

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de la Plata



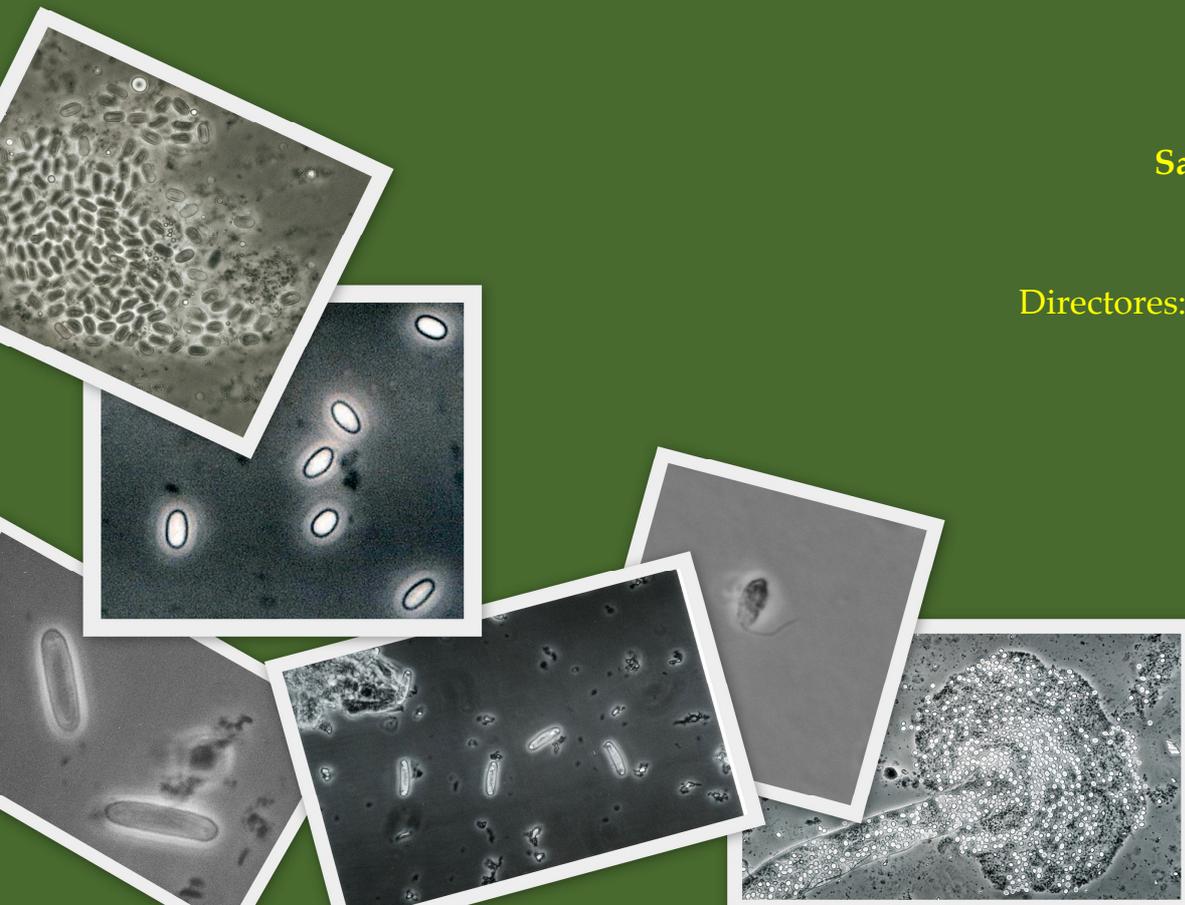
**PROTISTAS (PROTISTA) ENTOMOPATÓGENOS
ASOCIADOS A APOIDEOS (HYMENOPTERA: APOIDEA)
POLINIZADORES DE LA REGIÓN PAMPEANA.**

Santiago Plischuk

Directores: Carlos E. Lange

Alda González

2010



A mis padres.

A Valeria.

Agradecimientos

A mis directores, Carlos E. Lange y Alda González, por el generoso y permanente aporte de valiosos conocimientos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Patología de Insectos del CEPAVE, M. L. de Wysiecki, Y. Mariottini y C. Bardi, por las percepciones, conjeturas, sensaciones y éxitos compartidos en forma cotidiana.

A la Sra. Directora del CEPAVE, Alda González, y a todos mis compañeros del Centro, en especial a L. Giambelluca por la obtención y procesado de imágenes y mapas (además de su paciencia y buen humor). También a M. Rocca, N. Greco, L. Zonta, G. Rossi y L. Garbin por sus inestimables participaciones referidas a diferentes aspectos del trabajo, así como a mis compañeros de muestreo F. Gugole, E. Nieves y N. Cluigt.

A mis colegas y grandes amigos G. Daniele, J. Negrete y E. Soibelzon, por su constante apoyo y generación de ideas.

Al Sr. Prof. O. A. Disanto y a la Dra. G. T. Navone por sus influencias académicas durante mis etapas secundaria y universitaria, respectivamente.

A los profesionales J. Briano (USDA-ARS); A. H. Abrahamovich y M. Lucía (FCNyM, UNLP); R. Pérez, D. Leveratto, F. Reynaldi, A. Guardia-López y G. Albo (FCV, UNLP); M. Eguaras, M. Maggi, S. Ruffinengo, J. Marcángeli y E. Sarlo (UNMdP); A. Basilio y H. Ghiglione (UBA); L. Gallez (UNS); G. Goemans (Bélgica); G. Melo, K. Dos Santos Ramos, L. R. Faría Jr. y A. Pereira (Brasil); O. Delgado (Venezuela); M. Higes y M. Masón (España); J. van Veen (Costa Rica); K. Delaplane y R. Thorp (EE.UU.), por sus valiosos aportes.

A B. Pión y D. Dmitriev, por la traducción de trabajos en alemán y ruso.

A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas de iniciación y postgrado, respectivamente, así como la financiación del presente estudio.

A E. Diesser, G. Warner, J. M. Ginter, M. Mattone, D. Bustafuoco, Flia. Schneiter, Hnos. Rossini, N. Giuliano, Flia. Biroccio, J. Pender, B. García, R. Volkaart, Hnos. Doré, Flia. Daich, Flia. Caplan, R. Sydall, R. Matiassen, L. Garcilazo, Flia. Lenoier, A. Azparren, M. Deledda, J. Grosso, N. Dalzotto, Flia. Ibañez, R. Zaffora, N. Olalla, G. Berterame, Flia. Céngaro, Flia. Romero, O. Kauffer, Hnos. Tieri, Flia. Wasowsky, P. Bryksa, NEXCO S. A., G. Sangalli, M. Sabio, Rolo, F. Gebhard, A. Dovico, J. C. Gerona, S. Yurchuk, Flia. Segobia, Flia. Soibelzon, Flia. Reyna y Flia. Olano por alojamiento y asistencia en días de colecta, provisión de bibliografía y muestras, traslado y demás apoyo a campo durante el estudio.

A mis padres Omar e Hilda, indudables gestores de mi vocación por la naturaleza.

A mis hermanos Alejandro y Marcos, compañeros y amigos incansables e incondicionales.

A Valeria, mi abeja reina, por todo lo que me brinda día a día.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	9
<u>La Superfamilia Apoidea</u>	10
Resumen taxonómico	10
<i>Las abejas de lengua larga: ápidos y megaquílidos</i>	12
<i>La familia Apidae</i>	12
Los ápidos y la polinización	13
<i>Flora apícola y recompensas florales</i>	14
La Tribu Apini (Apinae).....	16
<i>Biología y distribución</i>	16
<i>Rol económico en Argentina</i>	17
<i>Aspectos sanitarios</i>	18
La Tribu Bombini (Apinae).....	21
<i>Biología y distribución</i>	21
<i>Rol económico en Argentina</i>	25
<i>Aspectos sanitarios</i>	25
<u>Los protistas y la relación patógeno-hospedador</u>	27
Los protistas	27
Interacciones patógeno-hospedador	28
Protistas patógenos de apoideos polinizadores. Antecedentes en Argentina.....	29
<i>Apis mellifera</i>	29
<i>Bombus spp.</i>	30
OBJETIVOS	31
<u>Hipótesis</u>	32
<u>Objetivos</u>	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
<u>Zona de estudio</u>	35
Límites	35
Relieve	36

Clima.....	36
Flora	36
<u>Obtención de muestras</u>	38
<i>Apis mellifera</i>	38
<i>Bombus</i> spp.....	41
Conservación e identificación de los especímenes	41
<u>Análisis de laboratorio</u>	45
Procesamiento y microscopía óptica.	45
<i>Apis mellifera</i>	45
<i>Bombus</i> spp.	46
<u>Análisis moleculares</u>	49
Aislamiento de esporos.....	49
Obtención del material genético.	50
Diseño de <i>primers</i>	50
Amplificación	51
Electroforesis y secuenciación.....	52
RESULTADOS	53
<u><i>Nosema ceranae</i> / <i>Nosema apis</i> (Microsporidia)</u>	54
Microscopía óptica.....	54
Análisis molecular	55
<i>Nosema ceranae</i> en <i>Apis mellifera</i> : Aspectos epizootiológicos	61
<i>Nosema ceranae</i> en <i>Bombus</i> spp.: Aspectos epizootiológicos	63
<u><i>Nephridiophaga apis</i> (Nephridiophagidae)</u>	65
Detección, morfología y ubicación	65
Aspectos epizootiológicos.....	67
<u><i>Malpighamoeba mellificae</i> (Amoebozoa)</u>	69
Detección, morfología y ubicación	69
Aspectos epizootiológicos.....	70
<u><i>Crithidia bombi</i> (Euglenozoa)</u>	73
Detección, morfología y ubicación	73
Aspectos epizootiológicos.....	75
<u><i>Apicystis bombi</i> (Apicomplexa)</u>	76
Detección, morfología y ubicación	76
Aspectos epizootiológicos.....	78

DISCUSIÓN	81
<u><i>Nosema ceranae</i> / <i>Nosema apis</i></u>	82
<i>Nosema ceranae</i> en <i>Apis mellifera</i>	83
Dinámica de la nosemosis en la región Pampeana	87
Prevalencia	87
Carga parasitaria (esporos/abeja)	88
Presencia/ausencia	89
<u><i>Nosema ceranae</i> y el Síndrome de Despoblamiento de Colmenas (S.D.C.)</u>	92
<i>Nosema ceranae</i> en <i>Bombus</i> spp.	93
Rango hospedador de <i>Nosema ceranae</i>	95
<u><i>Nephridiophaga apis</i></u>	97
<u><i>Malpighamoeba mellificae</i></u>	101
<u><i>Crithidia bombi</i></u>	105
<u><i>Apicystis bombi</i></u>	108
APÉNDICE I - LA INTRODUCCIÓN DE ESPECIES NO NATIVAS	111
<u><i>Megachile rotundata</i></u>	113
<u>El caso de Norteamérica y <i>Nosema bombi</i></u>	113
CONSIDERACIONES FINALES	116
<u>La situación actual de Argentina y el riesgo para sus polinizadores</u>	117
APÉNDICE II - APIARIOS MONITOREADOS EN ESTE ESTUDIO	120
REFERENCIAS	126
<u>Figuras</u>	126
<u>Tablas</u>	126
<u>Comunicaciones personales</u>	127
<u>Bibliografía</u>	127
<u>Páginas de Internet</u>	149

RESUMEN

El orden Hymenoptera es uno de los tres más diversos dentro de la clase Hexapoda. Dentro del Orden, la familia Apidae cuenta con unas 3.700 especies cuya principal importancia reside en el rol que cumplen la mayoría de ellas como agentes polinizadores. Tanto la abeja melífera (*Apis mellifera*) como los abejorros (*Bombus* spp.) presentan en la actualidad una amplia distribución mundial. Debido a su papel en la polinización y producción de miel en *A. mellifera*, son considerados organismos beneficiosos. Sin embargo, existe un considerable vacío en el conocimiento acerca de las enfermedades que afectan a estos insectos, así como de la transmisión de las mismas entre las diferentes especies de ápidos.

Los protistas, microorganismos eucariotas unicelulares, suelen constituir relaciones simbióticas con hexápodos. Por su condición, los insectos sociales tienden a formar asociaciones parasitarias muy variadas y particularmente las vinculadas con protistas suelen generar etiologías crónicas y debilitantes en sus hospedadores, causando graves efectos a largo plazo.

Siendo Argentina uno de los tres países con mayor producción de miel del mundo, existe un llamativo desconocimiento en torno a los protistas patógenos de *A. mellifera*. Análogamente, nada se sabe sobre los organismos de igual etiología que afectan a las especies de *Bombus*. Los efectos que las especies introducidas puedan tener sobre los polinizadores nativos son también desconocidos. Se plantea, por lo tanto, una serie de amenazas a las poblaciones autóctonas incluyendo principalmente la competencia, la hibridación y la vehiculización de patógenos, siendo esta última, quizás, la más significativa.

El principal objetivo de esta tesis es la obtención y análisis de información cuali-cuantitativa referida a las enfermedades infecciosas de etiología protista que se encuentren afectando a los principales himenópteros polinizadores de la superfamilia Apoidea (*Apis mellifera* y *Bombus* spp.) en Argentina, con énfasis en la Región Pampeana. Los objetivos particulares se basan en la detección, aislamiento e

identificación de los protistas involucrados, la determinación de parámetros de presencia/ausencia y prevalencia de cada uno de ellos, y la evaluación de posibles saltos de hospedador entre especies del mismo o diferente género.

