al índice de diastasas.

Los objetivos del trabajo fueron evaluar muestras de miel comercializadas en la provincia de Mendoza con el fin de conocer sus características fisicoquímicas, su relación con los parámetros legislados y comparar dichas variables en las mieles provenientes de diferentes

zonas de dicha provincia.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología de la investigación para el desarrollo del trabajo fue del tipo mixta. El universo muestral estuvo constituido por 60 muestras en total ($n=60$), siendo recolectadas 12 muestras por cada zona de la provincia de Mendoza.

Las muestras de miel fueron proporcionadas en parte por productores mendocinos que realizan venta directa de miel y por otra parte adquiridas en centros de comercialización de la provincia de Mendoza; todas correspondientes a la cosecha 2020/21.

La metodología de muestreo que se realizó fue la detallada por AOAC Official Meth. 920.180. (1995). Las muestras fueron representativas del lote al que pertenecían y conformadas por 500 g de contenido neto cada una, en recipientes de vidrio con cierre hermético, mantenidas hasta su análisis al abrigo de la luz y de temperaturas ambientales extremas. Se codificó cada muestra en base a las zonas que se corresponden al origen geográfico de recolección de las muestras, según el siguiente detalle: Gran Mendoza (zona A), Valle de Uco (zona B), Oasis Norte (zona C), Oasis Sur (zona D), Oasis Este (zona E) (Fig. 1).

La metodología de preparación de muestras en laboratorio fue según la IRAM 15976: 2007.

Las determinaciones fisicoquímicas se realizaron por triplicado bajo los métodos oficiales de la AOAC (A.O.A.C, 1995), llevadas a cabo en un mismo espacio de tiempo y los resultados estadísticamente contemplados (Tabla 1).

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados estadísticamente. Para el análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos se utilizó el software InfoStat para Windows (versión 2016e) y XLSTAT para el estudio de la varianza ANOVA y test de Tukey (HSD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados fisicoquímicos

Se cuantificaron los siguientes parámetros: Azúcares Reductores, Sacarosa Aparente, Humedad, Cenizas, Sólidos Insolubles en Agua, Acidez libre, Acidez láctónica, Acidez total, pH, índice de Diastasas (ID), Hidroximetilfurfural (HMF) y Color (Tabla 2).

Las muestras de mieles evaluadas de la provincia de Mendoza, presentan un valor promedio de Azúcares Reductores (71,533 %) por encima del mínimo establecido (miel de flores 65 %, miel de mielada y sus mezclas 60 %) por el CAA; de Sacarosa Aparente (1,312

Tabla 1. Metodología analítica oficial utilizada para los análisis de las variables fisicoquímicas de las muestras de miel.

Determinación	Método
pH	IRAM 15938: 2007
Acidez total: libre y láctónica	AOAC 962.19. (1995). Acidez en miel (Acidez total: libre y láctónica).
Humedad	AOAC Official Meth. 969.38B (1995).
Índice de diastasas	AOAC Official Meth. 958.09. (1995).
Cenizas	AOAC 920.181. 8. (1995).
Sólidos insolubles	Codex Alimentarius CAC/VOL.II - 1ª ed. Suplemento II.
Azúcares reductores	Codex Alimentarius CAC/VOL III, supl. 2 sección 7.1, 1º Ed.
Sacarosa aparente	Codex Alimentarius CAC/VOL III, supl. 2 sección 7.1, 1º Ed.
HMF Cuantitativo	AOAC Official Meth. 980.23 (1995)
Color	IRAM 15941 – 2: 2007: determinación del color Pfund.

%) muy por debajo del máximo establecido (Miel de flores 8 %, miel de mielada y sus mezclas 10 %); de Humedad (16,2 %) por debajo del máximo establecido (18 %), por otro lado, se obtuvo un valor máximo de 19,5%, superando el límite establecido. Las razones por la que se presentó dicha humedad podrían ser múltiples, a modo general se puede atribuir a una inmadurez de dichas mieles al momento de la cosecha. El 5 % de las muestras en estudio presentaron un contenido superior al 18 %, máximo establecido por CAA.

En cuanto a sacarosa aparente se mantiene una misma tendencia en cuanto a su concentración entre la mayoría de las muestras, siendo valores por debajo de los máximos estipulados por la normativa. En cuanto a cenizas (0,360 %) se encontró por debajo del máximo establecido (Miel de flores 0,6 %, miel de mielada 1 %), el contenido de cenizas es relativamente moderado,

presentando un 20 % de las muestras en estudio que corresponderían a mieles de mielada en base a los límites establecidos por CAA, aunque es necesario aclarar que ciertas especies nectaríferas propician naturalmente mieles con mayores contenidos de cenizas y conductividad eléctrica. Será propicio continuar con estudios posteriores y específicos para determinar la posible presencia de mielatos.

Respecto a sólidos insolubles en agua (0,112 %) en algunos casos superan el máximo establecido (miel no prensada 0,1 %, miel prensada 0,5 %). El 25 % de las muestras en estudio presentaron un contenido mayor a 0,1 % e inferior a 0,5 %, se puede asociar a los procesos de manipulación durante el ciclo productivo del alimento.

La acidez libre (36,205 meq/kg) en promedio se encontró por debajo del máximo establecido (40

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de las variables fisicoquímicas de las muestras de miel de la provincia de Mendoza.

Variable	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Azúcares reductores %	71,53	4,71	65,18	85,20
Sacarosa aparente %	1,31	0,71	0,51	3,05
Humedad %	16,21	1,06	13,10	19,50
Cenizas %	0,36	0,3	0,09	0,99
Sólidos insolubles en agua %	0,112	0,120	0,007	0,645
Acidez total meq/kg	46,50	19,84	19,94	100,38
Acidez libre meq/kg	36,21	19,78	10,97	94,20
Acidez láctónica meq/kg	10,30	4,04	4,49	24,43
pH	3,83	0,33	3,11	5,07
ID °Gothe	31,97	21,82	4,27	67,87
HMF mg/Kg	16,56	19,21	0,00	95,62
Color (mm)	72,9	31,3	12,0	121,0

meq/kg), aunque el 35 % de las muestras presentaron un contenido de acidez libre mayor que el establecido por CAA.

Los valores promedios de acidez total y láctica son respectivamente 36,205 meq/kg y 10,295 meq/kg y respecto al pH se presentó un valor promedio de 3,83 con límites mínimos y máximos de 3,11 y 5,07 respectivamente, siendo rangos muy amplios.

En todo el rango trabajado no se visualizó ninguna efervescencia o proceso fermentativo que indicara una relación con los altos niveles de acidez, aunque objetivamente no se descarta la posibilidad.

Dada dicha acidez se estima que posiblemente esté relacionada con un alto contenido de ácidos presentes en los frutos de la *Vitis vinifera*, fundamentalmente por el ácido tartárico y otros ácidos presentes en menor proporción. Es común que las abejas acudan a los viñedos, por la gran oferta y presencia de dichos frutos en la provincia, en momentos donde el grano presenta una exposición al medio de sus jugos celulares debido, por ejemplo, a granizo. Ciertamente una fruta ofrece una gran cantidad de componentes útiles para la dieta de la abeja, como son los glúcidos y el aporte de agua (Shackleton et al, 2016). En regiones como podría ser la de Mendoza, en donde por ciertos periodos no abundan vegetaciones que aporten néctar, las abejas pecoreadoras podrían asistir a viñedos donde los frutos puedan aportarles su jugo celular.

No se han encontrado reportes de investigaciones respecto a esta posibilidad en la región, por lo que resulta necesario continuar con estudios que permitan postular con mayores certezas la influencia de este cultivo en las mieles provinciales.

En cuanto al contenido promedio de hidroximetilfurfural ($16,56 \pm 19,21$ mg/kg) se encuentra por debajo del máximo establecido (40 mg/kg). Particularmente se denotan valores superiores a los permitidos por la legislación actual en casos del contenido de HMF, indicador principal del envejecimiento y frescura del alimento. El 6,6 % de las muestras del rango en estudio presentaron un valor superior a 40 ppm de HMF, máximo establecido por CAA; siendo este un dato no menor ya que todo el rango de muestras comprendido en este estudio pertenece a mieles que se encontraban disponibles para consumo directo, es decir, mieles que estaban ya en la fase final de la cadena productiva.

Ciertamente a medida que pasa el tiempo y por más que las condiciones de almacenamiento sean las ideales, el contenido de HMF en las mieles aumentará progresivamente. Mieles que no hayan tenido una adecuada manipulación tecnológica durante su cadena

de valor y en aquellas etapas de riesgo proclives a la generación del compuesto aldehídico no fueran correctamente controladas, desembocará inevitablemente en la generación y aumento acelerado en su concentración de HMF.

Las temperaturas de almacenamiento entre 8 °C y 35 °C no afectan significativamente los parámetros como pH, acidez libre y nitrógeno total pero sí influyen sobre la producción de HMF y afectan el color, la actividad diastásica y el contenido de prolina de las mieles (Ordoñez de Yapur, 2004). Es necesario disminuir y controlar exhaustivamente toda aquella operación que involucre calentamiento directo o indirecto de la miel, con el fin de minimizar la formación de HMF (Jeuring & Koppers, 1980).

A través de diversos procesos defectuosamente ejecutados en cosecha y post cosecha, la miel puede sufrir un decremento en su calidad. Por esto mismo los estándares internacionales y en especial la legislación argentina, fija los criterios fisicoquímicos y organolépticos pertinentes para garantizar al consumidor un alimento de óptima calidad.

La actividad de las diastasas se encuentra dentro de los parámetros legislados en promedio ($31,97 \pm 21,81$ °Gothe). El 15 % de las muestras en estudio presentaron una actividad inferior a 8 °Gothe, mínimo establecido por CAA; dato no menor ya que dichas mieles se corresponden para venta directa.

Un estudio sobre el comportamiento de la miel en panal adecuada tecnológicamente en recinto calefaccionado para facilitar procesos de extracción a temperaturas cercanas a los 40 °C durante distintos periodos de tiempo demostró que las temperaturas implementadas en tales procesos influyen en un incremento del contenido de HMF y una disminución del contenido diastásico, presentando una correlación entre ambos parámetros de $R^2 = 0,9167$. Esto demuestra la importancia del control de tales variables cuando la

miel se somete a temperaturas mayores a las ambientales con un fin tecnológico, aplicable a procesos como la pasteurización (Sanchez Mantica et al., 2021).

Respecto al color, las muestras de miel presentaron una coloración promedio dentro del rango Ámbar claro (50,0 a 84,9 mm) según la escala internacional Pfund. Es destacable que, aunque el promedio se corresponde a dicha categoría, el abanico de colores presentado por las muestras es amplio y está relacionado a su origen geográfico (Tabla 3).

En la comparación de medias entre zonas, se observa que hay diferencias significativas en los parámetros de humedad, sólidos insolubles, acidez láctica, actividad diastásica, hidroximetilfurfural y color (Tabla 3). La

Tabla 3. Contraste de medias de variables fisicoquímicas de muestras de miel de Mendoza (Argentina).

Zona	Azúcares reductores %	Sacarosa aparente %	Humedad %	Cenizas %	Sólidos insolubles en agua %	Acidez libre meq/kg	Acidez láctónica meq/kg	Acidez total meq/kg	pH	ID °Gothé	HMF mg/Kg	Color (mm)
Gran Mendoza	72,128 a	1,271 a	17,150 a	0,441 a	0,089 b	43,389 a	8,258 b	51,647 a	3,813 a	18,028 b	28,494 a	91,500 a
Oasis Sur	71,010 a	1,034 a	16,308 ab	0,507 a	0,227 a	46,602 a	7,919 b	54,520 a	3,839 a	22,873 b	21,876 ab	76,875 ab
Oasis Norte	72,354 a	1,441 a	15,617 b	0,303 a	0,047 b	35,031 a	10,725 ab	45,755 a	3,995 a	30,628 ab	14,999 ab	73,875 ab
Oasis Este	73,003 a	1,708 a	16,075 ab	0,183 a	0,056 b	27,463 a	13,039 a	40,503 a	3,695 a	49,230 a	7,198 b	50,083 b
Valle de Uco	69,168 a	1,107 a	15,917 b	0,367 a	0,142 ab	28,542 a	11,533 ab	40,068 a	3,805 a	39,104 ab	10,247 ab	72,167 ab
Pr > F(Modelo)	0,303	0,139	0,004	0,089	0,000	0,053	0,004	0,277	0,266	0,002	0,038	0,023
Significativo	No	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí

influencia de la flora apícola, el medio ambiente, las prácticas habituales del apicultor (especialmente respecto a sólidos insolubles) y la situación geográfica, en las características intrínsecas de la miel, pueden ser motivo de las diferencias encontradas entre las zonas de la provincia. Respecto a los datos obtenidos de acidez láctónica, éstos pueden estar influenciados por muestras que presentaron valores elevados de acidez libre, alejándose de los valores promedio.

CONCLUSIONES

En cuanto a las variables fisicoquímicas, se presentaron diferencias significativas entre zonas productoras de la provincia de Mendoza para los parámetros humedad, sólidos insolubles, acidez láctónica, actividad diastásica, hidroximetilfurfural y color.

Se observaron valores elevados en el rango de muestras, superiores a lo estipulado en la normativa nacional vigente, para los parámetros HMF y acidez libre e inferiores para ID.

El contenido elevado de acidez libre encontrado en un 35 % de las muestras analizadas destaca la necesidad de realizar estudios analíticos específicos, y a su vez determinar si existe influencia del medio respecto a tal variable.

Se detectaron valores altos respecto a cenizas y color en las muestras estudiadas, razón por la cual será relevante continuar con estudios específicos para identificar y caracterizar mielatos en las mieles provinciales y determinar su posible relación con dichas

variables.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Obra de Don Bosco sede Rodeo del Medio, Mendoza Argentina; en el marco del Proyecto de Investigación en Miel desarrollado en el Centro de Investigación, Desarrollo, Extensión y Servicios "Padre Francisco Oreglia" (perteneciente a dicha institución).

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Debemos expresar un especial agradecimiento a todos los colaboradores, especialistas consultados, agentes de organismos e instituciones de ciencia y tecnología y productores apícolas por sus aportes invaluable para el desarrollo del proyecto.

Nuestra gratitud al Centro de Investigación Desarrollo, Extensión y Servicios "Padre Francisco Oreglia" de la Facultad Don Bosco de Enología y Ciencias de la Alimentación, Universidad Católica de Cuyo y a la Obra Don Bosco de Rodeo del Medio, Mendoza, Argentina, por constituir los canales institucionales que facilitaron los medios y los recursos, para llevar a cabo el trabajo de investigación propuesto.

REFERENCIAS

- A.O.A.C. (1995). *Official Methods of Analysis* (16 ed.). Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Bogdanov, S. (2011). Chapter 5: Honey Composition. En *Book The Honey Book*. Recuperado el 29 de 12 de 2017, de <https://www.bee-hexagon.net/>
- Cabrera, M., & Santander, E. (2022). Physicochemical and sensory analysis of honeys from eastern Formosa province (Argentina) and its relationship with their botanical origin. *Food Chemistry Advances*, 1(100026). doi: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100026>
- Código Alimentario Argentino. (1985). Capítulo X Alimentos azucarados. Art 782. Recuperado el 18 de 5 de 2022, de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/caa_capitulo_x_azucarados_actualiz_2020-09.pdf
- Crane, E. (1985). *El libro de la miel*. (M. Caso, Trad.) Breviarios, México: FCE: Fondo de cultura económica.
- Fattori, S. B. (2004). "LA MIEL" Propiedades, Composición y Análisis Físico- Químico. *Beekeeping Technology and Bee Products Commission*. Argentina: Apimondia. Recuperado el 05 de 01 de 2021, de <http://www.apimondia.org/>
- Jeuring, H. J., & Kupperts, F. J. (1980). High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *Journal of Official Association Agricultural Chemists*, 63(6), 1215-1218.
- Jiménez, R. S., & Greco, M. F. (2017). Caracterización polínica, fisicoquímica y sensorial de la miel de abeja (*Apis mellifera* L.) del departamento de Malargüe, provincia de Mendoza. *RIA*, 43(3), 211.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina. (2020). *Síntesis Apícola Julio 2020*. Argentina. Recuperado el 9 de 2 de 2022, de <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Api cultura/documentos/Sintesis-Apicola-Julio2020.pdf>.
- Ministerio de Economía de la Provincia de Mendoza. (27 de 01 de 2022). *Prensa Gobierno de Mendoza*. Recuperado el 9 de 2 de 2022, de <https://www.mendoza.gov.ar/prensa/el-mapa-apicola-de-mendoza-ya-cuenta-con-mas-de-500-productores-georeferenciados/>
- Ministerio de Hacienda de la República Argentina. (2018). *Cadenas de valor apícola*. Productivo, Secretaría de Política Económica, Subsecretaría de Programación Microeconómica, Buenos Aires. Consultado el 02 de 01 de 2021, de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_apicola_0.pdf.
- Ordoñez de Yapur, A. L. (2004). *Modelos predictivos en mieles en función del daño térmico sufrido*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Quintas, P. Y., Keunchkarian, S., Romero, L., Canizo, B. V., Wuilloud, R. G., & Castells, C. B. (2021). Determination of amino acid content and its enantiomeric composition in honey samples from Mendoza, Argentina. *Journal of Food Processing and Preservation*. doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15966>
- Sanchez Mantica, D. G. (2022). Evaluación de la Calidad en Mieles Comerciales de la Provincia de Mendoza. *Actas del VI Congreso Investigación, Desarrollo e Innovación*, 1066-1077. Panamá: Universidad Internacional de Ciencia y Tecnología. doi: <https://doi.org/10.47300/978-9962-738-04-6>
- Sanchez Mantica, D. G., Lema Sarmento, D. A., & Arévalo, L. V. (2021). Estudio del aumento del contenido de HMF en panales de miel atemperados en recinto calefaccionado para optimización de procesos de extracción. Poster presentado en el Primer Simposio de Nuevas Tecnologías y Herramientas para el Aseguramiento de la Inocuidad y Seguridad Alimentaria. Buenos Aires: Red de Inocuidad y Seguridad Alimentaria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <https://primersimposiorisa.wixsite.com/inicio>.
- Shackleton, K., Balfour, N. J., Al Toufailia, H., Gaioski Jr, R., de Matos Barbosa, M., Silva, C. A. D. S., Bento, J. M. S., Alves, D. A., & Ratnieks, F. L. (2016). Quality versus quantity: Foraging decisions in the honeybee (*Apis mellifera scutellata*) feeding on wildflower nectar and fruit juice. *Ecology and Evolution*, 6, 7156–7165. doi:10.1002/ece3.2478
- White, J. W. (1980). *Honey Composition and Properties*. *Beekeeping in the United States Agriculture Handbook* (335), 82-91.

Derechos de Autor (c) 2022 Elena E. Caliguli, Laura V. Arévalo, Liliana E. Tonini, Alejandra Grosso,
Damián G. Sanchez Mantica



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:
Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.
[Resumen de licencia](#) [Texto completo de la licencia](#)



ARTÍCULO ORIGINAL

Impacto de la polinización entomófila en la producción de semilla de trébol rojo, *Trifolium pratense* L. (Fabaceae) en Bahía Blanca, Argentina

Soledad C. Villamil¹, Luciano A. Marinozzi^{1,2}, Facundo Ess³

¹ Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA), Departamento de Agronomía Universidad Nacional del Sur – CIC.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

³ Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur.

E-mail de contacto: S. Villamil, soledad.villamil@uns.edu.ar

Recibido: 22 febrero 2022; aceptado: 1 junio 2022; publicado: 30 junio 2022

Resumen

En 2017, se dividieron plantas de trébol rojo (genotipo TRG), *Trifolium pratense* L. (Fabaceae), en tres tratamientos de polinización entomófila (*Bombus pauloensis*, *Apis mellifera*, polinización libre) y un testigo sin polinización entomófila. Se utilizaron 16 parcelas y jaulas que contenían 40 individuos de *B. pauloensis* o núcleos de cuatro cuadros de *A. mellifera*; la jaula de exclusión no tenía insectos. Se colocaron trampas de agua en las parcelas de polinización libre. Una vez cosechado, se determinó número y peso de semillas por planta. La longitud de proboscis medida para *Apis* (5,02 mm) fue menor ($p < 0,0001$) que la de *Bombus* (7,60 mm) que, además, supera la corola del trébol rojo (7,00 mm). Las trampas mostraron la casi ausencia de polinizadores naturales en el ambiente. *Bombus pauloensis* logró alto rendimiento de trébol rojo (113 mg semilla/planta); pero, el logrado con *Apis* (57 mg semilla/planta) no es despreciable.

Palabras clave: *Apis mellifera*, *Bombus pauloensis*, polinización de cultivos, trébol rojo, *Trifolium pratense*.

Impact of insect pollination on seed production of red clover, *Trifolium pratense* L.

Abstract

In 2017, red clover, *Trifolium pratense* L., plants (genotipo TRG) were divided into three insect pollination treatments (*Bombus pauloensis*, *Apis mellifera*, open pollination) and a control without insect pollination. Sixteen plots were used and cages with 40 *B. pauloensis* individuals or 4-frame *A. mellifera* nucs; the exclusion cage contained no insects. Water traps were deployed in open pollination plots. Once harvested, number and weight of seeds per plant were determined. Probosces measured for *Apis* (5,02 mm) was shorter ($p < 0,0001$) than *Bombus* (7,60 mm) which also surpassed red clover corolla length (7,00 mm). Traps showed the almost complete absence of pollinators in the environment. *Bombus pauloensis* achieved high yields of red clover (113 mg seeds/plant); but yields achieved by *Apis* (57 mg seeds/plant) should not be disregarded.

Key words: *Apis mellifera*, *Bombus pauloensis*, crop pollination, red clover, *Trifolium pratense*.

INTRODUCCIÓN

El trébol rojo, *Trifolium pratense* L. (Fabales: Fabaceae), es una planta perenne nativa de Eurasia y África que posee, como muchas otras especies de la misma familia, buena calidad de forraje por su elevado

contenido de proteínas y digestibilidad, además de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. En la región pampeana, en general su producción disminuye mucho luego del segundo año, lo que lo hace apto para rotaciones cortas. En siembras consociadas con gramíneas u otras fabáceas, también produce altos

volúmenes de forraje en el primer ciclo de crecimiento, característica que justifica su inclusión en mezclas forrajeras de rotación corta. Varios factores pueden afectar la persistencia potencial de la especie, como enfermedades, desórdenes fisiológicos, plagas, manejo de la defoliación y ciclo de la planta (Barletta *et al.*, 2013; INIA, 2017).