El estudio se llevó a cabo entre marzo de 2006 y febrero de 2010. Se colectaron y examinaron *ca.* 400.100 individuos de *A. mellifera* provenientes de 36 localidades de ocho provincias y de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. La región Pampeana se dividió en 5 zonas, intensificándose los muestreos en apiarios de las localidades correspondientes. También fueron colectados y analizados 581 individuos del género *Bombus*, pertenecientes a 7 especies de las 10 presentes en el país. Los muestreos se realizaron en 11 provincias y en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Para la prospección y aislamiento de patógenos se utilizaron técnicas de disección y homogenización de los insectos. La detección, observación y caracterización de los patógenos se efectuó mediante microscopio compuesto (x400; x1000). La cuantificación de los patógenos se llevó a cabo con hemocitómetros y su medición, con micrómetros oculares. Para la obtención y procesado de material genético se siguieron metodologías de comprobada efectividad, en un marco cooperativo con el Laboratorio de Patología Apícola del Centro Apícola de Marchamalo, Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha, España.

Se detectaron cinco nuevos registros de protistas para Apidae en Argentina: [*Nosema ceranae* (Microsporidia), *Nephridiophaga apis* (Nephridiophagidae), *Malpighamoeba mellificae* (Amoebozoa), *Crithidia bombi* (Euglenozoa) y *Apicystis bombi* (Apicomplexa)]. Las tres primeras especies se hallaron en *A. mellifera*. *Nosema ceranae*, *C. bombi* y *A. bombi* fueron detectadas en especies de *Bombus*.

La presencia de *N. ceranae* en *A. mellifera* se determinó a nivel molecular por primera vez en el país, aislándose de muestras provenientes de las regiones Pampeana, Mesopotámica y Patagónica. A partir de la secuenciación del gen 16sSSU-RNAr se obtuvo una secuencia de consenso de 1.171 pares de bases. Asimismo, se reporta el hallazgo más austral de este microsporidio (General Conesa, Río Negro), el cual, si bien ampliamente disperso, se creía establecido solo en climas templado-

cálidos. No se hallaron casos de *N. apis*, especie que se consideraba común en nuestro país.

En base a colectas periódicas, se detallan y grafican los datos de presencia/ausencia, prevalencia y carga de esporos de *N. ceranae* en abejas de la región Pampeana obtenidos durante tres años. Se discuten las fluctuaciones observadas a lo largo del estudio y se comparan con datos preexistentes. Se exponen las características del Síndrome de Despoblamiento de Colmenas (S.D.C.), su eventual presencia en el país y los posibles factores involucrados.

También mediante análisis moleculares se registró por primera vez a nivel mundial la presencia de *N. ceranae* en 49 individuos de tres especies de *Bombus* (*B. atratus*, *B. morio* y *B. bellicosus*), siendo ahora el segundo microsporidio conocido capaz de parasitar a este Género. Se presenta una secuencia de consenso de 211 pares de bases. Se evalúan la viabilidad y rol de *Bombus* como hospedador, y se discute acerca de la susceptibilidad de las especies involucradas así como de las posibles rutas de transmisión interespecífica entre especies de *Bombus* y *A. mellifera*.

El hallazgo de *Nephridiophaga apis* presentado en esta tesis representa el segundo registro de este protista a nivel mundial. La localidad de detección fue Saavedra (Buenos Aires) y se lo registró en mayor proporción formando coinfecciones con *Nosema ceranae* que en forma individual. Fotomicrografías, medidas, y datos cuantitativos se aportan por primera vez. Se discuten las razones de su baja prevalencia así como los posibles sinergismos con otros patógenos.

Se expone también el hallazgo de *M. mellificae* en abejas de Argentina, obtenido de muestras de San Cayetano (Buenos Aires) y San Carlos de Bariloche (Río Negro). Esta especie fue registrada en forma individual o bien conjuntamente con *N. ceranae*. Se brindan los datos cuali-cuantitativos de dicho patógeno y se discute tanto su baja prevalencia como las posibles vías de ingreso al país.

Teniendo como hospedador a la especie no nativa *Bombus terrestris*, se constató la presencia de *Crithidia bombi* y *Apicystis bombi*, dos nuevas especies para Argentina y Sudamérica. Ambas fueron detectadas en muestras de San Carlos de Bariloche (Río

Negro). Se brindan los datos cuali-cuantitativos de ambas especies y se discute el probable ingreso de éstas desde Chile. También se postulan potenciales factores que facilitarían la transmisión de estos patógenos a *Bombus* nativos. A raíz de casos aún no confirmados de *Apicystis bombi* en *Apis mellifera*, se plantea la importancia de la abeja como reservorio u hospedador alternativo de este patógeno.

Posteriormente se analizan la factibilidad y los riesgos de un eventual intercambio de patógenos entre especies del mismo género o incluso entre especies de *Bombus* y *A. mellifera*. Se comentan antecedentes, escenarios similares y amenazas. Por último se discuten perspectivas referidas a las poblaciones de polinizadores autóctonos en torno a la presencia y prevalencia de los protistas detectados.

**Entomopathogenic protists (Protista) associated to pollinating apoids
(Hymenoptera: Apoidea) of the Pampas region.**

ABSTRACT

Hymenoptera is one of the three most diverse orders within the class Hexapoda. In this Order, the family Apidae contains 3,700 species. Its main importance relies on the role that most of their species play as pollinators. Both the honeybee (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* spp.) have a worldwide distribution. Because of their role in pollination and the capacity to produce honey in *A. mellifera*, they are considered beneficial organisms. However there are large gaps in knowledge regarding the diseases that affect these insects, as well as the transmission of these diseases between different species of Apidae.

Protists, unicellular eukaryotic organisms, commonly form symbiotic relationships with hexapods. Because of their condition, social insects tend to form varied parasitic-associations, and those related with protists in particular, often lead to chronic and debilitating diseases in their hosts causing serious long-term effects.

Being Argentina one of the three countries with higher honey production in the world, there is a vast ignorance about the pathogenic protists of *A. mellifera*. Similarly, nothing is known about the organisms of the same etiology that are affecting species of *Bombus*. The effects that introduced species could have on native pollinators are also unknown. Therefore, a series of threats has been proposed to affect native populations including mainly competition, hybridization, and vehiculization of pathogens, the latter being perhaps the most significant.

The main objective of this thesis is the obtention and analysis of qualitative and quantitative information on infectious diseases caused by protists on the main pollinators of the superfamily Apoidea (*A. mellifera* and *Bombus* spp.) in Argentina, with emphasis on the Pampas region. The specific objectives are the detection,

isolation, and identification of the involved protists, determination of parameters of presence / absence, and prevalence of each, and evaluation of possible host jumps between species of the same or different Genera.

The study was carried out between March 2006 and February 2010. Approximately 400,100 individuals of *A. mellifera* from 36 locations in eight provinces and from Buenos Aires city were collected and examined. The Pampas region was divided into 5 zones, intensifying the sampling in apiaries of the corresponding locations. A total of 581 individuals of genus *Bombus*, belonging to seven of the 10 species present in the country, were collected and analyzed. Sampling of bumblebees was conducted in 11 provinces and in Buenos Aires city.

Dissection and homogenization techniques were used for prospection and isolation of pathogens. Detection, observation, and characterization of pathogens were performed under the compound microscope (x400; x1000). Quantification of pathogens was carried out with an haemocytometer, and measurements with ocular micrometers. For isolation and processing of genetic material, widely used methodologies were followed within a cooperative framework with the *Laboratorio de Patología Apícola del Centro Apícola de Marchamalo, Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha, España*.

The main result was the detection of five new records for Argentina: [*Nosema ceranae* (Microsporidia), *Nephridiophaga apis* (Nephridiophagidae) *Malpighamoeba mellificae* (Amoebozoa), *Crithidia bombi* (Euglenozoa) and *Apicystis bombi* (Apicomplexa)]. The first three species were found in *A. mellifera*, while *C. bombi*, *A. bombi*, and again *N. ceranae*, were detected in *Bombus* spp.

The presence of *N. ceranae* in *A. mellifera* was determined at the molecular level for the first time in the country, isolated in samples from the Pampas, Mesopotamia, and Patagonia regions. A consensus sequence of 1,171 base pairs was obtained from sequencing 16sSSUrRNA gene. Also reported is the southernmost finding of this microsporidium (General Conesa, Río Negro), which was believed to flourished only

in warm temperate climates. No cases of *N. apis* we found, a species believed to be common in our country.

Based on regular collections, data for parameters of presence / absence, prevalence, and spore loads of *N. ceranae* in honeybees from the Pampas region, obtained along three years, are listed and graphed. We discuss the fluctuations observed and compared them with existing data from other authors. The characteristics of the Colony Collapse Disorder (C.C.D.), their eventual presence in the country, and the possible factors involved are outlined.

The molecular analysis also showed for the first time worldwide the presence of *N. ceranae* in 49 individuals of three species of *Bombus* (*B. atratus*, *B. morio* and *B. bellicosus*), being the second known microsporidian able to infect this Genus. A consensus sequence of 211 base pairs is presented. The feasibility and role of *Bombus* as an active host are evaluated. Susceptibility of the different species involved, and the possible routes of transmission between species of *Bombus* and *A. mellifera* are discussed.

The detection of *Nephridiophaga apis* constitutes the second record of this protist worldwide. Saavedra (Buenos Aires) was the locality of detection, and the pathogen was in higher proportion forming co-infections with *Nosema ceranae* than alone. Photomicrographs, measurements, and quantitative data are presented for the first time in this thesis. Reasons for the low prevalence and possible synergism with other pathogens are debated.

The finding of *M. mellificae* in honeybees of Argentina, obtained in samples from San Cayetano (Buenos Aires) and San Carlos de Bariloche (Río Negro), is presented. This species was recorded individually or jointly with *N. ceranae*, and qualitative-quantitative data about the pathogen are provided. Both, its low prevalence and possible routes of entry to the country are also discussed.

Infecting non-native *Bombus terrestris*, the presence of *Crithidia bombi* and *Apicystis bombi*, two not previously known species in Argentina and South America, is reported. Both species were detected in samples from San Carlos de Bariloche (Río

Negro). Qualitative and quantitative data of the species are provided, and the possible entry of these pathogens from Chile is also discussed.

Potential factors that could facilitate transmission of these pathogens to native *Bombus* are also postulated. Focusing in presumed cases of *Apicystis bombi* in *Apis mellifera*, the importance of the honeybee as a reservoir or alternate host for this pathogen is discussed.

The feasibility and risks of an eventual exchange of entomopathogens among species of the same Genus or even among species of *Bombus* and *A. mellifera* are discussed. Finally, perspectives are presented, concerning native pollinator populations and their relationships with the presence and prevalence of the detected protists.

INTRODUCCIÓN

La Superfamilia Apoidea

Resumen taxonómico¹

Dentro de los insectos, el orden **Hymenoptera** es uno de los más diversos, junto a Lepidoptera y Coleoptera (Nieves-Aldrey & Fontal-Cazalla, 1999; Fernández & Sharkey, 2006; Sharkey, 2007). El mismo comprende los subórdenes **Shymphyta** y **Apocrita** (Fig. 1), separados por rasgos morfológicos entre los que se destaca, en este último, la incorporación del primer segmento abdominal al tórax y de un estrecho peciolo formado por el segundo, desarrollando una “cintura de avispa” característica, que une el mesosoma con el metasoma o gaster (Fernández & Sharkey, 2006).



Figura 1 - Subórdenes de himenópteros. A) Symphyta. B) Apocrita (Vespoidea). C) Apocrita (Apoidea). (Fotos: M. Masón (A); F. Giambelluca (C)).

¹ Debido a que el presente estudio no es de carácter sistemático ni evolutivo, para mayor detalle en estos aspectos véase Nieves-Aldrey & Fontal-Cazalla (1999), Silveira *et al.* (2002), Fernández & Sharkey (2006), Michener (2007), Sharkey (2007).

Incluida en el suborden Apocrita, la superfamilia **Apoidea** (Fig. 1-C) (Alexander, 1992; Melo, 1999; Danforth *et al.*, 2006; Pilgrim *et al.*, 2008) se considera actualmente como un grupo monofilético que se desglosa en otras dos divisiones, los **Spheciformes** y los **Apiformes** (Fig. 2). Este segundo grupo habría mostrado una gran radiación adaptativa paralela a la aparición y desarrollo de las angiospermas, contando con unas 20.000 especies (González, 2006). Dos de sus familias (Megachilidae y Apidae -incluyendo Antophoridae-) contienen las especies de mayor eficacia en la polinización, llamadas **abejas de lengua larga** (véase pág. siguiente) (Alexander & Michener, 1995; Silveira *et al.*, 2002, Michener, 2007). Si bien las relaciones filogenéticas entre estos grupos es discutida (Roig-Alsina & Michener, 1993; Silveira *et al.*, 2002; Michener, 2007 y otros), en la presente tesis se seguirán las clasificaciones propuestas por Sharkey (2007), Michener (2007) y Williams *et al.* (2008c).