La presencia de insectos polinizadores resulta indispensable para la producción de semilla de trébol rojo debido a la autoesterilidad de este cultivo (Darwin, 1871). Los principales órdenes de insectos polinizadores son Diptera, Coleoptera, Hymenoptera y Lepidoptera (Kevan, 2008). Según Carámbula (1981), la búsqueda de polinizadores eficientes para el trébol rojo ha dado lugar a numerosos trabajos donde se destaca la importancia relativa de cada uno. Sin embargo, además de *Apis mellifera* y de los abejorros del género *Bombus*, son pocos los insectos capaces de polinizar este cultivo (Arretz & Macfarlane, 1986; Free, 1993; Nates-Parra, 2005; Rao & Stephen, 2009; Salvarrey *et al.*, 2017), ya que muchos no tienen la proboscis lo suficientemente larga como para acceder a los nectarios ubicados en el fondo del tubo floral. Si bien se discute la habilidad de la abeja melífera (*A. mellifera*) para polinizar el trébol rojo, se han demostrado incrementos en el rendimiento de semillas cuando se colocan colmenas de éstas en el cultivo (Forster & Hadfield, 1958; Palmer-Jones *et al.*, 1966; Free, 1993). Para la producción de semillas en un forraje, se busca lograr una polinización rápida que evite que la floración se extienda en el tiempo y así promover mayor uniformidad al momento de la cosecha. Además, se disminuye el riesgo de exposición de la semilla a plagas, enfermedades, condiciones climáticas desfavorables, productos agroquímicos y se ahorra en agua (Kluser *et al.*, 2010).

Todavía no existe en la generalidad de los productores una conciencia sobre el riesgo que conlleva la merma y escasez de polinizadores, ni se cuenta con información científica regional sobre las poblaciones de especies silvestres (Kremen, 2005; Hederström *et al.*, 2021; Jing *et al.*, 2021a,b). Reclamar el reconocimiento de la apicultura como servicio de polinización y preservar a otros polinizadores requiere un soporte técnico que demuestre su importancia económico-productiva y ambiental, además de fundamentar técnicas de manejo y políticas públicas. Los objetivos del trabajo fueron determinar si existen diferencias entre la producción de semillas de *T. pratense* (genotipo TRG) utilizando cuatro diferentes escenarios de polinización e identificar en cuál de ellos se logra el mayor rendimiento de semilla. Los cuatro tratamientos fueron polinización con *Bombus pauloensis* (PB), polinización con *Apis*

mellifera (PA), polinización libre por polinizadores silvestres (PL) y polinización restringida sin insectos polinizadores (PR). Se esperaba que, al igual que muchos otros cultivares de trébol rojo, la producción de semilla por autofecundación de este genotipo fuera muy baja comparada con la obtenida por fecundación entomófila. También se esperaba que la producción de semillas lograda mediante polinización por *B. pauloensis* (= *B. atratus*; véase Moure & Melo, 2012), fuera la más alta. Además, se quería determinar si era posible que *Bombus bellicosus* Smith, la única especie silvestre de este género en la zona, utilizaría al trébol rojo como recurso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con *T. pratense*, genotipo TRG, de la empresa Gentos SA (Pergamino, Buenos Aires, Argentina). Se sembraron plantineras en invernáculo en dicha ciudad, el 7 de marzo de 2017, utilizando inóculo específico. El 20 de septiembre de 2017, se transportaron al predio del Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca. Seis días después, se trasplantaron individualmente a macetas de 5 litros y se continuó el desarrollo de las plantas a campo con riego manual. Se aplicó fertilizante granulado “Triple 15” (15% N; 15 % P₂O₅; 15% K₂O) los días 9 de noviembre de 2017 y 6 de diciembre de 2017. El 26 de diciembre, el material en flor se dispuso en parcelas de 19 plantas cada una. Aunque no se registró la flora circundante, se observaron ejemplares en flor de *Diplotaxis tenuifolia*, *Raphanus sativus*, *Scabiosa atropurpurea* como espontáneas y *Lavandula angustifolia*, *Solanum lycopersicon* y *Cucurbita máxima* variedad zapallito de una huerta aledaña.

En este experimento se aplicaron cuatro tratamientos de polinización con cuatro réplicas cada uno (= 16 parcelas), con distribución aleatoria en un área de 6 m x 12 m en dos hileras de ocho jaulas. Los tratamientos se llevaron a cabo en jaulas de exclusión de 2 m x 1 m x 1,5 m con estructura de polipropileno y malla antiáfido, excepto en el caso de Polinización Libre (sin jaula) ya que permite las visitas de todos los polinizadores presentes en el ambiente. Para el tratamiento con *A. mellifera*, se colocó dentro de la jaula la menor unidad funcional utilizable: un núcleo de abejas compuesto por un cuadro de cría operculada, dos cuadros de cría abierta y uno con reservas de miel y polen. Los cuadros de cría estaban cubiertos por abejas adultas, además de una reina en producción. En el caso de *B. pauloensis*, se utilizó una colonia comercial de Biobest S.A. (Burzaco,

Tabla 1. Medias del número y peso de semillas por planta de trébol rojo, *Trifolium pratense*, utilizando diferentes tratamientos de polinización.

Tratamiento de polinización	Número de semillas/planta	Peso de semillas/planta (mg)
Restringido	4.7 a	9.4 a
Libre	4.9 a	9.4 a
<i>Apis</i>	30.6 b	56.6 b
<i>Bombus</i>	63.8 c	113.3 c

*Medias de una misma columna con una misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) LSD Fisher.

Buenos Aires, Argentina) de unos 40 individuos por jaula. En el tratamiento testigo (Polinización Restringida) se aseguró la ausencia de polinización entomófila utilizando una jaula para la exclusión de todo tipo de polinizadores.

Los tratamientos de polinización se aplicaron desde la colocación de las jaulas el 28 de diciembre de 2017 hasta el retiro de los polinizadores comerciales utilizados el 23 de enero de 2018 (período que abarcó la floración del cultivo). A partir de esta última fecha hasta la cosecha, se continuó regando y desmalezando. En las parcelas de PA y PB, se abrieron las mallas antiáfidos cuando finalizó la floración. Las jaulas de PA y PB se retiraron el 1 de febrero de 2018, usándolas hasta esa fecha para mantener un sombreado similar a las parcelas de PR, las que conservaron las mallas antiáfidos cerradas hasta el momento de la cosecha.

Durante el período de ensayo, se colocaron trampas de agua en las cuatro parcelas de Polinización Libre, a fin de capturar los insectos visitantes. Estas trampas se colocaron en seis fechas: 11, 12, 14, 19, 20 y 21 de enero y consistieron en vasos de plástico blancos (Marinozzi *et al.*, 2018; Boyer *et al.*, 2020) de 180 ml con 100 ml de agua y unas gotas de detergente sin perfume para romper la tensión superficial y evitar que los insectos escapen. Los vasos se colocaron de a dos por parcela, a la altura de las flores. Las trampas se revisaron 24 h después de colocadas y los insectos atrapados fueron llevados al laboratorio y conservados en freezer hasta el momento de su identificación y recuento. Para los ejemplares dudosos o desconocidos se utilizaron claves entomológicas (Michener *et al.*, 1994; Michener, 2007; Roig-Juñent *et al.*, 2014), además de consultar con especialistas del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”.

Para determinar el largo de la proboscis, se midió el largo de varias de sus piezas como el prementón, los palpos labiales derecho e izquierdo y la glosa (Medler,

1962) de 16 ejemplares de *B. pauloensis* de los nidos comerciales y de 16 ejemplares de *A. mellifera*. No se midieron ejemplares silvestres de *B. pauloensis* porque no los hay en la zona donde se realizó el ensayo. La proboscis de cada individuo se estiró sobre papel y se midió con el calibre digital.

Se utilizó el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018) para realizar los análisis estadísticos realizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 19 plantas originales por parcela, se utilizaron 12 a fin de balancear los análisis estadísticos por pérdida de plantas. Los análisis de varianza realizados mostraron que el tratamiento con *B. pauloensis* mostró los mayores valores respecto al número y peso de semillas por planta, diferenciándose significativamente de los demás. El tratamiento con *A. mellifera* obtuvo menores valores de número y peso de semillas por planta que el tratamiento con *B. pauloensis* y se diferenció estadísticamente del mismo. Los tratamientos de Polinización Libre y Polinización Restringida no se diferenciaron estadísticamente entre sí (Tab. 1).

Dada la escasa cantidad de plantas que produjeron semillas, no se pudo realizar un análisis estadístico sobre el peso por semilla de los tratamientos de Polinización Libre y Restringida (Fig. 1). El peso por semilla de los tratamientos *B. pauloensis* y *A. mellifera* fue el mismo (1,8 mg); por lo tanto, el factor que marcó la diferencia de rendimiento fue el número de semillas obtenidas (Tab. 2).

Teniendo en cuenta varios de los componentes de rendimiento medidos (como peso y número de semilla) se puede inferir que el rendimiento de las parcelas polinizadas por *B. pauloensis* fue significativamente mejor ($p < 0,05$) que el de *A. mellifera*, lo que coincide con los resultados obtenidos previamente (Vanommeslaeghe *et al.*, 2018; Hederström *et al.*, 2021; Jing *et al.*, 2021a,b). Abejas solitarias, abejas melíferas

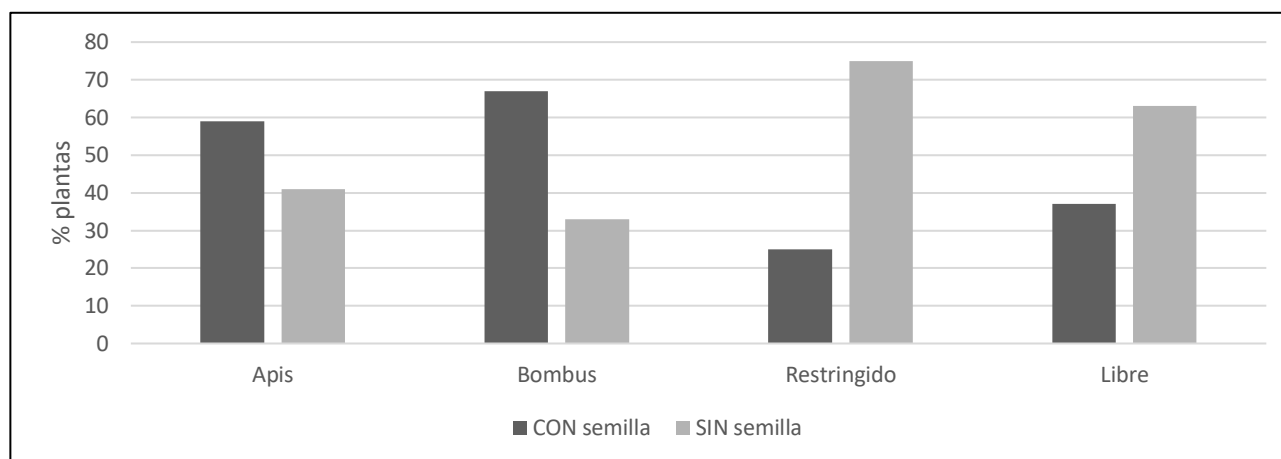


Figura 1. Porcentaje de plantas CON y SIN semilla por tratamiento de polinización en trébol rojo, *Trifolium pratense*.

y abejorros se reconocen como potenciales polinizadores del trébol rojo (Arretz & Macfarlane, 1986; Rao & Stephen, 2009; Salvarrey *et al.*, 2017), resultando las especies de abejorros del género *Bombus* las más importantes para esta función en la mayoría de los trabajos de investigación. Las parcelas de PL no resultaron en una buena producción de semilla, por lo que se desprende que Bahía Blanca no tuvo una fauna entomológica suficiente o adecuada para este propósito. Esto no es sorprendente ya que la única especie de *Bombus* presente en la zona es *B. bellicosus* (Abrahamovich *et al.*, 2007) y, en todo el ensayo, sólo se observó un ejemplar pecoreando el cultivo.