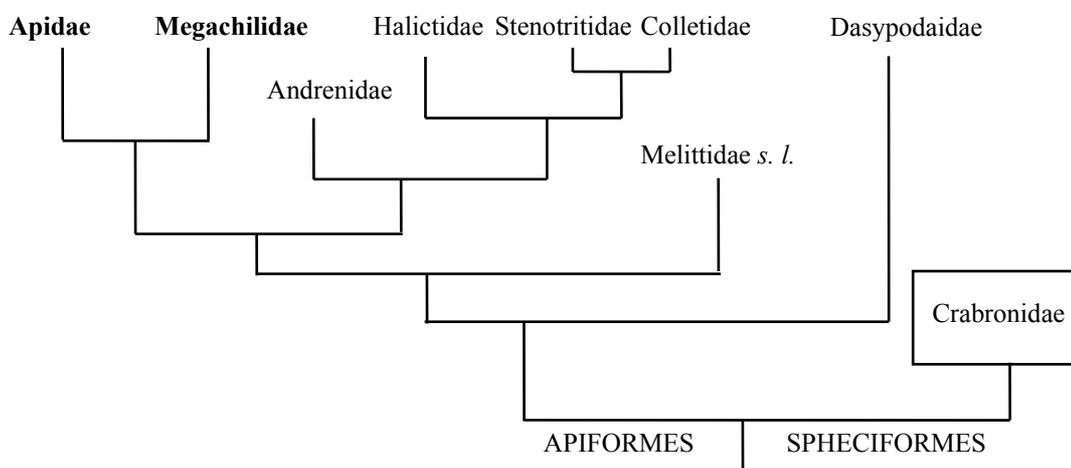


Figura 2 – Relaciones entre los Apiformes. Se asume que la familia Crabronidae (Spheciformes) es su grupo hermano. Se resaltan en **negrita** las abejas de lengua larga (Adaptado de Michener, 2007).

Las abejas de lengua larga: ápidos y megaquílidos

Este clado engloba a las familias Apidae y Megachilidae, agrupadas en función de características en sus piezas bucales (Michener, 2007). Si bien Apidae contiene tribus de hábitos parásitos (Roig-Alsina & Michener, 1993; Silveira *et al.*, 2002), ambas familias presentan diferentes caracteres morfológicos y comportamientos aparejados a una vida relacionada con la recolección de néctar y/o polen. Estructuras como corbículas, escopas, o glosas bien desarrolladas, permiten a estos insectos especializarse en la obtención y explotación de ambos recursos florales (Fernández & Sharkey, 2006).

La familia Apidae

Esta familia muestra una amplia distribución mundial e incluye unas 3.700 especies (González, 2006). Si bien las relaciones filogenéticas dentro de la familia son controvertidas (Roig-Alsina & Michener, 1993; Silveira *et al.*, 2002), se la divide en 33 tribus distribuidas en tres subfamilias (Nates-Parra, 2006). Cuatro tribus integrantes de la subfamilia Apinae, en la que se focaliza el presente estudio, son conocidas como **abejas corbiculadas** debido a que las hembras presentan la escopa² de cada pata modificada en una estructura tibio-tarsal compleja llamada **corbícula** (Fig. 3). Además, la mayoría de las especies presentan mayor o menor grado de sociabilidad (Noll, 2002; Nates-Parra, 2006; Michener, 2007).

² Estructura pilosa, conformada por pelos cortos y firmes, de igual longitud, utilizada para la recolección de polen.

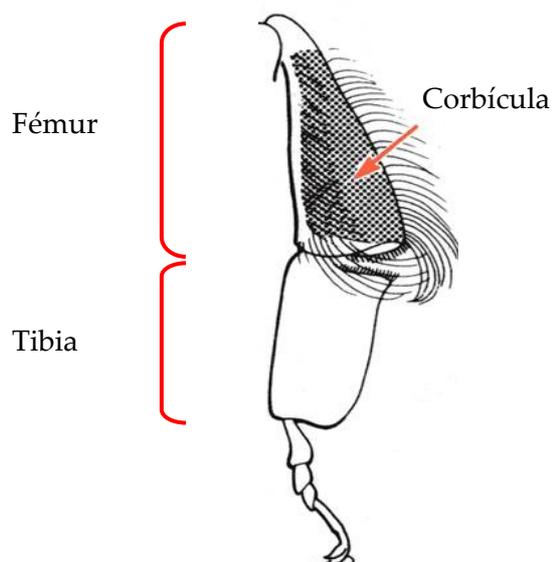


Figura 3 – Cara externa de la pata trasera izquierda de *A. mellifera*, en la que se indica la corbícula (Adaptado de www.hymatol.org).

Un vínculo elemental de este grupo con el hombre radica tanto en la obtención de recursos de la explotación apícola como de la polinización, relacionando directamente los ecosistemas naturales con los agrícolas (Goulson, 2003; Nates-Parra, 2006; Klein *et al.*, 2007; Sharkey, 2007). Vale decir que, además de formar un componente principal de la biodiversidad por sí mismos, estos insectos son eslabones vitales en el sustento de numerosos grupos, incluido el ser humano (Nieves-Aldrey & Fontal-Cazalla, 1999).

Los ápidos y la polinización.

Se define a la **polinización** como la transferencia de estructuras sexuales masculinas (polen) desde una flor hasta el órgano femenino receptor (estigma) de la misma flor (autopolinización) o de otra (polinización cruzada) (Basualdo & Bedascarrasbure, 2003). Los **polinizadores** son aquellos agentes tanto físicos como biológicos que realizan o colaboran en dicha transferencia (Tabla I).

De los numerosos agentes biológicos con potencial polinizador, las abejas corbiculadas son considerados los de mayor importancia (Proctor *et al.*, 1996;

Michener, 2007). Este servicio prestado por ellas, sean silvestres o domesticadas, sociales o solitarias, redonda en el mantenimiento de la diversidad vegetal así como en la producción de semillas y frutos (Nates-Parra, 2006).

TIPO	SUBTIPOS		AGENTE POLINIZADOR
ANEMÓFILA	-	-	Viento
HIDRÓFILA	-	-	Agua
ZOÓFILA	ENTOMÓFILA	MELITÓFILAS	Himenópteros
		CANTARÓFILAS	Coleópteros
		FALENÓFILA	Lepidópteros nocturnos
		PSICÓFILAS	Lepidópteros diurnos
		MIÓFILAS	Dípteros
	ORNITÓFILA	-	Aves
	QUIROPTERÓFILA	-	Quirópteros
ANTROPÓFILA	-	-	Hombre

Tabla I – Tipos de polinización y agentes polinizadores correspondientes (Faegri & van der Pijl, 1979; Proctor *et al.*, 1996).

Flora apícola y recompensas florales

Se denomina recompensa o recurso floral a los componentes de inflorescencias o de flores susceptibles de ser utilizados por animales y que, a causa de ello, aseguran repetidas visitas que conducirán a la polinización. La flora explotada específicamente por *A. mellifera* se conoce como **flora apícola** (Root, 1990). En lo que respecta a apoideos en general, las dos principales recompensas son el néctar y el polen. El primero suele ser el más importante, se obtiene libando los nectarios de la flor, y una vez conseguido es tratado enzimáticamente por el insecto para desdoblar azúcares y utilizarlo como fuente de carbohidratos. Como también contiene algunos

aminoácidos, se cree que también mediaría en el metabolismo del Nitrógeno (Michener, 2007). El recurso polinífero es recolectado como principal fuente proteica, aunque también aporta vitaminas y lípidos (Núñez, 1977; Root, 1990). Su abundancia estimula la postura de huevos por parte de la reina y, mezclado con néctar, forma parte esencial del alimento larval (Michener, 2007).

De este modo, abejas (*Apis* spp.) y abejorros (*Bombus* spp.) visitan diferentes tipos de flores y transportan los recursos obtenidos a la colonia para su utilización y almacenamiento, conducta de forrajeo denominada **pecorea** (Root, 1990) (Fig. 4). Gracias a ello, la probabilidad que posee una especie floral de ser polinizada aumenta notablemente con la visita de estos insectos. La capacidad de los machos se vería reducida en este aspecto debido a su carencia de corbículas³ y de contar con un menor número de individuos por colonia. Por el contrario el mayor rango de vuelo que tendrían los machos con respecto a las hembras, al menos de abejorros, sustentaría la importancia de esta casta en la polinización y flujo génico de las especies vegetales involucradas (Kraus *et al.*, 2009).

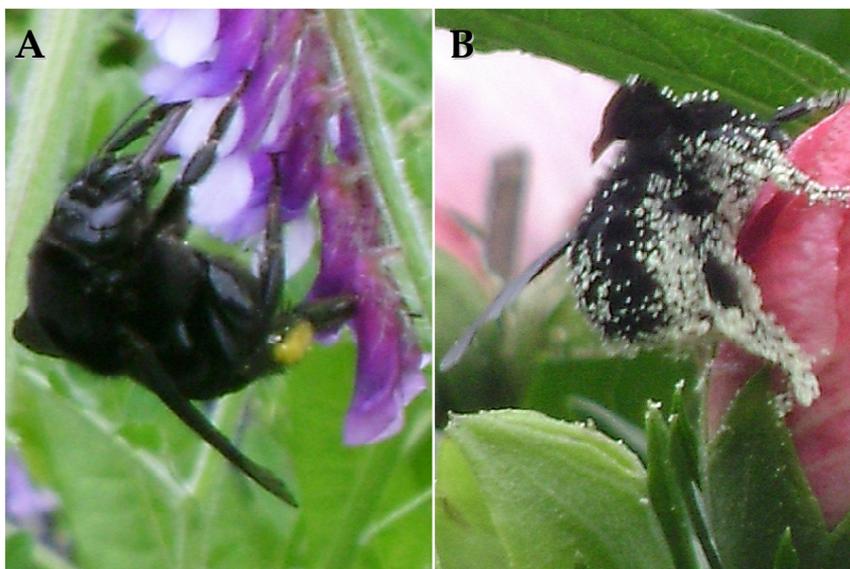


Figura 4 – Forrajeo de *Bombus atratus*. A) Obrera sobre *Vicia villosa* Roth (Leguminoseae) con polen en sus corbículas. B) Macho sobre *Hibiscus syriacus* L. (Malvaceae) cubierto de granos de polen.

³ El polen transportado sería solo aquel que quedase adherido a sus pelos durante la búsqueda de néctar para su propia alimentación.

La Tribu Apini (Apinae)

Biología y distribución

El único género incluido en la tribu Apini es *Apis*, el cual incluye 11 especies (Michener, 2007). Tanto en Argentina como en la región Neotropical, la única presente es la abeja *Apis mellifera* L. 1758. Desde el siglo XVII, debido a introducciones hechas por el hombre, *A. mellifera* se distribuye en todo el mundo excepto a latitudes extremas (Nates-Parra, 2006; vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

Los adultos de *Apis mellifera* (Fig. 5) miden entre 1 y 2,5 cm. de largo, dependiendo la casta y la subespecie. Para nidificar forma panales de celdas hexagonales donde la reina ovipone. El aprovisionamiento de néctar y polen se lleva a cabo en celdas similares, generalmente periféricas a las primeras. Las colonias pueden llegar a contener 60.000 - 80.000 individuos (Nates-Parra, 2006).

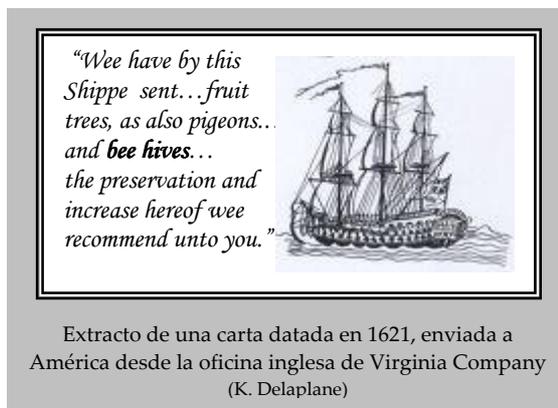
El complejo comportamiento social evidenciado por la división en castas (reinas, obreras y zánganos), la capacidad de comunicación entre los individuos (von Frisch, 1974) y el polietismo etario de las obreras, hacen de este insecto uno de los más estudiados (Root, 1990).



Figura 5 – *Apis mellifera* (obrero) pecoreando sobre *Lavandula angustifolia* Mill. (Lamiaceae). (Foto: F. Giambelluca).

Rol económico en Argentina

Se desconoce cuándo, exactamente, fue introducida *A. mellifera* en América, pero los primeros relatos escritos sobre traslado de colmenas desde Europa datan de las primeras décadas del siglo XVII (Dr. Keith Delaplane, *com. pers.*). No obstante, algunos autores afirman una



introducción previa, durante el establecimiento de irlandeses y noruegos en las costas de América entre los años 800 y 900 (Root, 1990). En Argentina, los registros más antiguos de la presencia de *A. mellifera* se remontan a 1827, al emplazar Bernardino Rivadavia colmenas en la región Pampeana, si bien es probable que estuvieran en el país desde principios del siglo XIX provenientes de misiones jesuíticas instaladas en Rio Grande do Sul, Brasil (Bierzychudek, 1979).

Históricamente, la relevancia que ha tenido *A. mellifera* en Argentina radica en la obtención de miel. Las estadísticas al año 2009 muestran que los niveles productivos sitúan al país como el segundo productor mundial, solo precedido por China (SAGPyA, 2009) (Fig. 6).

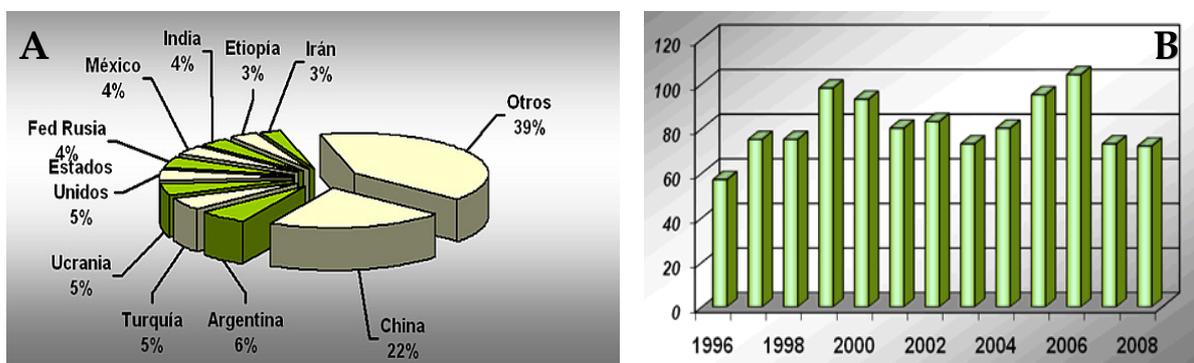


Figura 6 – Producción anual de miel argentina. A) Comparación con los principales productores mundiales. B) Evolución en toneladas de miel, desde 1996 a 2008. (Adaptado de SAGPyA, 2009).