El abejorro utilizado en este ensayo, *B. pauloensis*, pertenece a una de las especies del género con proboscis mayor a 7 mm, longitud considerada suficiente para alcanzar el néctar de trébol rojo (Holm, 1966). En todos los casos, las piezas bucales medidas pertenecientes a *B. pauloensis* fueron más largas y se diferenciaron significativamente ($p < 0.0001$) de las de *A. mellifera* utilizando un análisis de varianza y comparación de medias por LSD Fisher. Específicamente, sumando los valores de prementón y glosa se obtuvo $7,6 \pm 1,4$ mm para los abejorros y $5,0 \pm 0,3$ mm para las abejas. La longitud de proboscis de los insectos evaluados coincide con los antiguos estudios de Darwin (1871) quien demostró que el género *Bombus* era el más adecuado

para la polinización de trébol rojo por su longitud de proboscis. Arbulo *et al.* (2011) obtuvieron valores de $8,4 \pm 0,65$ mm en sus mediciones de proboscis de ejemplares silvestres de *B. pauloensis* en Uruguay. Esta diferencia de longitud de proboscis entre los abejorros comerciales y una población natural podría deberse a presión de selección en el proceso de domesticación (Mortensen *et al.*, 2019).

Trampas para polinizadores

Durante las fechas de floración del cultivo se observaron pocos insectos volando a distintas horas del día tanto en el cultivo como en la flora circundante. Las capturas de polinizadores por trampas de agua colocadas en las parcelas de Polinización Libre resultaron escasas. En total, se capturaron 75 insectos.

El 94,7% de los insectos capturados pertenecían a uno de los tres órdenes más importantes entre los polinizadores: Diptera, Coleoptera o Hymenoptera (Tab. 3). Sin embargo, los valores resultaron bajos en todos los muestreos realizados, lo que refuerza la importancia de la polinización entomófila ya que las parcelas de Polinización Libre tuvieron un rendimiento de semilla muy bajo.

Tabla 2. Peso por semilla (mg) obtenido en distintos tratamientos de polinización de trébol rojo, *Trifolium pratense*.

Tratamiento de polinización	Peso/semilla (mg)
Restringido	2.1
Libre	1.9
<i>Apis</i>	1.8
<i>Bombus</i>	1.8

Tabla 3. Capturas en trampas de agua en trébol rojo, *Trifolium pratense*: D: Diptera, C: Coleoptera, H: Hymenoptera, DCH: Diptera + Coleoptera + Hymenoptera.

Órdenes	D±DS	C±DS	H±DS	Otros±DS	Total±DS	Total DCH±DS
Total*	28	2	41	4	75	71
Media	1,6±0,9	1,0± 0,0	1,6±0,8	1,0±0,0	2,4±1,2	2,3±1,2
n trampas	17	2	26	4	36	31
% del Total	37,3	2,7	54,7	5,3	100,0	94,7
% de DCH	39,4	2,8	57,7			100,0

CONCLUSIONES

Uno de los objetivos del estudio fue la determinación de diferencias en la producción de semillas de trébol rojo utilizando diferentes escenarios de polinización. El ensayo permitió identificar que *B. pauloensis* es, entre los polinizadores testeados, el más eficiente para *T. pratense* (genotipo GTR). La posibilidad de utilizar *A. mellifera* para la polinización de trébol rojo no debe ser inmediatamente descartada por el productor ya que, aunque no es tan eficiente para el cultivo como *B. pauloensis*, aumenta significativamente el rendimiento. Además, al ser una especie muy difundida en el medio agrícola, facilita enormemente la logística del servicio de polinización. Las parcelas de PR o PL prácticamente no produjeron semilla; es decir que la autofecundación fue mucho menor que la lograda por polinización entomófila. Esto también indica que la entomofauna silvestre de Bahía Blanca no es la adecuada para la producción de semilla de trébol rojo.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por la empresa Gentos S. A., por el PGI 24/A218 otorgado por la Universidad Nacional del Sur y por una beca de grado EVC CIN para F. Ess.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Rosa Jáuregui por proponer la realización del ensayo y a Gentos S.A. por los fondos y el material vegetal; a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) por los subsidios de funcionamiento

de centros asociados y al Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur por los Proyectos de Grupos de Investigación. Estamos muy agradecidos a los tres revisores anónimos cuyas críticas fueron muy superadoras para la mejora de este trabajo. Finalmente, agradecemos a los integrantes del Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA) por colaborar cuando fue necesario y por brindar un excelente ambiente de trabajo.

REFERENCIAS

- Abrahamovich A, Díaz N, Lucia M. Identificación de las “abejas sociales” del género *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) presentes en la Argentina: clave pictórica, diagnosis, distribución geográfica y asociaciones florales. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata, 2007;106(2):165-176.
- Arbulo N, Santos E, Salvarrey S, Invernizzi C. Proboscis length and resource utilization in two Uruguayan bumblebees: *Bombus pauloensis* Franklin and *Bombus atratus* Smith (Hymenoptera: Apidae). Neotropical Entomology. 2011;40(1):72-77.
- Arretz PV, Macfarlane RP. The introduction of *Bombus ruderatus* to Chile for red clover pollination. Bee World. 1986;67(1):15-22.
- Barletta P, Camarasa J, Carta H, De Andrés A, Méndez D, O'Gorman JM, Ojuez C, Pérez G, Scheneiter O, Varea I. Abundancia de trébol rojo y trébol blanco en pasturas del centro y norte de la provincia de Buenos Aires. RIA. Revista de investigaciones agropecuarias. 2013;39(1):95-104.
- Boyer KJ, Fragozo FP, Dieterich Mabin ME, Brunet J. Netting and pan traps fail to identify the pollinator guild of an agricultural crop. Sci Rep. 2020;10: 13819.
- Carámbula MC. Producción de semillas de plantas forrajeras (No. 633.2/. 3). Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, Argentina, 1981, p. 520.
- Darwin C. On the origin of species. D. Appleton and Company, 549 & 551 Broadway, New York. Fifth Edition, with Additions and Corrections. 1871, p. 470.
- Díaz BM, Maza N, Castresana JE, Martínez MA. Los sírfidos como agentes de control biológico y polinización en horticultura. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2020; 12.

- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat 2018. Córdoba, Argentina: Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. 2018.
- Forster IW, Hadfield WV. Effectiveness of honey bees and bumblebees in the pollination of Montgomery red clover. New Zealand journal of agricultural research. 1958;1(5):607-619.
- Free JB. Insect pollination of crops (No. Ed. 2). Academic press. 1993, p. 684.
- Hederström V, Rundlöf M, Birgersson G, Larsson MC, Balkenius A, Lankinen Å. Do plant ploidy and pollinator tongue length interact to cause low seed yield in red clover? Ecosphere. 2021;12(3), e03416.
- Holm SN. The utilization and management of bumble bees for red clover and alfalfa seed production. Annual Review of Entomology. 1966;11(1):155-182.
- INIA. 2017. http://www.inia.org.uy/productos/cvforrajaeras/tipos_trojo.pdf
- Jing S, Kryger P, Boelt B. Different pollination approaches to compare the seed set of diploid and tetraploid red clover *Trifolium pratense* L. Nordic Journal of Botany. 2021a; 39(6):1-9.
- Jing S, Kryger P, Boelt B. Review of seed yield components and pollination conditions in red clover (*Trifolium pratense* L.) seed production. Euphytica. 2021b;217(4):1-12.
- Kevan PG. Pollination and Flower Visitation. En Capinera JL, editor. Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht, 2008, p. 2960-70. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_3027
- Kluser S, Neumann, Chauzat MP, Pettis JS, Peduzzi P, Witt R, Fernández N, Theuri M. Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators. 2010. Disponible en: <http://archive-ouverte.unige.ch/unige:32251>
- Kremen C. Managing ecosystem services: what do we need to know about their ecology? Ecol Lett. 2005;8:468-479.
- Marinozzi LA, Villamil SC, Gallez LM, Iriarte LB, Carrasco N. Diversidad de polinizadores de *Brassica napus* L. en el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. En: Gallez LM y Pellegrini CN, coordinadoras. Sistemas extensivos del sur de la región Pampeana. 1a ed. Bahía Blanca, Argentina, EdiUNS, 2018, 99-106.
- Medler JT. Morphometric Studies on Bumble Bees. Annals of the Entomological Society of America. 1962;55(2):212-218. <https://doi.org/10.1093/aesa/55.2.212>
- Michener CD. The Bees of the World. 2nd Edition. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, 2007, p. 953.
- Michener CD, McGinley RJ, Danforth BN. The Bee Genera of North and Central America (Hymenoptera: Apoidea). Smithsonian Institution Press, Washington and London, 1994, p. 209.
- Mortensen NA, Bruckner S, Williams GR, Ellis JD. Comparative morphology of adult honey bees, *Apis mellifera*, reared in vitro or by their parental colony, Journal of Apicultural Research. 2019;58(4):580-586.
- Moure JS, Melo GAR. Bombini Latreille, 1802. In Moure JS S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. 2012. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Mar/15/2022
- Nates-Parra G. Abejas silvestres y polinización. Manejo integrado de plagas y agroecología. 2005;75:7-20.
- Palmer-Jones T, Forster IW, Clinch PG. Observations on the pollination of Montgomery red clover (*Trifolium pratense* L.). New Zealand Journal of Agricultural Research. 1966;9(3):738-747.
- Rao S, Stephen WP. Bumble bee pollinators in red clover seed production. Crop Science. 2009;49(6):2207-2214.
- Roig-Juñent, S., Claps, L. E., & Morrone, J. J. (2014). Biodiversidad de artrópodos argentinos: Vol. 4. INSUE-UNT Ediciones. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán.
- Salvarrey S, Arbulo N, Rossi C, Santos E, Salvarrey L & Invernizzi C. Utilización de abejorros nativos (*Bombus atratus* Franklin y *Bombus bellicosus* Smith) para mejorar la producción de semillas del trébol rojo (*Trifolium pratense*). Agrociencia Uruguay. 2017;21(1):95-104.
- Vanommeslaeghe A, Meeus I, Cnops G, Vleugels T, Merchiers M, Duquenne B, Roldán-Ruiz I & Smagghe G. Influence of pollinator abundance and flower visitation on seed yield in red clover. Arthropod-Plant Interactions. 2018;12(3):339-349.

Derechos de Autor (c) 2022 Soledad Villamil, Luciano A. Marinozzi, Facundo Ess



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) [Texto completo de la licencia](#)



ARTÍCULO ORIGINAL

Effects of dietary supplementation with abscisic acid on *Apis mellifera* colonies confined in overwintering nucleus: studies on the adult honey bee population, nose mosis, and expression of nutrition- and immune-related genes

Nicolás Szawarski¹, Enzo Domínguez^{1,2}, Silvina Quintana^{1,2,4}, Gregorio De Landa^{1,2}, Constanza Brascesco^{1,2}, Facundo Meroi Arcerito^{1,3}, Eugenia Olivera¹, Giulia Mitton^{1,2}, Facundo Ramos^{1,3}, Martín Javier Eguaras^{1,2}, Lorenzo Lamattina⁵ and Matías Maggi^{1,2}

¹ Centro de Investigación en Abejas Sociales (CIAS). Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Mar del Plata, Argentina.

² Instituto de Investigaciones en Producción Sanidad y Ambiente (IIPROSAM), Centro Científico Tecnológico Mar del Plata, CONICET. Centro de Asociación Simple CIC PBA, Argentina.

³ Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Buenos Aires, Argentina.

⁴ Laboratorio de Biología Molecular, FARESTAIE, Argentina.