La apicultura argentina ha experimentado una fuerte expansión, principalmente en la última década, con una consiguiente industrialización de la actividad otrora considerada artesanal. El volumen de miel producido anualmente ha aumentado en forma considerable, mostrando valores sostenidamente superiores a las 60.000 toneladas (SAGPyA, 2009) (Fig. 6). Aunque relegadas a la expansión apícola como actividad productora de miel, también han surgido actividades paralelas basadas en la comercialización de otros productos, como jalea real, propóleos, polen, cera y material vivo (SAGPyA, 2009).

Realizando otro enfoque sobre el potencial de este insecto, desde su introducción en Argentina, *A. mellifera* no solo resultó ser un ítem productor de gran importancia económica, sino también el polinizador de mayor efecto en extensas regiones del país. En la actualidad, *A. mellifera* probablemente represente el 60-95% de todos los polinizadores de las regiones templadas (Calatayud & Simó, 2001). Se ha estimado que la ganancia generada por una política productiva apuntada hacia la polinización de cultivos (incluyendo la producción de semillas) superaría los dividendos obtenidos por el comercio de miel y subproductos (Calatayud & Simó, 2001; Gordon & Davis, 2003; Committee on the Status of Pollinators in North America, 2007).

En Argentina existen estudios ponderando la eficacia polinizadora de esta especie en la producción de vicia (*Vicia villosa* Roth), colza (*Brassica napus* L.), alforfón (*Fagopyrum esculentum* Moench) y cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) (Martínez *et al.*, 2007, 2008). Desafortunadamente, no existen trabajos más abarcativos en este aspecto, ni proyectos tendientes a lograr una explotación intensiva de las abejas como insectos polinizadores, actividad aún subestimada en nuestro país (Martínez & Rodríguez, 1999; Ing. Ariel Guardia-López, *com. pers.*).

Aspectos sanitarios

En el plano sanitario, los estudios relacionados con *A. mellifera* en Argentina se han centrado clásicamente en dos agentes: el ácaro *Varroa* sp., desde su detección en

el país en 1976 (Montiel, 1978, 1980; Anderson & Trueman, 2000) (Fig. 7-A), y la bacteria *Paenibacillus larvae*, desde 1989 (Alippi & Nuñez, 1990, 1991), responsables de las enfermedades conocidas como **Varroasis** y **Loque americano**, respectivamente. Se estima que ambas enfermedades causan los mayores desequilibrios sanitarios en la industria apícola, no solo en Argentina, sino también en el resto del mundo (Bailey & Ball, 1991; Martin, 2001; Maggi *et al.*, 2009)

La enfermedad llamada **Nosemosis** es causada por dos especies del género *Nosema* (Microsporidia) y afecta a las formas adultas del insecto (Fig. 7-B). En los últimos años se ha indagado más profundamente acerca de la misma debido a su posible responsabilidad en el denominado **Síndrome de Despoblamiento de Colmenas (S.D.C.)** (Higes *et al.*, 2007, 2008b; Martín-Hernández *et al.*, 2007; pág. 91). En Argentina, pocos trabajos anteriores al presente estudio (Ringuelet, 1947; Cornejo & Rossi, 1974; Sarlo *et al.*, 2002a, b, 2005) han aportado datos sobre la nosemosis.

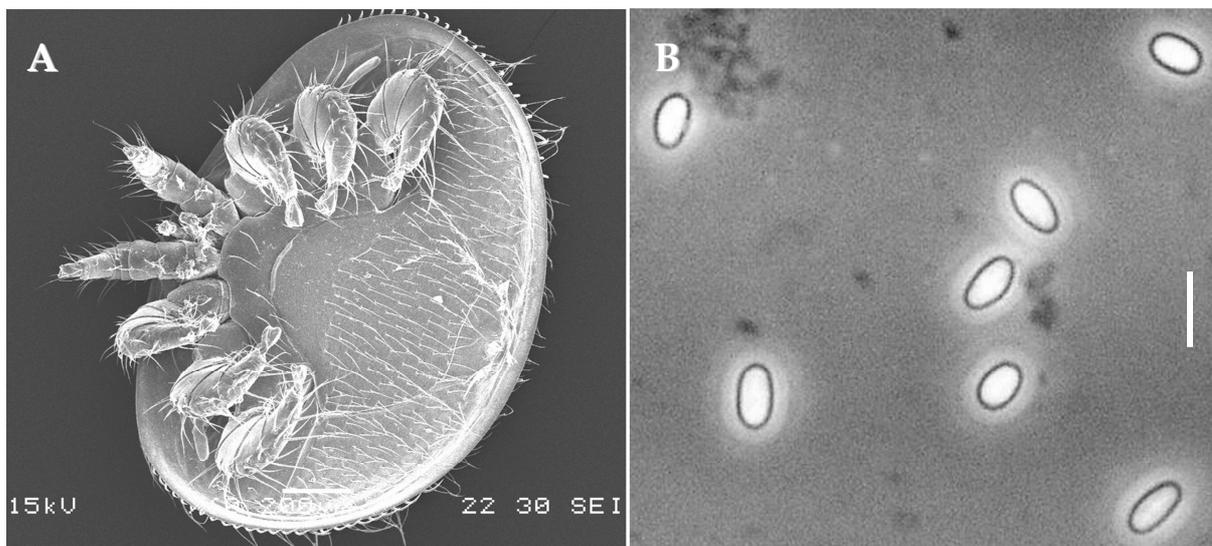


Figura 7 – Dos de los principales organismos causales de enfermedad en *Apis mellifera* en Argentina A) *Varroa destructor* (M.E.B., 50X; Foto: M. Maggi). B) *Nosema ceranae* (Escala = 5 μ).

Otras enfermedades registradas en el país son la **Ascospferosis** o **Cría yesificada**, micosis producida por *Ascospaera apis* (Plectomycetidae: Ascospaerales), detectada en 1980 (Rossi & Carranza, 1980), **Loque europea**, bacteriosis causada por *Melissococcus plutonius* (*M. pluton*) y otras especies asociadas, en Argentina desde

1962 (Camugli, 1962) y la **Acariosis traqueal**, cuyo agente es *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) (Ringuelet, 1947). También los virus de la parálisis aguda (ABPV, *Acute Bee Paralysis Virus*), de la parálisis crónica (CBPV, *Chronic Bee Paralysis Virus*) y de la cría ensacada (SBV, *Sacbrood Bee Virus*) se han registrado en el país recientemente (Reynaldi *et al.*, 2010).

La Tribu Bombini (Apinae)

Biología y distribución

La tribu Bombini incluye solo al género *Bombus* (Arg.: abejorros, mangangáes), con 15 subgéneros y alrededor de 250 especies (Hines, 2008; Williams *et al.*, 2008c). Son insectos sociales con generaciones de tipo anual, robustos, con un tamaño que oscila, con algunas excepciones, entre 9 y 25 mm. y que presentan pilosidad coloreada de negro, blanco, amarillo, anaranjado o rojo pálido (Abrahamovich *et al.*, 2005, 2007) (Fig. 8 - Tabla II). Al igual que *A. mellifera*, son insectos sociales con tres castas diferenciadas, solo que la organización de sus colonias no alcanza el mismo grado de complejidad, y éstas presentan un menor número de individuos integrantes, en general inferior a mil (Schmid-Hempel, 2001; Michener, 2007).

La mayoría de las especies de *Bombus* son polilécticas, es decir que visitan a una gran diversidad de plantas para obtener sus recursos (Moure & Sakagami, 1962; Prouveau, 1984; Michener, 2007; Williams *et al.*, 2008c) y, al parecer, todas comparten un ciclo de vida similar (Schmid-Hempel, 2001). Las reinas inseminadas entran en diapausa a mediados-finales de otoño, por lo general bajo la hojarasca, o eventualmente en huecos de árboles o edificios. Al inicio de la temporada templada finalizan su hibernación e inician la pecoreo. Sus ovarios comienzan a completar su desarrollo de modo que buscan un sitio adecuado para anidar y dan inicio a la colonia colocando su primera tanda de huevos en una masa de polen que han preparado. Unas semanas más tarde, la primera generación de hijas obreras eclosiona y asume las tareas de la colonia recién fundada, entre las cuales se halla el cuidado de las próximas crías. Hacia la última parte de la temporada, la reina comienza a producir huevos que darán lugar a machos y a hembras sexualmente reproductivas. Éstos copulan fuera del nido y las futuras reinas ya inseminadas buscan un sitio para entrar en diapausa y recomenzar el ciclo. Los demás miembros

de la colonia perecen (Schmid-Hempel, 2001; Fernández & Sharkey, 2006; Michener, 2007).

Bombus se distribuye en mayor medida en las zonas templadas de América del Norte y Eurasia. En las regiones Neotropical y Andina se han registrado *ca.* 42 especies en una amplia variedad de hábitats, desde el nivel del mar hasta cerca de 4.400 metros de altura, en los Andes (Abrahamovich & Díaz, 2001; Abrahamovich *et al.*, 2005, 2007). En nuestro país se han citado diez especies, incluidas en cuatro subgéneros (Torreta *et al.*, 2006; Abrahamovich *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008c). Ocho son nativas (*B. atratus*, *B. bellicosus*, *B. dahlbomii*, *B. morio*, *B. baeri*, *B. brasiliensis*, *B. opifex* y *B. tucumanus*) y ocupan gran parte del territorio nacional al Norte del estrecho de Magallanes, siendo *B. atratus*, *B. morio* y *B. bellicosus* las que muestran la distribución más extensa. Estas tres especies, junto a *B. dahlbomii*, han sido registradas en la región Pampeana (Abrahamovich *et al.*, 2007).

Bombus morio es una especie abundante, en especial en el Norte del país, en ambientes templado-cálidos; *Bombus bellicosus* se distribuye principalmente en las regiones Pampeana, Central y Mesopotámica del país; *Bombus atratus* es la especie más ampliamente dispersa en Argentina, probablemente debido a su tolerancia de los diferentes climas y altitudes. (González *et al.*, 2004; Abrahamovich *et al.*, 2005, 2007) (Fig. 8 - Tabla II).

Las especies *B. ruderatus* y *B. terrestris* (Fig. 8-B, C - Tabla II) no son nativas, y han sido registradas por primera vez en Argentina en los años 1996 y 2006, respectivamente (Roig-Alsina & Aizen, 1996; Torreta *et al.*, 2006). En base a sendos hallazgos al noroeste de la Patagonia, se estima que ambas han ingresado desde Chile donde se las introdujo comercialmente a fines del siglo pasado como polinizadores (Arretz & Macfarlane, 1986; Goulson, 2003).

ESPECIE	ORIGEN	DISTRIBUCIÓN EN ARGENTINA
<i>B. (Thoracobombus) atratus</i>	Nativo	Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán, La Pampa, Mendoza, Neuquén, Río Negro, San Luis.
<i>B. (Cullumanobombus) baeri</i>	Nativo	Salta, Tucumán, Catamarca, Jujuy, La Rioja.
<i>B. (Thoracobombus) bellicosus</i>	Nativo	Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Chubut, Entre Ríos, La Pampa, Misiones, Río Negro, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero. Posiblemente Salta y Tucumán.
<i>B. (Thoracobombus) brasiliensis</i>	Nativo	Misiones.
<i>B. (Thoracobombus) dahlbomii</i>	Nativo	Neuquén, Chubut, Santa Cruz, Buenos Aires, Mendoza, Río Negro. Posiblemente Tierra del Fuego.
<i>B. (Thoracobombus) morio</i>	Nativo	Salta, Tucumán, Misiones, Catamarca, Chaco, Corrientes, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán. Posiblemente Buenos Aires y Córdoba.
<i>B. (Thoracobombus) opifex</i>	Nativo	Catamarca, Salta, Córdoba, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Misiones, San Juan, San Luis, Santiago del Estero, Tucumán.
<i>B. (Cullumanobombus) tucumanus</i>	Nativo	Salta, Tucumán, Catamarca, Jujuy. Posiblemente Buenos Aires, Misiones.
<i>B. (Megabombus) ruderatus</i>	Invasor	Río Negro.
<i>B. (Bombus) terrestris</i>	Invasor	Río Negro, Neuquén, Chubut.

Tabla II – Especies del género *Bombus* en Argentina. En negrita las provincias con mayor abundancia de la especie (Abrahamovich *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008c; Plischuk & Azparren, *datos no public.*).

Si bien los límites de la actual distribución de estas dos últimas especies en el país se desconocen, registros fotográficos obtenidos en el año 2008 han captado a ejemplares de *B. terrestris* en la localidad de Trevelin (Chubut) (Plischuk & Azparren, *datos no public.*), distante más de 300 Km. al Sur del punto de detección original, San Martín de los Andes (Neuquén) (Torreta *et al.*, 2006), y a ca. 200 Km. del punto de colecta de este estudio (San Carlos de Bariloche, Río Negro), en la misma dirección. Tampoco se descartan citas sin confirmar de su presencia sobre el paralelo 45,5 S, cercano al límite Chubut - Santa Cruz.