⁵ Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB-CONICET), Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

*Corresponding author: N. Szawarski, n.szawarski@gmail.com

Received: 11 May 2022; accepted: 8 June 2022; published: 30 June 2022

Abstract

Due to the complex interactions between pathogens and environmental and anthropogenic stressors, in temperate climates, honey bee populations suffer depopulation and/or colony death, mainly during overwintering. *Nosema* spp. comprises one of the primary pathogens affecting *Apis mellifera* colonies, and cold ambient temperature promotes its intensity in worker bees. Additionally, the drastic reduction of plants decreases the diversity and quality of pollen and nectar diet for bees, leading to malnutrition of honey bee colonies and compromising the immunity of individuals, increasingly vulnerable to parasites and pathogens. Previous studies showed that abscisic acid (ABA) stimulates the health of honey bees at individual and colony levels against different stress conditions. This study aimed at evaluating the effect of supplementing the diet with ABA on overwintering nuclei, considering the population growth of honey bee colonies, nose mosis dynamics, and the nutrition- and immune-related gene expression of honey bees. Results in this work showed that ABA had no significant effect on any of the parameters studied. However, taking into account the results observed in the variables measured, we encourage the development of more studies focused on this topic, using more colonies per group and measuring the blooming period and the plant species involved.

Key words: *Apis mellifera*; abscisic acid; nose mosis; gene expression

Efectos de una dieta suplementaria con ácido abscísico en núcleos de *Apis mellifera* durante el invierno: estudios sobre la población de abejas adultas, nose mosis y la expresión de genes relacionados con la nutrición y el sistema inmunológico

Resumen

Debido a las complejas interacciones entre diversos estresores, en climas templados las poblaciones de abejas melíferas sufren despoblaciones y/o mortalidad, principalmente durante el invierno. *Nosema* spp. se encuentra entre los principales patógenos que afectan a las colonias de *Apis mellifera* y es durante el invierno donde se han registrado valores altos del desarrollo de esta enfermedad en las abejas obreras. Además, la reducción de la diversidad vegetal disminuye la cantidad y la calidad de la dieta de polen y néctar, lo que lleva a la malnutrición de las colonias de abejas. Estudios anteriores demostraron que el ácido abscísico (ABA) estimula la salud de las abejas melíferas frente a diferentes condiciones de estrés. En este contexto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación del alimento con ABA durante el invierno en núcleos de abejas melíferas considerando el desarrollo de la

población, la dinámica de la nosemosis y la expresión génica relacionada con la nutrición y la inmunidad. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que ABA no tuvo un efecto significativo en ninguno de los parámetros estudiados. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados observados, consideramos profundizar los estudios enfocados en esta temática, utilizando un mayor número de colonias por grupo y midiendo los periodos de floración y las especies de plantas involucradas.

Palabras clave: *Apis mellifera*; ácido abscísico; nosemosis; expresión génica

INTRODUCTION

The conventional agricultural production system adopted as a standard practice worldwide is currently leading to the loss of biodiversity (Eardley *et al.*, 2016) due to changes in land management, land cover and configuration, and agrochemical use (such as herbicides, fungicides, and insecticides) linked to these intensive production models (Dicks *et al.*, 2021). Consequently, a decline in some wild and managed pollinators in several world regions is evident (Potts *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2016; Requier *et al.*, 2018). Bee populations comprise around 20,000 species with diverse life forms and habits, fulfilling a fundamental role in ecosystems through plant pollination (Eardley *et al.*, 2016).

The European honey bee *Apis mellifera* is one of the few bees exploited by humans for commercial purposes. Although beekeepers are yearly multiplying bee hives to recover loss and/or increase them for productive purposes, a decrease in honey bees has been recorded in some regions (Meixner, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2012; Requier *et al.*, 2018). Several factors have been identified as the main drivers of the loss and depopulation of honey bees (Steinhauer *et al.*, 2018). Reports show that the interaction between pathogens and environmental and anthropogenic stressors are acting synergistically to negatively impact honey bee populations (DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015; Steinhauer *et al.*, 2018).

Main pathogens affecting the population dynamics of *A. mellifera* colonies include the intracellular parasite *Nosema* spp. (Higes *et al.*, 2008). *Nosema apis* and *Nosema ceranae* are the etiological agents of nosemosis (Higes *et al.*, 2008; Fries *et al.*, 2013). Recently, the genera *Nosema* and *Vairimorpha* have been renamed as *N. ceranae* and *N. apis* as *Vairimorpha ceranae* and *Vairimorpha apis*, respectively (Tokarev *et al.*, 2020). Nevertheless, in the present report, and to avoid any confusion, we will keep the traditional classification. *Nosema* infections negatively impact colony strength and productivity (Botías *et al.*, 2013). However, *N. ceranae* infections have been reported to be more severe in honey bee colonies than *N. apis* infections (Higes *et al.*, 2008). In Argentina, genetic studies reported that the cosmopolite microsporidia species is *N. ceranae* (Medici *et al.*, 2012; Porrini *et al.*, 2020). In addition,

other studies have concluded that nosemosis can act synergistically with other risk factors (Steinhauer *et al.*, 2018). For example, in temperate climates like that in Argentina, the cold ambient temperature promotes *Nosema* spp. intensity in honey bee workers (Retschnig *et al.*, 2017).

The drastic reduction of wild and native grasslands is probably one of the most critical ecological consequences arising from conventional agriculture, decreasing the diversity and quality of pollen and nectar diet for bees (Eardley *et al.*, 2016). This decrease produces malnutrition in honey bee colonies, compromising the immunity of individuals and turning bee populations more vulnerable to parasites and pathogens (DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015; Negri *et al.*, 2019). Thus, honey bee colonies growing in temperate climates with reduced flower resources are doubly challenged by cold stress and malnutrition (Döke *et al.*, 2015; Steinhauer *et al.*, 2018).

In Argentina, the growth of monocultures is significant, particularly soybean. Since 1996, this crop has continuously replaced natural extensions of habitats, affecting plant diversity and, consequently, pollen and nectar available to honey bees. Recently, a study also reported a reduction in honey yield of ~60 % in colonies associated with soybean crops (de Groot *et al.*, 2021). The advance of monocultures, the loss of floral resources, and the impact of cold climates induce beekeepers to adopt standard practices after the honey harvest season, such as supplementary energetic feeding of their colonies (sugar syrup, usually sucrose: water 2:1) to meet the energetic requirements overwintering. However, this supplement has low nutritional value compared to that of honey (Wheeler & Robinson, 2014), providing only a carbohydrate source. By contrast, honey is a natural food mainly derived from nectar and a highly nutritious source that provides natural and diversified sugars and low levels of minerals, amino acids, proteins (Erler & Moritz, 2016), molecules acting as secondary metabolites (phenolic acids, terpenes, alkaloids, etc.), and phytohormones (Wang *et al.*, 2017; Akšić *et al.*, 2020). Research shows that such natural molecules in nectar, pollen, and resins have beneficial effects on the health of honey bees, associated with the concept of self-medication (Erler & Moritz, 2016). Examples of these molecules include p-coumaric acid

(phenolic acid), abscisic acid (sesquiterpenoid hormone), anabasine (alkaloid), catalpol (monoterpenoid), quercetin (flavonol), nicotine (alkaloid), and thymol (terpenoid) (Bernklau *et al.*, 2019; Negri *et al.*, 2019; Mitton *et al.*, 2020).

In recent years, our research group has focused on the role of phytohormone abscisic acid (ABA), reporting favourable results on the health of honey bees at different levels (individual and colony), under different stress conditions (Negri *et al.*, 2015; 2017; 2020). *In vitro*-reared bee larvae exposed to cold stress and ABA supplementation revealed that the phytochemical induced the expression of several immune-related genes, mainly those of the Toll and JAK/STAT pathways, nitric oxide synthase (Negri *et al.*, 2020), and nutrition-related gene vitellogenin (Ramirez *et al.*, 2017). In field conditions, Negri *et al.* (2015) evaluated the effects of ABA on the immune response of honey bees and the performance of small *A. mellifera* colonies throughout winter. Results demonstrated that ABA had an effect at the individual level by stimulating innate cellular and humoral responses, and at a colony level where the group supplemented with ABA resulted in an adult population of honey bees of approximately 70% larger than the control group after winter (Negri *et al.*, 2015). Similarly, other studies have shown that the ABA dietary supplementation in honey bee colonies kept in Langstroth hives in combination with two different beekeeping nutritional strategies to confront overwintering, “honey management”, and “syrup management” had positive effects on the population dynamics. In such conditions, *A. mellifera* colonies reached stable levels of adult bees, increased brood during overwintering, and tended to prevent nosemosis at the colony level (prevalence) (Szawarski *et al.*, 2019). The honey bee colonies supplemented with ABA showed that the level of parasitized individuals did not increase significantly in late winter, in contrast with the control, which increased significantly (Szawarski *et al.*, 2019).

However, the effect of ABA on colonies of honey bees integrated into nuclei during winter has not yet been studied. The multiplication of honey bee colonies by means of nuclei comprising three to five frames with adults, brood, pollen, and honey reserves is a common practice followed by beekeepers to replace or increase the number of productive hives. Nevertheless, considering the small population of these colonies, beekeepers choose to produce them during the warmer seasons, especially during spring. In this sense, the growth and development of these colonies throughout the summer avoid possible losses due to the cold

temperatures that characterize winter in temperate climates.

Based on our previous reports, the main goal of this study was to evaluate the effect of ABA supplementation on overwintering nuclei colonies, centred on the experimental design and the use of small bee colonies (nucleus), to measure different biological variables at colony and individual levels. Specifically, we were interested in the impact of ABA supplementation on: 1) the honey bee population dynamics of nuclei from late summer that has to survive winter (colony level); 2) *Nosema* spp. population dynamics (colony level); and 3) the nutrition- and immune-related gene expression (individual level). Accordingly, we hypothesize that ABA supplementation impacts positively colony strength, *Nosema* spp. dynamics, and expression of nutrition- and immune-related genes.

MATERIALS AND METHODS

Study location and biological material

The field trial was performed in the experimental apiary belonging to the Social Bee Research Centre (CIAS-IIPROSAM-UNMdP), at the Santa Paula farm (38°10'06" S, 57°38'10" W), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. This study was carried out with a local honey bee ecotype (*A. mellifera carnica* x *A. mellifera ligustica*) (Giménez-Martínez *et al.*, 2017). Queens came from a mother colony at “Mar y Sierras” beekeeping hut, at the Santa Paula farm, provided by Dr. Leonardo De Feudis. Experimental units (honey bee colonies) were assembled into a nucleus; each consisted of three brood frames, one reserve frame (with honey and pollen), a newly fertilized queen, and a large adult bee population. They were prepared between February and March 2017. A total of eight nuclei were used (4 per treatment) following the Langstroth dimensions associated with the production system. Before beginning the trial, an acaricide treatment based on oxalic acid (Aluen CAP®, Cooperativa Apícola Pampero, Bahía Blanca, Argentina) was applied to the honey bee colonies for varroosis control.

Phytochemical

(R,S)-abscisic acid (ABA) was purchased from Sigma-Aldrich® (USA). The stock of ABA was dissolved in absolute ethanol ($\geq 99.5\%$ V/V purity, Biopack®) for the preparation of mother solution (50 mM). The final concentration of ABA dissolved in syrup (2:1, sugar: water, v: v) was 50 μ M. The concentration

of phytochemical ABA was defined according to the concentrations found in honey, also reported as a driver of physiological effects on the health of honey bees (Ramirez *et al.*, 2017; Szawarski *et al.*, 2019).