En este sentido, estudios previos muestran una capacidad de dispersión de *B. terrestris* de 12,5 a 90 Km. anuales en Oceanía (Hopkins, 1914; Semmens *et al.*, 1993; Macfarlane & Gurr, 1995; Buttermore, 1997; Hingston *et al.*, 2002) y de 9 Km. anuales, en Chile, para *B. ruderatus* (Buttermore, 1997)⁴.

⁴ Pueden hallarse similares observaciones de otros autores (Mikkola, 1978; Inari *et al.*, 2005; Nagamitsu *et al.*, 2007) aunque sin estimar distancias precisas.

También existe consenso respecto de la capacidad de adaptación que posee *B. terrestris* para establecer sus poblaciones bajo diferentes condiciones ambientales, así como de la explotación de nuevos recursos florales (Hingston *et al.*, 2002; Ruz, 2002; Goulson & Hanley, 2004; Velthuis & van Doorn, 2006; Morales, 2007a).

Hingston *et al.* (2002) sugirieron, aún antes de su detección en nuestro país, la posibilidad de una exitosa invasión de *B. terrestris* debido a las similitudes geoclimáticas entre Argentina y parte de Oceanía. En forma análoga, Farji-Brener & Corley (1998) han analizado numerosas condiciones favorables que se presentarían para el éxito de poblaciones de la otra especie no nativa, *B. ruderatus*, en nuestro territorio.



Figura 8 – Cinco de las diez especies de *Bombus* presentes en Argentina. A) *B. morio*, *B. bellicosus* y *B. atratus*: especies nativas. B) *B. ruderatus* y C) *B. terrestris*: especies invasoras. (Fotos: A. Abrahamovich (A); D. Goulson (B); A. Azparren (C))

Rol económico en Argentina

El papel de los abejorros del género *Bombus* es vital para la polinización de un sinnúmero de plantas, cultivadas o no, con una morfología floral que impida el libado de néctar por *A. mellifera*, o bien situadas en zonas con clima frío-húmedo (Heinrich, 1979; Lundberg, 1980; Fussell & Corbet, 1991; Dramstad & Fry, 1995). La importancia de *Bombus* como polinizador ha sido detallada en estudios de todo el mundo (Macfarlane *et al.*, 1994; Morandin *et al.*, 2001a, b; Higo *et al.*, 2004; Morales, 2007a), incluso citando su mayor potencial en este aspecto en relación a *A. mellifera* bajo determinadas condiciones (Freitas, 1998; Westerkamp, 1991; Stubbs & Drummond, 2001; Javorek *et al.*, 2002).

En Sudamérica, Chile ha incursionado en este sentido, con una política de introducción de especies a fines de polinizar cultivos de trébol (*Trifolium* spp.), tomate (*Lycopersicum* spp.), arándano (*Vaccinium* spp.) y frambuesa (*Rubus* spp.) (Estay *et al.*, 2001, 2003; Ruz, 2002; Velthuis & van Doorn, 2006). Nuestro país no cuenta con tales políticas ni con estimaciones tendientes a cuantificar la polinización llevada a cabo por las poblaciones de *Bombus* existentes. Existen proyectos, sin embargo, basados en el manejo de *Megachile rotundata* (Apoidea: Megachilidae) en el límite pampeano-patagónico, introducido en el país en la década del '70 para optimizar la polinización de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Martínez, 2001). Se realizarán comentarios acerca de estos insectos en el Apéndice I.

Aspectos sanitarios

Aunque en otros países se investiga acerca de las dolencias que afectan a las poblaciones de *Bombus*, tanto protistas (Schmid-Hempel & Loosli, 1998; Imhoof & Schmid-Hempel, 1999; Larsson, 2007) como ácaros (Goka *et al.*, 2001; Çankaya & Kaftanoglu, 2006) o nematodos (Macfarlane, 1975; Macfarlane & Griffin, 1990), hasta

el presente trabajo no existían estudios relacionados con las enfermedades infecciosas que puedan estar afectando a individuos de este género en Argentina.

Por otra parte, es cada vez más frecuente la introducción de especies alóctonas de abejorros para optimizar la polinización en áreas determinadas o invernáculos. Goulson (2003) y Morales (2007a) han detallado las posibles implicancias ecológicas de este accionar: competencia con especies nativas por el recurso floral y sitios de nidificación, cambios en la producción de semillas de plantas nativas, polinización de malezas no nativas, potenciales consecuencias genéticas en la población local y transmisión de patógenos a organismos nativos.

Ante el potencial ingreso de otros polinizadores exóticos a nuestro territorio, resulta de importancia conocer el estado sanitario de las poblaciones ya presentes en Argentina.

Los protistas y la relación patógeno-hospedador

Los protistas

Para la definición de este grupo se seguirán los enfoques de Hausmann *et al.* (2003) y Adl *et al.* (2005), quienes consideran a los protistas como un agrupamiento de microorganismos eucariotas unicelulares.

Diversos protistas se hallan constituyendo simbiosis con insectos, las cuales se extienden desde el mutualismo y el comensalismo hasta el parasitismo (Tanada & Kaya, 1993; Undeen & Vávra, 1997). Anderson & May (1981) han definido claramente las condiciones necesarias para que un organismo parásito sea considerado como **patógeno o microparásito**. Según los autores, el mismo debe ser de tamaño diminuto (normalmente no visible a simple vista), poseer un tiempo generacional corto (significativamente menor que el de su hospedador) y exhibir una altísima tasa reproductiva dentro del individuo que lo aloja. En adelante se utilizarán los términos patógeno y microparásito en forma indistinta, y se adoptará el término **hospedador** para referirse al insecto que lo alberga.

La acción de un patógeno sobre el hospedador generalmente altera las funciones o estructuras normales de un tejido, órgano o del cuerpo de este último, produciendo una **enfermedad**. La capacidad de un agente patógeno de producir dicha enfermedad se denomina **patogenicidad** (Onstad *et al.*, 2006). El grado de patogenicidad se conoce como **virulencia**, la cual es cuantificable. Por lo tanto, pueden considerarse cepas más o menos virulentas dentro de una misma especie patógena.

Interacciones patógeno-hospedador

La interacción entre patógenos y hospedadores es un fenómeno generalizado y se ha estimado que la mitad, o aún más de todos los organismos en la Tierra serían parásitos o patógenos (Price, 1980; Windsor, 1998).

Los insectos sociales interactúan con una gran diversidad de especies de parásitos y parasitoides (Schmid-Hempel, 1998). Dentro de los protistas, cuatro grandes agrupamientos revisten mayor interés para el presente estudio, debido a que incluyen formas microparásitas de apoideos. Tales agrupamientos, llamados **supergrupos** por Adl *et al.* (2005) son **Amoebozoa**, **Opisthokonta**, **Chromalveolata** y **Excavata** e incluyen a las amebas, hongos, gregarinas y flagelados, respectivamente.

La alta densidad de los individuos dentro de la colonia, su relación física estrecha (contacto casual, comunicación, acicalamiento o *grooming*) y la trofalaxia⁵, características comunes en la mayoría de los apoideos, les permitiría poseer altas tasas de transmisión (Maddox, 1987; Fries & Camazine, 2001; Naug & Camazine, 2002), especialmente en patógenos con **transmisión de tipo horizontal** [transferencia desde un individuo hospedador a otro, excepto desde progenitores directamente a la descendencia inmediata (Onstad *et al.*, 2006)].

Al respecto, se cree que los hospedadores desarrollarían evolutivamente diversas formas para defenderse de los microparásitos o evitarlos, tales como los sistemas inmunológicos, la síntesis de compuestos químicos, y determinadas características comportamentales. Los patógenos, a su vez, permanecerían bajo una fuerte selección para elaborar las estrategias que superen estas protecciones. Esta constante interacción entre hospedador y patógeno generaría una presión de selección coevolutiva en la que los primeros son seleccionados apuntando a una resistencia más eficaz y los últimos de acuerdo a una mayor virulencia (Gilliam & Shimanuki, 1966; Baer, 2000).

⁵ Mecanismo de intercambio de alimento o transferencia de feromonas, en el que los aparatos bucales de los insectos entran en contacto. Puede tener lugar entre dos adultos o entre adulto y larva.

En caso de que una especie parásita o patógena realice un pasaje desde su especie hospedadora original hacia otra y logre establecerse en la población de esta última formando una asociación *de novo*, se dice que ha realizado un **salto de hospedador** o *host switch* (Page, 1994; Shafer *et al.*, 2009). Algunos ejemplos que involucran a los himenópteros abordados en la presente tesis son el de *Varroa destructor* (*V. jacobsoni*) desde *A. cerana* a *A. mellifera* (Oldroyd, 1999), el del virus de las alas deformadas (DWV, *Deformed Wing Virus*) desde *A. mellifera* a *Bombus terrestris* y *B. pascuorum* (Genersch *et al.*, 2006), y el del protista *N. ceranae* desde *A. cerana* a *A. mellifera* ⁶ (Higes *et al.*, 2006a).

Protistas patógenos de apoideos polinizadores. Antecedentes en Argentina

Apis mellifera

En lo que a protistas patógenos de *A. mellifera* respecta, si bien a escala mundial se conocen diferentes agentes, en Argentina el conocimiento es escaso. Hasta el año 2006, se había detectado la presencia del género *Nosema* (Opisthokonta: Microspora)⁷ (Ringuelet, 1947), pero no existían diagnósticos precisos determinando si la especie en cuestión era *N. apis* Zander, 1909 ó *N. ceranae* Fries *et al.*, 1996.

Otros protistas con capacidad de afectar a *A. mellifera* se encuentran entre las amebas (Amoebozoa), las gregarinas (Chromalveolata: Apicomplexa), los flagelados (Excavata: Kinetoplastea) y los nefridiofágidos (Opisthokonta: Nephridiophagidae) (Maassen, 1916, 1919; Prell, 1926, 1927; Ivanić, 1937; Stejskal, 1965, 1972; Langridge & McGhee, 1967; Lipa & Triggiani, 1996). Ninguno de ellos ha sido hallado aún en Argentina.

⁶ Si bien se han registrado casos de *N. ceranae* parasitando otras especies de *Apis* (Botías *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2010), aún no constan establecimientos fehacientes en las poblaciones de éstas.

⁷ Véase la sección **Discusión** para más detalles en la posición sistemática de este grupo.

***Bombus* spp.**

En base a los conocimientos acerca de la fauna parasitaria protista asociada al género *Bombus*, se conocen afecciones principalmente por *Nosema bombi* (Opisthokonta: Microspora) y en menor medida por el flagelado *Crithidia bombi* (Excavata: Kinetoplastea) y la neogregarina *Apicystis bombi* (Chromalveolata: Apicomplexa) (Lipa & Triggiani, 1988, 1996; McIvor & Malone, 1995; Schmid-Hempel & Loosli, 1998). Al momento, tampoco se han publicado aún datos relativos a Sudamérica ni a nuestro país.

Una sanidad óptima en estos polinizadores reviste gran importancia para sostener las poblaciones existentes tanto en la región Pampeana como en las demás regiones del país. La primera etapa hacia ese logro es obtener un conocimiento acabado con respecto a su situación sanitaria actual. En este sentido, los protistas son responsables de una serie de enfermedades que pueden tener impacto negativo tanto a nivel individual como colonial (Cantwell, 1974; Fries, 1988; Bailey & Ball, 1991). Dado que las enfermedades causadas por estos agentes suelen ser de tendencia crónica y debilitante, es frecuente que pasen desapercibidas, sean desestimadas o incorrectamente diagnosticadas y, en consecuencia, indebidamente tratadas (Anderson & May, 1981; Brooks, 1988; Lange, 1996; Hausmann *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

Hipótesis

- Evaluando los citados antecedentes, sumados a la capacidad de dispersión propia de los apoideos y a su traslado por vías antrópicas, especies de protistas patógenos aún no detectadas en el país estarían actuando sobre las poblaciones de estos insectos.
- Dada la afinidad filogenética entre los géneros *Apis* y *Bombus*, su comportamiento alimentario similar en sustratos comunes y la eficaz transmisión horizontal de la mayoría de los protistas entomopatógenos (Schmid-Hempel, 2001; Ruiz-González & Brown, 2006), existe la posibilidad de que uno o más de estos últimos actúen sobre especies de ambos géneros, y que introducciones o invasiones de apoideos no nativos puedan obrar como fuente de enfermedades previamente ausentes en el país.

Objetivos

En la presente tesis se propone como principal objetivo **obtener y analizar información cuali y cuantitativa referida a las enfermedades infecciosas de etiología protista que se encuentren afectando a los principales himenópteros polinizadores de la superfamilia Apoidea (*Apis mellifera* y *Bombus* spp.) en Argentina, con énfasis en la Región Pampeana.**

Como objetivos particulares se proponen:

- Detectar la presencia de protistas entomopatógenos en *Apis mellifera* y en especies de *Bombus*, tanto nativas como exóticas. Aislar los protistas detectados.
- Identificar los microparásitos detectados. Determinar la presencia/ausencia y los valores de prevalencia de cada uno de ellos. Realizar estudios de tipo observacional descriptivo.
- Explorar la factibilidad de que especies de *Bombus* actúen como reservorios de protistas entomopatógenos capaces de afectar a otras especies, en especial a *Apis mellifera*. Recíprocamente, evaluar la posibilidad de que protistas introducidos con *A. mellifera* o con otros apoideos alóctonos puedan estar afectando a apoideos nativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio

Límites

El presente estudio se realizó basado en colectas llevadas a cabo en la región Pampeana argentina, aunque también se presenta información relativa a muestreos realizados fuera de la misma, pero con especies que habitan o podrían estar habitando dentro de sus límites. Esta región incluye casi en su totalidad a la provincia de Buenos Aires, Sur de las provincias de Entre Ríos y Santa Fe, sudoeste de la provincia de Córdoba, y Este de la provincia de La Pampa (Fig. 9). Sus límites se establecieron aproximadamente entre los 30 y 39 grados de latitud Sur, denominándola **Provincia de La Pampa** (Morrone, 2001) o **Pampeana** (Cabrera, 1971).