Treatment

Each group consisted of four colonies integrated into a honey bee nucleus plus a Doolittle feeder. The control group was fed weekly with 500 ml of sugar syrup (2:1, sugar: water, v:v) and the ABA group was fed weekly with 50 μ M ABA dissolved in 500 ml of sugar syrup (2:1, sugar: water, v:v). Both diets (control or ABA treatment) were supplied throughout the experiment (autumn-winter). The study was performed from May 11 (first day of application of the control and phytochemical treatment, autumn) to September 19 (late winter) 2017.

Population dynamics and survival of honey bee colonies

As a parameter of the strength of colonies, the number of combs covered by adult honey bees (defined as "degree") was measured in each of these, according to the subjective method (Delaplane *et al.*, 2013). The population degree of the honey bee colonies was used to estimate the population size of adult individuals. To measure this parameter, we quantified adult honey bees covering the frames. Therefore, this variable was defined as degree $x = x$ comb covered by adult honey bees.

Quantification of spores of *Nosema* spp. by optical microscopy

Quantification of *Nosema* spp. was carried out according to Fries *et al.* (2013). Samples from forager bees were taken from every colony after each treatment: (a) T1 time-point (May 17), (b) T2 time-point (August 5), and (c) T3 time-point (September 19). The entrance of each hive was covered with rubber foam so that the returning forager honey bees from the flight could concentrate on entrance. For each hive, a representative group of approximately 100 individuals was sampled using a bottle with 70% ethanol. Forager bees were sampled as they showed high infection levels compared to those of younger bees. All samples were collected at noon to compare time-points between treatments (Meana *et al.*, 2010). To determine the prevalence of *Nosema* spp. (number of infected honey bees/number of honey bees examined), 21 bees from each sample group (per hive) were used. Their abdomen was dissected and homogenized individually in 1 ml of distilled water. To

determine the abundance of *Nosema* spp. (n° spores/bee), pools of 60 honey bees from each sample group (per hive) were used. Their abdomen was dissected, and with a mortar, they were homogenized in 60 ml of distilled water (in a ratio of 1 ml of water/abdomen). The spore count of *Nosema* spp. was performed using a Neubauer counting chamber (BOECO, Germany) and an optical microscope (LEYCA DM 500, Germany) (480X).

Molecular biology analysis

Sampling: For the determination of the gene expression related to the immune system of *A. mellifera*, samples of nurse bees were taken from the brood frames ($n = 15$) (Steinman *et al.*, 2015) in a winter time-point (August 4). The sampling consisted of collecting nurses individually with forceps in a single bag (with zip closure, Ziploc® type), duly labelled for each colony, and stored with dry ice ($\sim -70^\circ\text{C}$). These were then transferred to a freezer at -80°C until RNA extractions were started.

RNA extraction: RNA was extracted from pools of ten adult bees randomly selected from each sample, according to Reynaldi *et al.* (2010) with modifications (Brascesco *et al.*, 2021). Bees were ground with a glass rod and homogenized with 3 ml of phosphate buffer saline free of RNases (1X PBS). The homogenate obtained from each sample was centrifuged for 15 min at 15,000 xg. Total RNA was extracted using 500 μ l of Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mixed with 500 μ l of the supernatant. The mixture was extracted with 220 μ l of cold chloroform. After centrifuging at 12,000 xg for 15 min, the RNA contained in the aqueous solution was precipitated by adding 750 μ l of isopropanol. The precipitated RNA was collected by centrifugation at 12,000 xg for 15 min, washed with 70% ethanol, and dissolved in 50 μ l of RNase-free water.

DNase treatment and reverse transcription (RT-PCR): DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to remove traces of entrained genomic DNA in RNA extraction by digestion at 37°C for 30 min. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using a reaction mixture containing 1 μ g of total RNA, random hexamers (12 ng / μ l), and the reverse transcriptase enzyme from Moloney murine leukemia virus (Invitrogen, USA), following the manufacturer's suggested procedures. Negative controls were performed, omitting RNA or reverse transcriptase. Then the cDNA was stored in a freezer at -20°C for use in qPCR amplifications.

Quantitative PCR Amplification (qPCR) and studied

Table 1. Primer sequences, annealing temperatures (AT), melting temperatures (MT), and references.

Primers	Primers sequence (5'-3')	AT (°C)	MT (°C)	Reference
<i>β-actin</i> - Fw <i>β-actin</i> -Rv	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG GACCCACCAATCCATACGGA	60	83.2	Yang & Cox-Foster, 2005
<i>domeless</i> - Fw <i>domeless</i> -Rv	TTGTGCTCCTGAAAATGCTG AACCTCCAAATCGCTCTGTG	53	78.5	Evans <i>et al.</i> , 2006
<i>nos</i> - Fw <i>nos</i> -RV	TCCACTCGCAGGTACTTTCC TCTGGAGGATCACCATTCC	54	76.7	Gregorc <i>et al.</i> , 2012
<i>toll18w</i> - Fw <i>toll18w</i> -Rv	CTCGGTAGCAATCCGTGGTC CAATCGCCGCTGTAAGC	59	91.2	Negri <i>et al.</i> , 2020
<i>vitellogenin</i> - Fw <i>vitellogenin</i> -Rv	AGTTCCGACCGACGACGA TTCCCTCCCACGGAGTCC	54	80.5	Corona <i>et al.</i> , 2007

genes: The cycling programs for DNA amplifications consisted of an initial denaturation of 2 min at 95 °C and 45 cycles of 10 s at 95 °C, 15 s at the specific hybridization temperature and 15 s at 72 °C. All qPCR reactions were carried out in a Rotor-Gene 6000 thermal cycler (Qiagen, Hilden, Germany) in a final volume of 20 µl using EvaGreen as an intercalating fluorescent dye (KAPA FAST, Biosystems, Woburn, USA). All determinations were made with a primer concentration between 448 to 900 mM.

Table 1 summarizes the primers (synthesized by Eurofins MWG Operon, USA) used in the qPCRs of this study, with their respective specific annealing and melting temperatures. Amplifications were normalized by analysing the constitutively expressed *β-actin* of *A. mellifera* (Yang & Cox-Foster, 2005). Specific primers for *β-actin* amplification are found in Table 1. The cycle program consisted of an initial denaturation of 2 min at 95 °C and 40 cycles of 10 s at 95 °C, 15 s at 60 °C and 15 s at 72 °C. After amplification, a melting curve analysis was performed, which resulted in an individual product-specific melting curve.

Relative expression (RE) values were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Each of the four targets was analysed separately and normalized to *A. mellifera* *β-actin*. The amplification efficiency was determined for each gene using 10-fold dilutions of cDNA. In all assays, standard curves for each gene had a slope between -3.2 and -3.5, and the standard deviation between duplicates was in all cases <0.167, as recommended for qPCR (Bustin, 2002).

Statistical analysis

The effects of the treatments with ABA on the population degree of adult bees (number of combs covered by bees during overwinter) were evaluated with

generalised linear mixed models (GLMM). We also assumed normal distribution of the variable "population grade" given the nature of the response variables and the structure of the sampling design (repeated measures of bees per colony) (Pinheiro & Bates, 2000; Gelman & Hill, 2006). The diet treatment, a categorical variable with two levels, and time of the year (before, during, and after winter) were included as fixed effects, and "colony" was included as the random effect.

Generalized linear models of mixed-effects were used to evaluate the effects of the treatments on the abundance and prevalence of *Nosema* spp. in autumn (May 17), winter (August 5), and late winter (September 19), given the nature of the response variables and the structure of the sampling design (repeated measures of bees per colony) (Pinheiro & Bates, 2000; Gelman & Hill, 2006). Since the response variables for the analysis of the abundance of *Nosema* spp. follows a discrete nature (number of spores per bee), the model assumed a Poisson distribution. As the response variable for the prevalence analysis of *Nosema* spp. follows a distribution according to the Bernoulli test (infected versus uninfected bees), the model assumed a binomial distribution with logarithmic function. The diet treatment and its interaction with the time of the year (before, during, and after winter) were included as fixed effects and "colony" as the random effect. Data analysis was carried out using the lmer function of the lme4 package (Bates *et al.*, 2015). A post-hoc test was then performed using the Tukey test for multiple comparisons of means using the LSMeans function of the package LSMeans (Lenth, 2017) of R software 4.0.0 (Team, 2016).

The effects of the treatments on gene expression levels were evaluated on the quantification time corresponding to the T2 sampling (August 4, winter period). T-test was applied to the data set to each gene

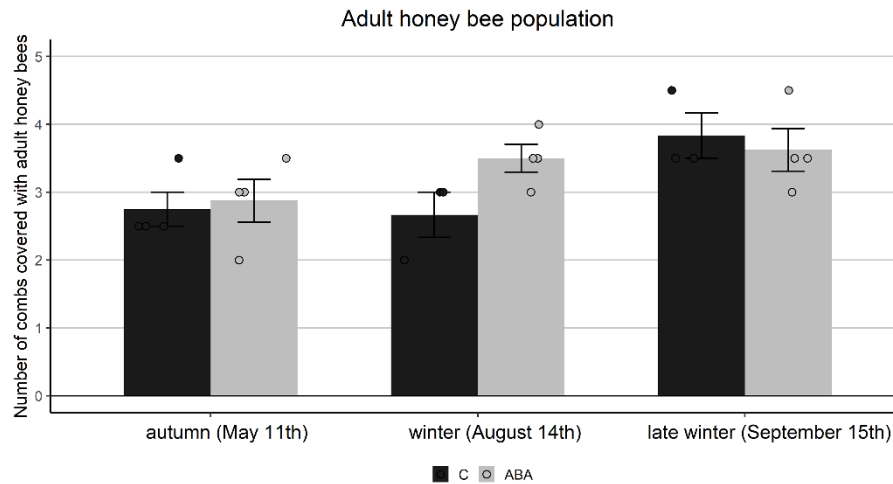


Figure 1. Adult honey bee population in nuclei with and without supplement of 50 μ M ABA. The results indicate that no significant differences were found between the control group and the treatment with ABA over time (GLMM: $F=0.976$, $p=0.336$). Dots represent data points. Thin bars indicate $\pm$ standard deviation (SD).

that passed the normality test (Shapiro-Wilks test) and homogeneity of variances (Levene's test). R software 4.0.0 (Team, 2016) was used for the analyses.

RESULTS

Effects of the supplementary diet with ABA on the population dynamics of honey bee colonies

There were no significant differences between ABA and the control treatment in each time-point analysed (autumn, winter, and late winter) (GLMM: $F=0.976$, $p=0.336$) regarding the effects of phytochemical supplementation on the development of *A. mellifera* colonies during overwintering (Fig. 1). In autumn (May 11), at the beginning of the experiment, colonies of both treatments (C and ABA) had equivalent initial levels in

the adult bee population ($C=2.75$; $ABA=2.875$, mean value of combs covered by adult bees or “ccab”). At the time-point corresponding to winter (August 14), the levels in adult bees for groups supplemented with ABA (3.5 ccab) increased their population compared to that of the control (2.67 ccab). However, these were not significant. At the last time-point corresponding to the late winter (September 15), the population levels of the control group were balanced with the colonies of the ABA group, resulting in 3.83 (C) and 3.63 (ABA) combs covered with adult bees, respectively.

The effects of ABA supplementation on *Nosema* spp. levels

The prevalence (percentage of bees parasitized) of *Nosema* spp. during overwinter did not vary

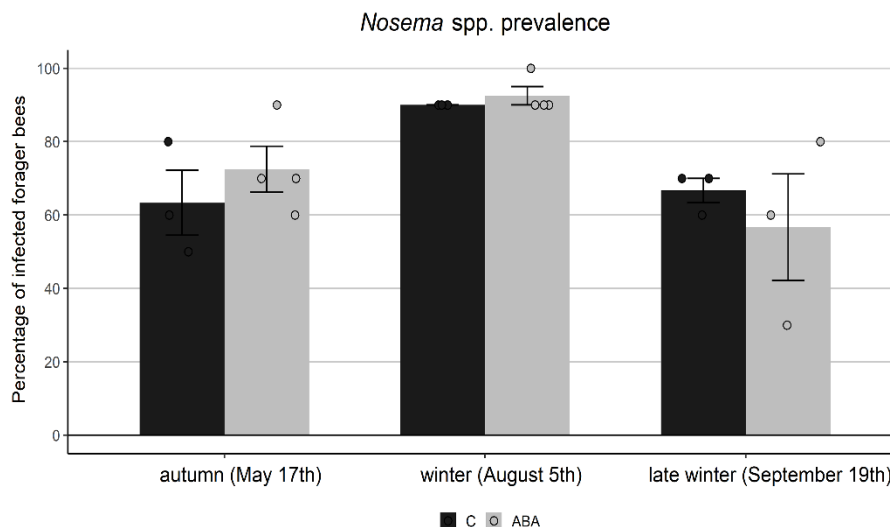


Figure 1. Changes in the prevalence of *Nosema* spp. during overwintering. The percentage of parasitized forager honey bees during overwinter did not vary significantly between the control and ABA treatments (GLMM: $F=0.134$, $p=0.719$). Dots represent data points. Thin bars indicate $\pm$ standard deviation (SD).

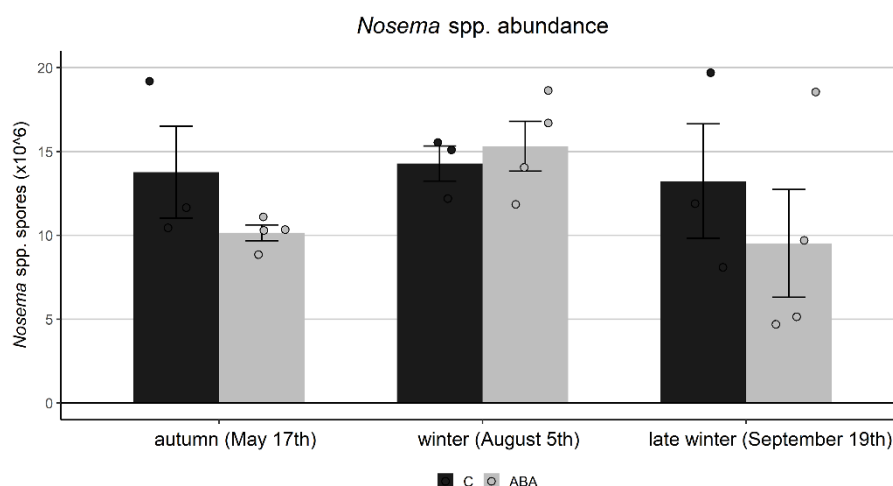


Figure 3. *Nosema* spp. spore abundance of forager worker bees during overwintering. The abundance of *Nosema* spp. during overwinter did not vary significantly between the control and ABA treatments (GLMM: $F=0.97$, $p=0.36$). Dots represent data points. Thin bars indicate $\pm$ standard deviation (SD).

significantly between ABA treatment and control group (C) (GLMM: $F=0.134$, $p=0.719$) (Fig. 2). The dynamics of *Nosema* spp. between autumn and winter behaved similarly in both treatments. We found an increase in the prevalence between autumn (May 17) and winter (August 5), and then towards late winter (September 19), decreasing again in both treatments.

The abundance of spores of *Nosema* spp. (n° spore/bee, from a pool of 60 individuals per colony) during the assay did not vary significantly between ABA treatment and the control group (C) (GLMM: $F=0.97$, $p=0.36$) (Fig. 3). For each diet treatment (C or ABA), spore loads per bee increased between autumn (May 17) and winter (August 5); then decreased towards late winter (September 19).

Effects of ABA dietary supplementation on the expression of nutrition- and immune-related genes in adult honey bees during winter

Gene expression analyses in nurse bees, calculated as relative expression (RE), involved three immune system genes (*domeless*, *nos*, *toll18W*) and a nutritional response gene (*Vitellogenin*). All showed increased levels compared to the control when the nucleus of honey bees was fed with ABA in winter (T2=August 4). However, this increase in ABA treatment was not significant to the control group (*domeless* T-test, $t=-1.283$, $p=0.269$; *nos* T-test, $t=-0.818$, $p=0.45$; *toll18W* T-test, $t=-1.092$, $p=0.325$ and *vitellogenin* (Vg) T-test, $t=-1.483$, $p=0.212$) (Fig. 4).

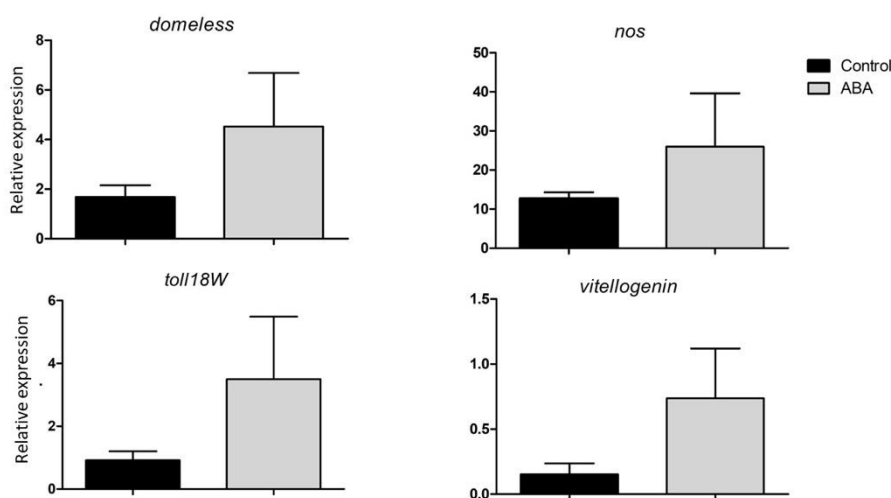


Figure 2. Nutrition- and immune-related gene expression of adult honey bees responding to supplementation (with and without 50 μ M ABA) during winter. The relative expression (RE) of the genes was studied in the sampling associated with winter (August 4) in nurse honey bees ($n=10$). The RE analysis for all genes showed no significant effect when comparing ABA treatment with control (*domeless* T-test, $p=0.269$; *nos* T-test, $p=0.45$; *toll18W* T-test, $p=0.325$ and *vitellogenin* T-test, $p=0.212$). Thin bars indicate $\pm$ standard deviation (SD).

DISCUSSION

In this study, we evaluated the effect of ABA supplementation on the overwintering of *A. mellifera* nuclei. ABA application (50 μ M) matched with the range of concentrations previously reported in nectar, honey, and honey bees (Tuberoso *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2017). In addition, this concentration has been shown to stimulate the immune response of bee larvae reared in the laboratory against different stress conditions (Ramirez *et al.*, 2017; Negri *et al.*, 2017; 2020).

ABA supplementation did not impact the population level of the treated colonies during overwintering. However, positive tendencies could be seen in the time-point corresponding to winter (August 14) for colonies supplemented with ABA. This treatment maintained higher adult bee levels in treated colonies than in the control group, where the number of combs covered with adult bees (ccab) was 3.5 and 2.67, respectively. According to Delaplane *et al.* (2013), these values represent 8,500 and 6,480 adult bees for ABA and control groups, respectively. By the end of the winter (September 15), both treatments reached a similar adult bee population size (Fig. 1). This final equality between the groups could be attributed to sporadic fluctuations in climate and blooming of some plant species in the area of study, impacting the population dynamics of honey bee colonies (Döke *et al.*, 2015). Although blooming was not measured in this study, it could be hypothesized that a high availability of floral resources at the end of winter promoted colony growth levelling between groups.

In a previous study by our research group (Szawarski *et al.*, 2019) carried out at Miramar, another area of the province of Buenos Aires, results showed a positive effect of ABA on both nutritional managements evaluated (with syrup or honey), observing higher population levels of adult bees at the end of winter than those in their respective controls. This dynamic is different from that seen in this experiment, where the population levels of the control group were balanced with the colonies of the ABA group during a similar season (September 15). In addition, this could be due to differences in the seasonal dynamics of the floral resources present between the environments of both experiments. Although flowering curves were not taken into account in either of the two assays, the apiary located in Miramar had specimens of the plant species *Myoporum laetum* in its surroundings. This plant species is characterized by being nectariferous and its flowering begins at the end of winter. Perhaps the contribution of

its nectar stimulates the development of the colonies associated with this experimental apiary. However, to adequately answer these questions, we should study and define in future experiments the corresponding flowering curves of each of these environments. In addition, another factor that could have influenced may be linked to the differences between the population size of the honey bee colonies of both experiments. As previously mentioned, the colonies in this study were assembled into a nucleus with smaller bee colonies, than the honey bee colonies in the study of Szawarski *et al.* (2019) (average of 3 vs 7 combs covered by adult bees, respectively). In this context, a nucleus with low population levels, given the supply of floral resources from the environment, could fastly reach similar population levels between both treatments. In view of the results reported by Negri *et al.* (2015), we also showed in this experiment that colonies supplemented with ABA maintain the population levels of adult bees after winter.

Regarding the effect of ABA on the levels of *Nosema* spp., we selected two parameters to study the parasite dynamics: prevalence and abundance. In agreement with previous studies (Higes *et al.*, 2008; Botías *et al.*, 2013; Retschnig *et al.*, 2017), our results showed that, during winter, there was an increase in parasitized bee levels and spore load of *Nosema* spp. This increment could be seen in colonies from both treatments (with and without ABA). Therefore, this field experiment would show no direct effect of ABA on the percentage of parasitized bees and on the development of *Nosema* spp. spores. Unlike our previous research (Szawarski *et al.*, 2019) where we had only studied the dynamics of nosemosis in two time-points, autumn and late winter, in the current experiment an extra intermediate time-point was included, over the winter, in which the highest levels of the prevalence and abundance of *Nosema* spp. were obtained in both treatments. However, as reported in Bernklau *et al.* (2019), where some phytochemicals are shown to promote worker bee longevity and *Nosema* tolerance, future laboratory assays should be required to possibly determine similar effects of ABA on *Nosema* parasitized honey bees. In addition, during the whole assay period, high values of prevalence of nosemosis were found, which could be a variable acting on the results obtained. In future assays we should consider, before conducting the experiment, standardizing all bee colonies according to prevalence levels of parasitosis.

The studied genes were associated with the immune system of *A. mellifera*. Some are markers of the immune pathways that respond to a diversity of risk factors:

toll18W gene is associated with Toll pathways, and *domeless* gene is associated with the JAK / STAT pathway (Evans *et al.*, 2006); *nos* gene (Gregorc *et al.*, 2012) regulates the synthesis of the enzyme nitric oxide synthase, associated with the production of nitric oxide (NO), a molecule that acts in signalling pathways and in cytotoxic mechanisms against parasites and pathogens (Rivero, 2006); and *vitellogenin* gene (Vg) (Corona *et al.*, 2007) regulates the synthesis of the lipoprotein vitellogenin, usually used as a biomarker of the nutritional status of individuals (Negri *et al.*, 2019). Concerning the expression of nutrition- and immune-related genes of *A. mellifera* (Evans *et al.*, 2006; Negri *et al.*, 2019, 2020), none of the studied genes (*domeless*, *nos*, *toll18W*, and *vitellogenin*) showed significant differences between the control group and the ABA treatment group in the time-point associated with winter (August 4). The lack of statistical differences between ABA and control group was probably related to the variability of the data and the low number of replications for each treatment (N = 4 of ABA, N = 3 of control, where N = honey bee nucleus). In addition, another factor that could have masked the effects of the genes studied is the age of the nurse bees sampled, since the individuals were not of the same age, which could have influenced on the variability of the data.