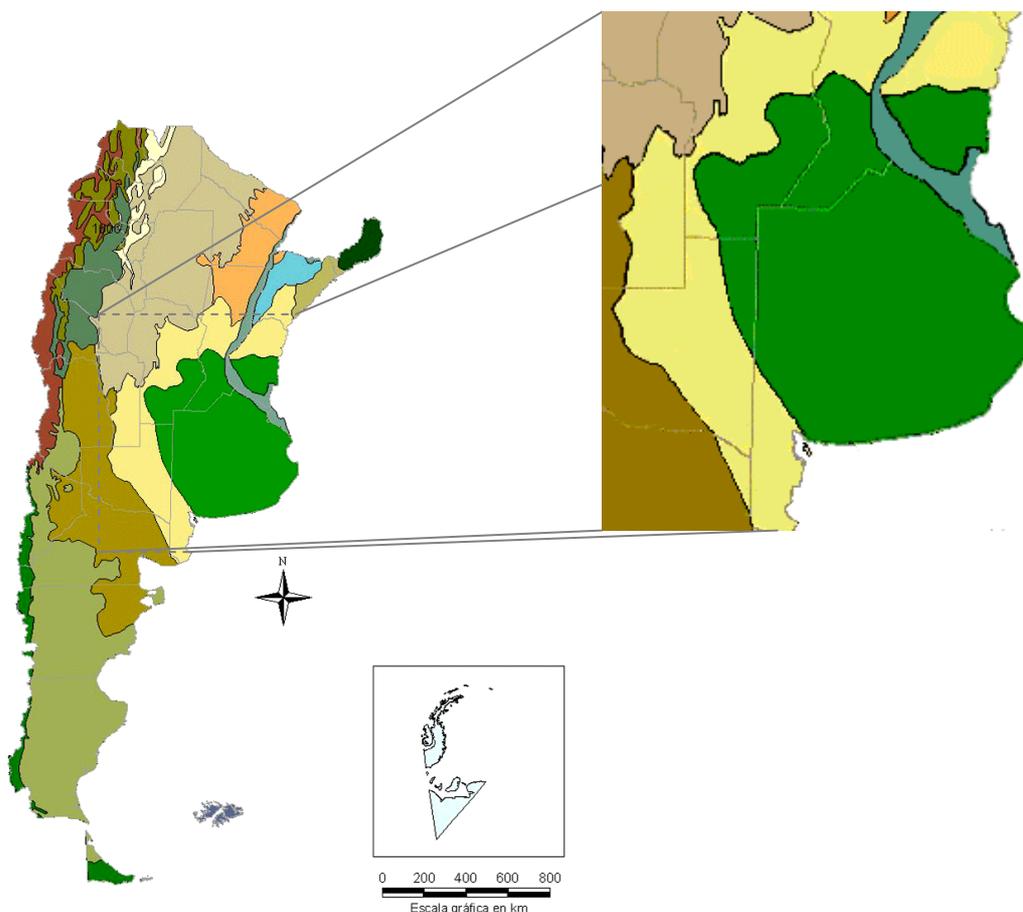


Figura 9 – Regiones geográficas de la República Argentina. En verde, la región Pampeana. (Adaptado de Cabrera, 1971)

Relieve

El relieve es llano o poco ondulado, excepto en sus dos sistemas serranos más importantes, Tandilia (524 msnm) y Ventania (1.239 msnm). Los ríos Salado, Samborombón, Matanza, Luján, Reconquista y otros, irrigan la provincia de Buenos Aires. Se asocian lagunas como Mar Chiquita, Chascomús, Alsina, Epecuén y Lobos (Frenguelli, 1950, 1956).

Clima

El clima es templado cálido con una temperatura media anual que oscila entre 13 y 17 °C, sin una época de lluvias definida. Las precipitaciones medias disminuyen desde 1.100 a 400 mm. anuales de Norte a Sur y de Este a Oeste, formando una marcada división entre pampa húmeda y pampa seca (S.M.N., 2007).

Flora

La comunidad vegetal preponderante es la estepa de gramíneas, dominando los géneros *Stipa*, *Piptochaetium*, *Aristida*, *Melica* y *Poa* (Cabrera, 1971). De todos modos la flora primitiva u original de esta región ha sido alterada o sustituida casi en su totalidad por cultivos de soja, girasol, alfalfa, maíz, trigo y otros, tornándola, excepto zonas menores, en un agroecosistema (Morrone, 2001; Murphy, 2008).

De este modo, la vegetación original sumada a la implantada hacen que la flora apícola (Pág. 14) presente en toda esta región se diversifique, y la descripción de la misma varíe dependiendo de las zonas en estudio. Sin embargo, generalizando, se mencionan las familias Fabaceae y Asteraceae, así como Myrtaceae, Salicaceae, Rosaceae, Brassicaceae, Oleaceae y Rutaceae como las más visitadas por *A. mellifera*. (Para mayor detalle en este aspecto véase Tellería, 1988, 1992, 1996; Screpis *et al.*,

1995; Valle *et al.*, 1995, 2000; Andrada *et al.*, 1998a, 1998b; Faye *et al.*, 2002; Fagúndez, 2003; Basualdo *et al.*, 2006).

Las familias florales visitadas por las diferentes especies nativas de *Bombus* en Argentina se detallan en los estudios de Abrahamovich *et al.* (2001, 2007). Especies de Asteraceae, Fabaceae y Solanaceae parecen ser las más utilizadas por estos insectos. Secundariamente, y dependiendo de la especie de *Bombus* en cuestión, se relacionan con las familias Myrtaceae, Lamiaceae, Bignoniaceae y otras en menor medida.

En lo que respecta a las especies de *Bombus* invasoras, se cita a las familias Fabaceae (especialmente), Alstromeriaceae, Rosaceae, Boraginaceae, Asteraceae e Hydrophyllaceae como las más frecuentadas por *B. ruderatus* (Goulson & Hanley, 2004; Abrahamovich *et al.*, 2007) y a Salicaceae, Asteraceae, Rosaceae, Ericaceae, Solanaceae y Convolvulaceae como las mejores opciones para *B. terrestris* (Aupinel *et al.*, 2001; Rasmont *et al.*, 2008). Sin embargo, existe consenso en que esta última especie exhibe un comportamiento altamente poliléctico, con lo cual es capaz de adecuar su forrajeo a la flora local y aumentar su capacidad de adaptación (Goulson & Hanley, 2004. Véanse también las páginas 23 y 24).

Obtención de muestras

Apis mellifera

Las colectas se realizaron en 37 localidades del país (n = 2.503 muestras), entre abril de 2006 y enero de 2010 (Figs. 11/12 - Tabla III) siguiendo técnicas clásicas de captura (L'Arrivée, 1963a; Fries, 1988). Las mismas se clasificaron en tres categorías dependiendo de su origen:

I) Muestras periódicas provenientes de apiarios

A fin de recabar datos de colmenares expuestos a las diferentes condiciones existentes en la región Pampeana, se dividió a la misma en 5 zonas denominadas **Noroeste, Noreste, Central, Sudoeste y Sudeste** (Fig. 10)⁸.

Se llevaron a cabo muestreos periódicos en 1 – 5 apiarios de cada zona. Los mismos se efectuaron con un intervalo de 30 (\pm 7) días (Doull, 1961; Martín-Hernández *et al.*, 2007) desde el 1º de mayo de 2006 hasta el 1º de marzo de 2009, conformando tres temporadas de muestreo (1º de mayo de 2006 a 1º de febrero de 2007; 1º de abril de 2007 a 1º de febrero de 2008; 1º de abril de 2008 a 1º de marzo de 2009).

De cada zona se escogieron 10 - 15 colmenas⁹ afectadas por diferentes condiciones (*e.g.*: orientación, horas de sombra, ubicación en el colmenar, grado de exposición a los vientos predominantes, etc.) distribuidas en él o los apiarios⁸ elegidos. Cada colmena fue marcada a principios de la temporada y no fue reemplazada, movida, ni medicada durante la misma. Las colmenas elegidas recibieron igual manejo en los demás aspectos productivos que las restantes colonias del o los apiarios.

⁸ Véase el **Apéndice II** para información detallada de cada uno de los colmenares monitoreados.

⁹ Los términos **colmena** y **colonia** se utilizarán en forma indistinta en el presente estudio, así como **apiario** y **colmenar**.

Cada muestra de este tipo [$n = 2.409$ (ca. 385.440 abejas)] constó de 150 - 200 abejas adultas provenientes de una colmena, y obtenidas de la parte interna superior de la misma (Moeller, 1956; Langridge, 1961; Fries, 1988)¹⁰ (Fig. 12).

Excepto en la última temporada, no se tomaron muestras a principios del mes de marzo, lapso utilizado para seleccionar los colmenares a monitorear en la siguiente temporada, el cual coincide con el período apícola de “post-cosecha” empleado por los apicultores para medicar y reorganizar sus colonias (Root, 1990).

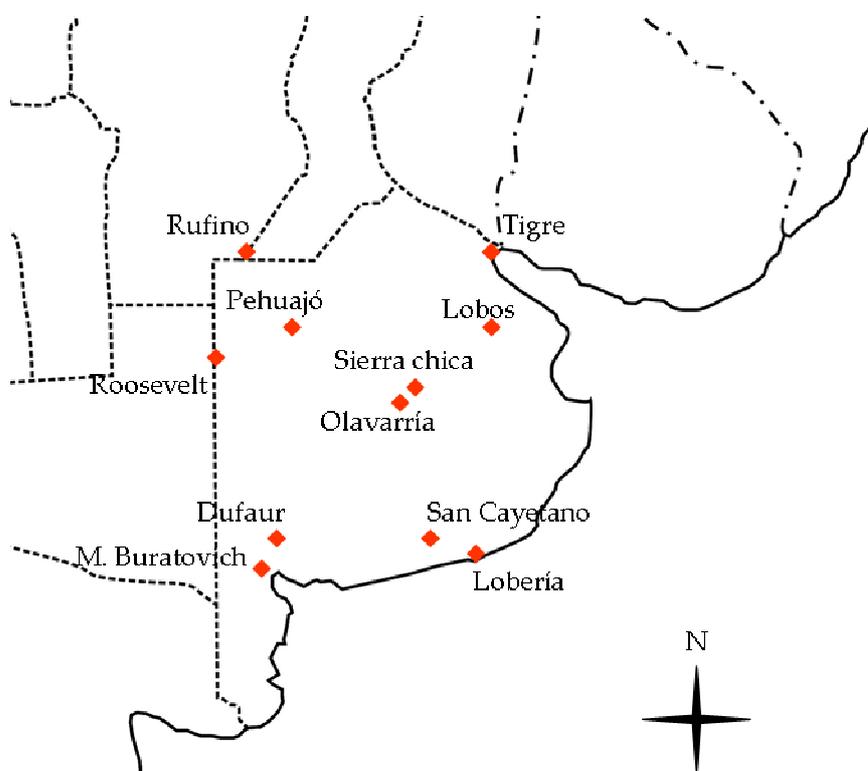


Figura 10 – Región Pampeana. Localidades con apiarios monitoreados periódicamente.

¹⁰ Algunos autores han analizado diferencias relacionadas con la detección de esporos de *Nosema* dependiendo del lugar donde sea tomada la muestra. Los niveles de infección serían mayores si ésta se obtiene en la entrada de la colmena (**piquera**) colectando solo abejas obreras que retornan de su pecoreo (L'Arrivée, 1963a, b; Sarlo *et al.*, 2005 y otros). En estudios de monitoreo a largo plazo, el escaso o nulo vuelo que tendrían estas obreras en épocas de baja temperatura obligarían a retirar la muestra desde otro sitio en una o más oportunidades pudiendo generar un sesgo en los datos (Jaycox, 1960; Fingler *et al.*, 1982). Como el porcentaje de abejas infectadas [parámetro que brinda mayor información sobre el estado sanitario de la colmena (Martín-Hernández *et al.*, 2009b)] no sufriría una variación significativa (Gajda, 2009), y el estudio no se limita a la nosemosis, la metodología detallada en esta tesis asegura una homogeneidad en la toma de muestras y evalúa sistemáticamente todo el espectro poblacional de la colonia (Razmarai & Karimi, 2010).

Zona Noreste: Se colectaron muestras de las localidades de Tigre y de Lobos. En ésta última localidad, se tomaron muestras las dos primeras temporadas, no así en la última.

Zona Noroeste: Fueron monitoreados apiarios de 3 localidades diferentes en sendas temporadas [Roosevelt (2006-07), Pehuajó (2007-08) y Rufino (2008-09)]. Desafortunadamente, eventos ajenos al estudio¹¹ impidieron la toma de muestras en las dos últimas temporadas tanto en Pehuajó como en Rufino, de modo que esta zona fue excluida del análisis correspondiente a los períodos citados.

Zona Central: Se monitorearon apiarios en el partido de Olavarría durante las tres temporadas, y en Sierra Chica en la temporada 2006-07.

Zona Sudeste: Se analizaron datos tomados en Necochea (primera temporada) y en San Cayetano, las dos temporadas restantes.

Zona Sudoeste: Se registraron datos de las localidades de Dufaur (partido de Saavedra) durante las dos primeras temporadas y de Mayor Buratovich (partido de Villarino) durante la última de ellas.

II) Muestras aperiódicas provenientes de apiarios

Adicionalmente se analizaron y registraron muestras provenientes de colmenas con algún tipo de sintomatología inespecífica [n = 90 (14.400 abejas)]. Las mismas provinieron de diferentes localidades y fueron colectadas con idéntica metodología, pero sin monitoreo.

¹¹ A mediados de julio de 2007 se registró el paso de un viento huracanado en Pehuajó, el cual arrastró las colmenas a monitorear. En agosto de 2008 una serie de incendios rurales consumieron numerosas hectáreas en Rufino, incluyendo los apiarios analizados.

III) Muestras de abejas pecoreadoras

Fueron colectadas abejas pecoreadoras de diferentes localidades. Cada muestra de este tipo [n = 4 (160 abejas)] constó de no menos de 25 abejas (Jaycox, 1960; L'Arrivée, 1963b; Fingler *et al.*, 1982) de origen desconocido capturadas en un radio no mayor a 3 Km.

El traslado de las muestras hasta el laboratorio se realizó en etanol 70° o bien se transportaron los insectos vivos en viales cilíndricos de acetato traslúcido (largo: 20 cm.; diámetro: 5 cm.) con extremos perforados.

Bombus spp.

Los muestreos de abejorros se llevaron a cabo desde el inicio de la primavera hasta mediados del otoño, durante los períodos 2005-06, 2006-07, 2007-08 y 2008-09.

Se colectaron un total de 581 insectos de este género, de siete especies diferentes. Sus localidades de procedencia (29) pertenecieron a 11 provincias y a la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Las mismas se muestran en la figura 11 y se detallan en la tabla IV.

Los insectos se colectaron individualmente mediante redes entomológicas o con viales cilíndricos de acetato traslúcido (largo: 20 cm.; diámetro: 5 cm.) con extremos perforados (Lipa & Triggiani, 1996) (Fig. 12).

Conservación e identificación de los especímenes.

Todos los insectos colectados fueron conservados en etanol 70°, exceptuando los capturados vivos, que fueron congelados (- 32 °C). La posterior identificación se

realizó mediante claves (Abrahamovich *et al.*, 2005, 2007; Fernández & Sharkey, 2006; Roig-Alsina, 2008).

PROVINCIA	LOCALIDAD	ORIGEN	N
-	Ciudad Autónoma de Buenos Aires	III	1
Buenos Aires	Colonia hinojo	II	2
	Coronel Suárez	III	1
	Ingeniero Maschwitz	II	14
	La Plata	II	2
	Lobería	I	105
	Lobos	I, II	334
	Mayor Buratovich	I	187
	Olavarría	I	491
	Pehuajó	I	45
	Ranchos	III	1
	Rivadavia	I	140
	Saavedra	I	260
	Saladillo	II	3
	San Cayetano	I	323
	Sierra chica	I	100
	Tigre	I	370
Córdoba	Cruz alta	II	4
	General Roca	II	2
	Las varillas	II	2
	Los surgentes	II	2
	Tortugas	II	2
Corrientes	Paso de los libres	II	9
Entre ríos	Federación	II	6
La Pampa	Macachín	II	6
	Santa Rosa	II	3
Río negro	General Conesa	II	6
	San Carlos de Bariloche	III	1
Santa fe	Armstrong	II	2
	Esperanza	II	2
	Humboldt	II	1
	Rufino	I	64
	Villa Eloísa	II	2
Santiago del Estero	La higuera	II	3
	San Pedro	II	3
	Santo Domingo	II	2
	Villa Robles	II	2

Tabla III – Localidades de colecta de *Apis mellifera* (Abril 2006 – Enero 2010). La columna **ORIGEN** detalla el tipo de muestra tomada en cada caso: (I) Muestras periódicas provenientes de apiarios; (II) Muestras aperiódicas provenientes de apiarios; (III) Muestras de abejas pecoreadoras. La columna **N** indica el número de las mismas.

PROVINCIA	LOCALIDAD	ESPECIES COLECTADAS	n
-	Ciudad Autónoma de Buenos Aires	<i>B. atratus</i>	2
Buenos Aires	Gral. Madariaga	<i>B. bellicosus</i>	1
	Isla Martín García	<i>B. atratus</i>	1
	La Plata	<i>B. atratus</i>	110
		<i>B. morio</i>	2
		<i>B. bellicosus</i>	6
	Lobos	<i>B. atratus</i>	8
	San Miguel	<i>B. atratus</i>	42
		<i>B. bellicosus</i>	3
Tigre	<i>B. atratus</i>	2	
Córdoba	Cerro blanco	<i>B. opifex</i>	1
	La Falda	<i>B. atratus</i>	1
		<i>B. bellicosus</i>	1
	Santa Rosa de Calamuchita	<i>B. atratus</i>	4
<i>B. bellicosus</i>		5	
Corrientes	P. N. Mburucuyá	<i>B. morio</i>	3
Entre Ríos	Victoria	<i>B. atratus</i>	1
Jujuy	Calilegua	<i>B. atratus</i>	15
		<i>B. morio</i>	4
	El Carmen	<i>B. atratus</i>	4
		<i>B. morio</i>	2
La Rioja	Anillaco	<i>B. atratus</i>	2
Misiones	Montecarlo	<i>B. morio</i>	1
Río Negro	Bariloche	<i>B. dahlbomii</i>	1
		<i>B. terrestris</i>	114
Salta	Rosario de la frontera	<i>B. atratus</i>	4
	Las viñas	<i>B. morio</i>	1
	Yatasto	<i>B. atratus</i>	6
		<i>B. morio</i>	1
San Luis	Merlo	<i>B. atratus</i>	51
		<i>B. bellicosus</i>	7
		<i>B. opifex</i>	6
Tucumán	Famaillá	<i>B. atratus</i>	14
		<i>B. morio</i>	4
	Horco molle	<i>B. atratus</i>	5
	La reducción	<i>B. atratus</i>	27
		<i>B. morio</i>	9
	Manantial	<i>B. atratus</i>	15
		<i>B. morio</i>	4
	Racó	<i>B. morio</i>	4
	San Javier	<i>B. atratus</i>	12
		<i>B. tucumanus</i>	2
	Siambón	<i>B. opifex</i>	1
	Tafí viejo		<i>B. atratus</i>
<i>B. morio</i>			10
<i>B. opifex</i>			1
<i>B. tucumanus</i>			4

Tabla IV – Localidades de colecta de *Bombus* spp. (Septiembre 2005 – Junio 2009). La columna **n** indica el número de individuos colectados.

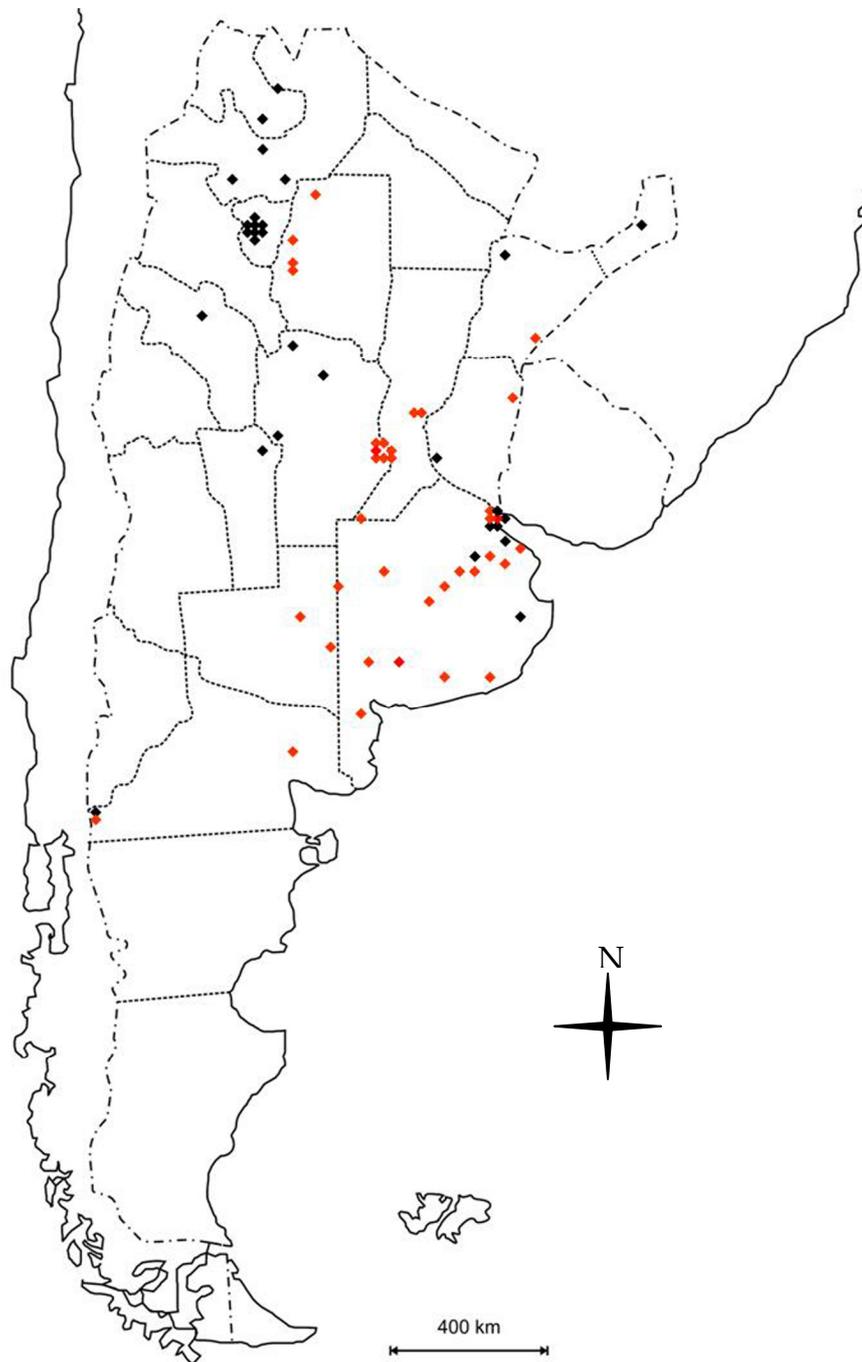


Figura 11 – Sitios de colecta en Argentina. (♦) Muestras de *Apis mellifera*. (◆) Muestras de *Bombus* spp.

Análisis de laboratorio

Procesamiento y microscopía óptica

Apis mellifera

Estimación de prevalencias: Para la detección de los protistas y estimación de sus prevalencias se empleó la técnica de homogenización individual de insectos enteros en 2 ml. de agua bidestilada y observación de alícuotas de los homogenatos resultantes con microscopía de contraste de fases x400 ó x1000 (Fries, 1993; Lange & Henry, 1996; Undeen & Vávra, 1997; Topolska & Hartwig, 2005). Paralelamente se utilizaron diferentes técnicas de disección y examen de tejidos y órganos (Chapman, 1971; Cornejo & Rossi, 1974; Larsson, 2007) (Fig. 12).

Se analizaron 100 individuos por muestra, considerándose positiva a la misma si al menos una abeja presentaba microparásitos. En todos los casos, las prevalencias se indican en porcentajes (%) [Se indica \pm error standard (ES) de ser necesario].

Los patógenos hallados se midieron con un micrómetro ocular [las medidas se indican como promedio en micras (μ) \pm ES y rango] y se fotografiaron bajo microscopía de contraste de fases a partir de preparaciones frescas con solución salina (Poinar & Thomas, 1984). Ante la presencia de protistas esporogénicos, se evaluó su naturaleza induciendo la extrusión del filamento polar de los esporos mediante soluciones salinas [buffer de pH 7,4 o solución de hidróxido de potasio al 10% (KOH)] y/o tratamientos de hidratación/deshidratación (Keeling & Fast, 2002; Bath & Nataraju, 2007).

Cálculo de cargas parasitarias: La estimación de las cargas parasitarias se realizó mediante conteos en cámara de Neubauer en forma individual, según Undeen & Vávra (1997). Dichos valores se expresan como carga promedio de patógenos \pm ES y rango.

Para la cuantificación de microsporidios en muestras periódicas provenientes de apiarios, se utilizó una técnica compuesta (L'Arrivée, 1963b; Fries, 1988), homogenizando 60 ejemplares en 60 mililitros de agua bidestilada y obteniéndose, mediante conteos en cámaras de Neubauer, el número de esporos por mililitro de suspensión (Cantwell, 1970; Fries, 1988; Undeen & Vávra, 1997). Convencionalmente, el valor obtenido se expresa como **número medio de esporos/abeja** (Cantwell, 1970; Fingler *et al.*, 1982; Fries, 1988). Esta interpretación resulta correcta en caso de que todas las abejas procesadas (60) se encuentren infectadas, siendo apropiada en ensayos experimentales cuando el total de los insectos han sido inoculados y se conoce previamente que la prevalencia es de 100% (*e.g.*: Paxton *et al.*, 2007). En caso contrario, unas pocas abejas con infecciones de gran desarrollo podrían brindar los mismos valores que muchas abejas con infecciones leves (Fries, 1988).

En estudios de campo, al desconocerse la prevalencia, esta interpretación de los resultados ayuda a brindar rápidamente una imagen orientativa del estado general de la colmena analizada (Doull, 1965), pero su acepción sería la mayoría de las veces, incorrecta y debería adoptarse la expresión de **esporos/ml**.