However, the four genes studied tended to increase gene expression levels in the ABA treatment compared to the control group. The tendency in the results of the *toll18W* gene, which encodes the Toll immune pathway receptor (Evans *et al.*, 2006), correlates with that reported by Negri *et al.* (2020), where they demonstrated that bee larvae reared *in vitro* and supplied with ABA show higher expression of the *toll18W* receptor. This suggests that the ABA could have a central role as an inducer molecule of the Toll immune pathway in honey bee larvae. In addition, Negri *et al.* (2020) also demonstrated that the expression of the gene encoding for nitric oxide synthase (*nos*), the enzyme responsible for NO synthesis, is induced by the ingestion of ABA in *A. mellifera* larvae. This is supported by previous reports where it has been demonstrated that both ABA and NO were involved in the immune response of honey bees (Negri *et al.*, 2015, 2017). Regarding gene *domeless*, a key component of the JAK/STAT pathway (Evans *et al.*, 2006), the results of Negri *et al.* (2020) demonstrated that larvae only fed with ABA tended to increase the level of expression of this gene. Yet, when larvae were exposed to cold stress, both groups, with and without ABA, showed higher significant inductions of the *domeless* gene.

Another gene that tended to increase its expression

level between the ABA treatment and the control was *vitellogenin* (Vg), related to stress responses (Münch & Amdam, 2010; Ramirez *et al.*, 2017) and nutritionally regulated functions (Negri *et al.*, 2019). The lipoprotein Vitellogenin is also thought to play a central role in the extended lifespan of the winter honey bees (Münch & Amdam, 2010). In Ramirez *et al.* (2017), supplementation with ABA in honey bee larvae reared *in vitro* and exposed to cold stress led to a more significant induction of Vg expression, which could be correlated with the tendencies seen in our study.

CONCLUSIONS

The results showed no significant differences after administering ABA on the population levels of adult bees, *Nosema* spp. levels and on the expression levels of the genes studied in a key period of the survival of the honey bee colonies. However, taking into account the positive tendencies observed in the variables measured, more studies should be conducted on this topic, with more colonies per group and measuring the blooming period and plant species involved.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

FUNDING

This work was supported by the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) through grants PICT-2012-0594 awarded to M.M. and PICT 2013-0904 awarded to L.L.; N.S. gained a fellowship by CONICET to develop his PhD thesis.

REFERENCES

- Akšić M F, Čolić S, Meland M, Natić M. Sugar and polyphenolic diversity in floral nectar of cherry. Co-Evolution of Secondary Metabolites. 2020; 755-773.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S, Christensen R H B, Singmann H, Dai B, Grothendieck G, Green P. Package 'lme4: Linear Mixed-Effects Models using Eigen' and S4. J. Stat. Softw. 2015; 67, 1–48.
- Bernklau E, Bjostad L, Hogeboom A, Carlisle A, HS A. Dietary phytochemicals, honey bee longevity and pathogen tolerance. Insects. 2019; 10(1), 14.
- Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. Veterinary research. 2013; 44(1), 1-15.
- Brasacco C, Quintana S, Di Gerónimo V, García M G, Sguazza G, Bravi M E, Fargnoli L, Reynaldi F J, Eguaras M J, Maggi M. Deformed wing virus type a and b in managed honeybee

- colonies of Argentina. Bulletin of Entomological Research. 2021; 111(1), 100-110.
- Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of molecular endocrinology. 2002; 29, 23-39.
- Corona M, Velarde R A, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes K A, Robinson G E. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007; 104(17), 7128-7133.
- DeGrandi-Hoffman G, Chen Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. Current Opinion in Insect Science. 2015; 10, 170-176.
- de Groot G S, Aizen M A, Sáez A, Morales C L. Large-scale monoculture reduces honey yield: The case of soybean expansion in Argentina. Agriculture, Ecosystems & Environment. 2021; 306, 107203.
- Delaplane K S, van der Steen J, Guzman-Novoa E. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. Journal of Apicultural Research. 2013; 52(1), 1-12.
- Dicks L V, Breeze T D, Ngo H T, Senapathi D, An J, Aizen M A, ... , Potts S G. A global-scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. Nature Ecology & Evolution. 2021; 1-9.
- Döke M A, Frazier M, Grozinger C M. Overwintering honey bees: biology and management. Current Opinion in Insect Science. 2015; 10, 185-193.
- Eardley C, Freitas B M, Kevan P G, Rader R. Background to Pollinators, Pollination and Food Production. In The Assessment Report on Pollinators, Pollination and Food Production. En: Potts S G, Imperatriz-Fonseca VL, Ngo HT, editors. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. Bonn, Germany, 2016, pp. 1–25.
- Erlor S, Moritz R F. Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). Apidologie. 2016; 47(3), 389-411.
- Evans J D, Aronstein K, Chen Y P, Hetru C, Imler J L, Jiang H, ... , Hultmark D. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. Insect molecular biology. 2006; 15(5), 645-656.
- Fries I, Chauzat M P, Chen Y P, Doublet V, Genersch E, Gisder S, ... , Paxton R J. Standard methods for *Nosema* research. Journal of Apicultural Research. 2013; 52(1), 1-28.
- Giménez Martínez P, Mendoza Y, Invenizzi C, Fuselli S, Alonso Salces R, Fernández Iriarte P, Maggi M. Morphometric correlation between *Apis mellifera* morphotypes (Hymenoptera) and *Varroa destructor* (Acari) from Uruguay. Journal of Apicultural Research. 2017; 56(2), 122-129.
- Gelman A, Hill J. Data analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models, 1st edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2006, 648p.
- Gregorc A, Evans J D, Scharf M, Ellis J D. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). Journal of Insect Physiology. 2012; 58(8), 1042-1049.
- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón E G, González-Porto A V, Barrios L, ... , Meana A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environmental microbiology. 2008; 10(10), 2659-2669.
- Koh I, Lonsdorf E V, Williams N M, Brittain C, Isaacs R, Gibbs J, Ricketts T H. Modeling the status, trends, and impacts of wild bee abundance in the United States. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016; 113(1), 140-145.
- Lenth R V. Using lsmeans. J Stat Softw. 2017; 69, 1-33.
- Livak K J, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. Methods. 2001; 25(4), 402-408.
- Meana A, Martín-Hernández R, Higes M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. Journal of Apicultural Research. 2010; 49(2), 212-214.
- Medici S K, Sarlo E G, Porrini M P, Braunstein M, Eguaras M J. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. Parasitology Research. 2012; 110(2), 859-864.
- Meixner M D. 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. 2010; 103, S80-S95.
- Mitton G A, Szawarski N, Mitton F M, Iglesias A, Eguaras M J, Ruffinengo S R, Maggi M D. Impacts of dietary supplementation with p-coumaric acid and indole-3-acetic acid on survival and biochemical response of honey bees treated with tau-fluvalinate. Ecotoxicology and environmental safety. 2020; 189, 109917.
- Münch D, Amdam G V. The curious case of aging plasticity in honey bees. FEBS letters. 2010; 584(12), 2496-2503.
- Negri P, Maggi M D, Ramirez L, De Feudis L, Szawarski N, Quintana S, ... , Lamattina L. Absciscic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. Apidologie. 2015; 46(4), 542-557.
- Negri P, Ramirez L, Quintana S, Szawarski N, Maggi M, Le Conte Y, ... , Eguaras M. Dietary supplementation of honey bee larvae with arginine and absciscic acid enhances nitric oxide and granulocyte immune responses after trauma. Insects. 2017; 8(3), 85.
- Negri P, Villalobos E, Szawarski N, Damiani N, Gende L, Garrido M, ... , Eguaras M. Towards Precision Nutrition: A Novel Concept Linking Phytochemicals, Immune Response and Honey Bee Health. Insects. 2019; 10(11), 401.
- Negri P, Ramirez L, Quintana S, Szawarski N, Maggi M D, Eguaras M J, Lamattina L. Immune-related gene expression of *Apis mellifera* larvae in response to cold stress and Absciscic Acid (ABA) dietary supplementation. Journal of Apicultural Research. 2020; 1-8.
- Pinheiro J, Bates D. Mixed-effects models in S and S-PLUS, 1st edition. Springer Science & Business Media. New York, NY, USA, 2000, 528p.
- Porrini L P, Porrini M P, Garrido M P, Müller F, Arrascaeta L, Fernández Iriarte P J, Eguaras M J. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates obtained from various *Apis mellifera* morphotypes. Entomologia Experimentalis et Applicata. 2020; 168(4), 286-294.
- Potts S G, Biesmeijer J C, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin W E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends in ecology & evolution. 2010; 25(6), 345-353.
- Ramirez L, Negri P, Sturla L, Guida L, Vigliarolo T, Maggi M, ... , Lamattina L. Absciscic acid enhances cold tolerance in honeybee larvae. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2017; 284(1852), 20162140.

- Requier F, Antúnez K, Morales C L, Aldea Sánchez P, Castilhos D, Garrido P M, ... , Garibaldi L A. Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *Journal of Apicultural Research*. 2018; 57(5), 657-662.
- Retschnig G, Williams G, Schneeberger A, Neumann P. Cold ambient temperature promotes *Nosema* spp. intensity in honey bees (*Apis mellifera*). *Insects*. 2017; 8(1), 20.
- Reynaldi F J, Sguazza G H, Pecoraro M R, Tizzano M A, Galosi C M. First report of viral infections that affect Argentine honeybees. *Environmental Microbiology Reports*. 2010; 2(6), 749-751.
- Rivero A. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in Parasitology*. 2006; 22(5), 219-225.
- Steinhauer N, Kulhanek K, Antúnez K, Human H, Chantawannakul P, Chauzat, M P Drivers of colony losses. *Current opinion in insect science*. 2018; 26, 142-148.
- Steinmann N, Corona M, Neumann P, Dainat B. Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees. *PloS One*. 2015; 10(6), e0129956.
- Szawarski N, Saez A, Domínguez E, Dickson R, De Matteis Á, Eciolaza C, ..., Negri P. Effect of abscisic acid (ABA) combined with two different beekeeping nutritional strategies to confront overwintering: Studies on honey bees' population dynamics and noseosis. *Insects*. 2019; 10(10), 329.
- Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2016.
- Tokarev Y S, Huang W F, Solter L F, Malysch J M, Becnel J J, Vossbrinck C R. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of invertebrate pathology*. 2020; 169, 107279.
- Tuberoso C I, Bifulco E, Caboni P, Cottiglia F, Cabras P, Floris I. Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(1), 384-389.
- van Engelsdorp D, Caron D, Hayes J, Underwood R, Henson M, Rennick K, Spleen A, Andree M, Snyder R, Lee K, ..., Bee Informed Partnership. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*. 2012; 51(1), 115-124.
- Wang Q, Cai W J, Yu L, Din, J, Feng Y Q. Comprehensive Profiling of Phytohormones in Honey by Sequential Liquid–Liquid Extraction Coupled with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017; 65(3), 575-585.
- Wheeler M M, Robinson G E. Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Scientific Reports*. 2014; 4, 5726.
- Yang X, Cox-Foster D L. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102(21), 7470-7475.

Derechos de Autor (c) 2022 Nicolás Szawarski, Enzo Domínguez, Silvina Quintana, Gregorio De Landa, Constanza Brasesco, Facundo Meroi Arcerito, Eugenia Olivera, Giulia Mitton, Facundo Ramos, Martín Javier Egúaraz, Lorenzo Lamattina, Matías Maggi



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la



REVISTA CIENTÍFICA DE
ABEJAS Y APICULTORES