Por lo tanto, en el presente trabajo se aplicó la siguiente fórmula

$$\text{Carga media de esporos/abeja} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de esporos /ml.}) \times (60 \text{ ml.})}{(\text{prevalencia} [\text{n}^\circ \text{ de abejas infectadas en 60]})}$$

la cual calcula las cargas medias de patógenos o número de esporos por abeja [**esporos/abeja**], una vez que se conoce la prevalencia de la infección (Véase Moeller, 1956; Jaycox, 1960; Kauko *et al.*, 2002).

Bombus spp.

En el caso de los abejorros, cada ejemplar se analizó en forma individual, disecándose ventralmente bajo lupa estereoscópica. En primer lugar se retiraron

uno o dos esternitos abdominales y se tomaron muestras de tejido graso, muscular, epidérmico y traqueolas, mediante raspado. Se añadió una gota de solución salina (Poinar & Thomas, 1984) y se examinó el preparado en fresco con microscopio (x400, x1000) antes de proseguir con la prospección de los órganos internos. Luego se removieron los túbulos de Malpighi y se procedió de igual forma. Por último se examinaron las distintas porciones del tubo digestivo (Gillott, 2005; Larsson, 2007). En ocasiones se recurrió a técnicas de tinción Giemsa (Wang *et al.*, 1991; Undeen & Vávra, 1997).

Luego de la evaluación por disección, en caso de resultado negativo, los restos de cada espécimen fueron homogeneizados en 2 ml. de agua bidestilada y examinados nuevamente al microscopio.

En ocasiones en las que se hallaron formas parasitarias, tanto la medición de las mismas y su fotografiado como la cuantificación de la infección, se realizaron según lo descrito para *A. mellifera*.

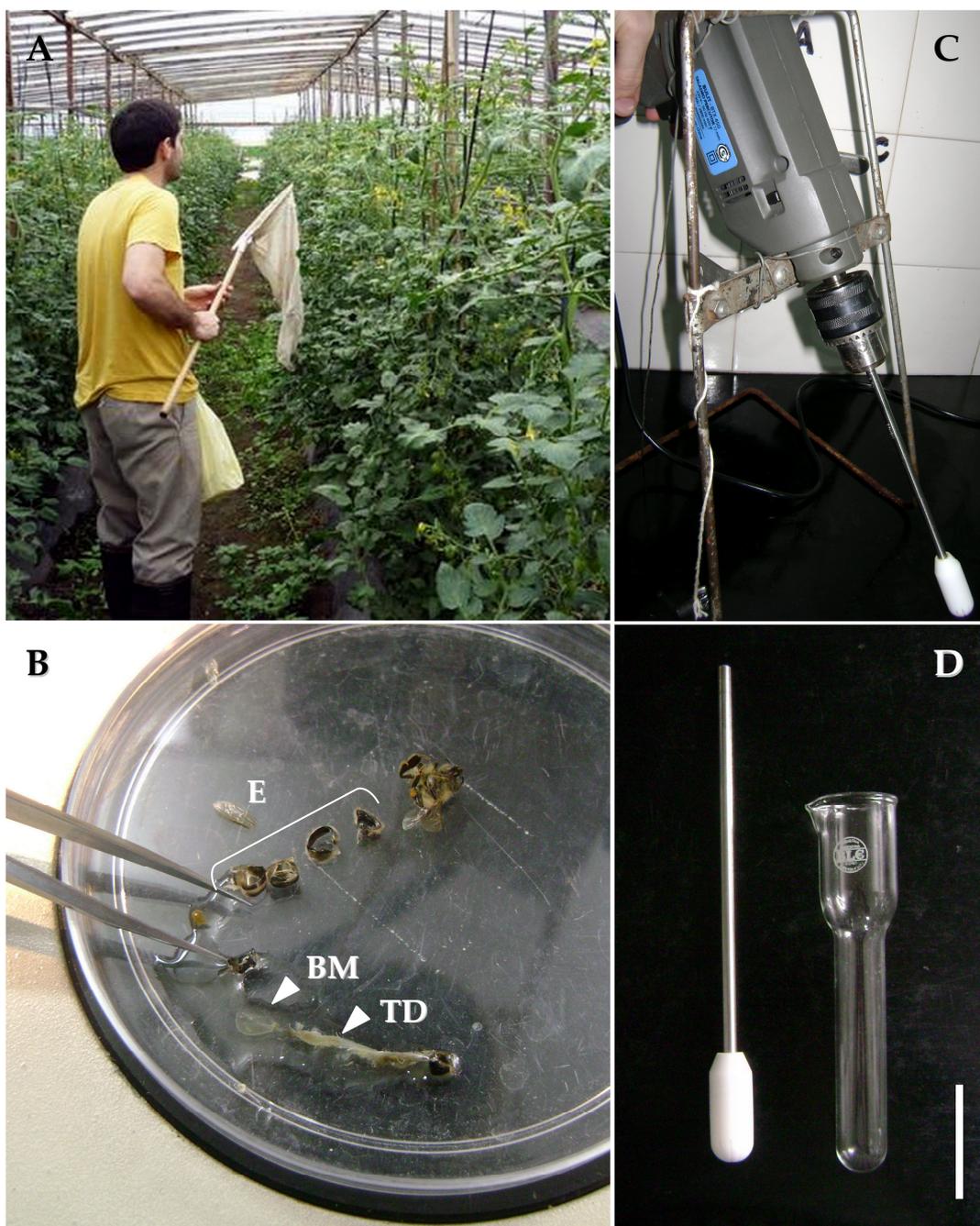


Figura 12 – Métodos de colecta y procesamiento de material. A) Muestreo de *Bombus* en cultivo de tomate bajo cubierta. B) Disección de *Apis mellifera* [E: Escleritos metasomales; BM: Buche melario; TD: Tubo digestivo medio y posterior con sus anexos]. C) Homogenizador. D) Vara homogenizadora (pilón) de teflón y tubo de homogenizado (Escala = 5 cm).

Análisis moleculares

Los análisis moleculares se llevaron a cabo en un marco cooperativo con el Laboratorio de Patología Apícola del Centro Apícola de Marchamalo, Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha, España, dirigido por el Dr. Mariano Higes-Pascual.

Aislamiento de esporos

Se aislaron 20 muestras de microsporidios a partir de *A. mellifera* (obreras) provenientes de 15 localidades distribuidas en seis provincias: 13 muestras de Buenos Aires [(Saavedra (3), Lobos (3), Pehuajó (2), Sierra Chica (1), Olavarría (1), La Plata (1), Tigre (1) y San Cayetano (1)]; dos muestras de Córdoba [(Cruz Alta (1), General Roca (1)]; dos de Santa Fe [(Armstrong (1), Villa Eloísa (1)]; una de Río Negro (General Conesa); una de Entre Ríos (Federación); una de Corrientes (Paso de los libres) (Fig. 15). También se aislaron 51 muestras de microsporidios a partir de diferentes especies de *Bombus*, pertenecientes a cuatro diferentes provincias: 33 muestras de Buenos Aires [(San Miguel (23), La Plata (9) y Lobos (1)]; diez de Tucumán [(La Reducción (5), Famaillá (3), El manantial (1) y Tafí viejo (1)]; seis de Jujuy (Calilegua); dos de San Luis (Villa de Merlo). Las castas analizadas se detallan en la figura 19.

Una vez obtenidas las suspensiones esporales mediante homogenización de tejidos infectados en agua bidestilada, se procedió a purificarlas mediante tres centrifugaciones (15 min. a 2.200 g) alternadas con filtrados (Lange & Henry, 1996; Undeen & Vávra, 1997). Posteriormente, y hasta la realización de los análisis moleculares, 2 ml. de cada una de ellas se conservaron en viales plásticos estériles a -32° C.

Se realizó en todos los casos un análisis adicional al microscopio de contraste de fases a fin de observar la refringencia de los esporos, característica indicadora de la viabilidad de los mismos (Bhat & Nataraju, 2007; Sokolova *et al.*, 2008).

Obtención del material genético.

Para la obtención del material genético, 400 µl. de cada una de las suspensiones purificadas fueron colocadas en viales estériles *ad-hoc* junto a esferas cerámicas *MagNA Lyser Green Beads* (Roche 03 358 941 001). Se procesaron en un *bead-beater Lyser Magna* (Roche) a 9.500 RPM durante 95 segundos, a fin de destruir los esporos y el ADN presente fue extraído mediante un kit de aislamiento *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I* (Roche 037 730 964 001) en un equipo *MagNA Pure Compact* (Roche).

Diseño de primers

En el análisis de esporos aislados a partir de *Bombus*, para descartar o confirmar la presencia de *Nosema bombi*, única especie de microsporidio citada al momento para este género (Schmid-Hempel, 2001; Larsson, 2007), debieron diseñarse los *primers* específicos BOMBICAR (Plischuk *et al.*, 2009).

Se optó por la búsqueda y amplificación de un locus del gen 16S que codifica la subunidad pequeña de ARN ribosomal (SSU-rRNA) de *N. bombi*, debido a que estas secuencias son considerablemente conservadas en cada especie (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Fueron seleccionadas 62 secuencias depositadas previamente en los registros del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI GenBank). Se exceptuaron aquellas que contenían un alto número de ambigüedades. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) a fin de identificar las posiciones polimórficas

(SNP's). Luego se obtuvo una secuencia de consenso para *N. bombi* y posteriormente fueron diseñados *primers* específicos para esta especie.

Para el diseño de los mismos se tuvo en cuenta que las secuencias a amplificar fueran de diferente longitud que las de *N. apis* [321 pares de bases (p.b.)] y *N. ceranae* (218 p.b.), a fin de ejecutar las tres amplificaciones en un solo proceso (*Triplex-PCR*) y poder separarlas por electroforesis en gel de agarosa. Además, la secuencia de los *primers* debía ser la adecuada para alinearse con el ADN buscado a la misma temperatura que los correspondientes a *N. apis* y *N. ceranae* ($\cong 61^\circ \text{C}$). Por último, se optó por los *primers* que produjesen una secuencia de ADN breve, a fin de aumentar la probabilidad de una amplificación exitosa en muestras mal conservadas.

BombiCAR-F 5'-GGCCCATGCATGTTTTGAAGATTATTAT-3' y BombiCAR-R '5'-CTACACTTAAACGTAGTTATCTGCGG-3' fueron los *primers* seleccionados, con un tamaño de amplicón esperado de 101 p.b. Para corroborar la especificidad con *N. bombi* de la secuencia a generar se obtuvo una correspondencia específica casi exacta utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Por último, una vez que se comprobó la correcta hibridación y especificidad de los *primers*, se estableció una temperatura óptima de alineamiento de $58,1^\circ \text{C}$.

Amplificación

En el caso de muestras aisladas de *A. mellifera*, luego de obtenido el material genético, se utilizó la técnica de amplificación de tipo *Duplex-PCR*, recomendada por la O.I.E. (2008) para este tipo de exámenes debido a su sensibilidad y especificidad. Se utilizaron los *primers* 321APIS y 218MITOC para la determinación de *N. apis* y *N. ceranae*, respectivamente (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2007, 2008b).

La técnica utilizada en el análisis de las muestras aisladas de *Bombus* spp. fue de tipo *Triplex-PCR* (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008b), utilizando los *primers* 321APIS, 218MITOC y BOMBICAR para la determinación de *N. apis*, *N. ceranae* y *N. bombi*, respectivamente (Plischuk *et al.*, 2009).

Todas las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un *Mastercycler® ep gradient S* (Eppendorf) en volúmenes de 50 µl., utilizando una mezcla de reactivos *High Fidelity PCR Master* (Nº 12140314001 Roche Diagnostic), 0,4 µM de cada *primer*, 0,2 mg. / ml. de BSA, 0,1% Triton X-100 y 5 µl. de la suspensión con el material genético en estudio.

Electroforesis y secuenciación

Para la visualización de los resultados, los análisis de tipo electroforético se llevaron a cabo en geles de agarosa 1,5% TAE con 0,01% de reactivo SYBR Gold (*Invitrogen*), y revelados utilizando iluminación ultravioleta. Fueron utilizados controles negativos, así como controles positivos de *N. apis* y *N. ceranae* en muestras provenientes de *A. mellifera*, y de *N. apis*, *N. ceranae* y *N. bombi* en las provenientes de *Bombus*.

El ADN amplificado por PCR fue purificado mediante un *Qiaquick PCR Purification Kit* (Nº 28104 Qiagen) y secuenciado con un *3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystem*). Las secuencias de consenso obtenidas para las muestras positivas fueron depositadas en el banco de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI GenBank).

RESULTADOS

Nosema ceranae / *Nosema apis* (Microsporidia)

Microscopia óptica

El análisis al microscopio óptico de las muestras de *A. mellifera* permitió observar tanto formas vegetativas (merontes) como cuerpos de transmisión resistentes (esporos) correspondientes a microsporidios (Figs. 16/17).

La ubicación de estos microsporidios solo en el ventrículo¹² y en el recto así como la morfología ovoide y refringencia de sus esporos, se correspondieron en todos los casos con características propias del género *Nosema* (Fries, 1988; Fries *et al.*, 1996). No se hallaron esporos infectando a otros tejidos.

En ocasiones, los ventrículos afectados presentaron aspecto blanquecino, frágil y con su estriación desdibujada.

En lo que respecta a *Bombus*, en 56 individuos de tres especies diferentes (*B. atratus*, *B. morio* y *B. bellicosus*) también se detectaron formas refringentes cuya morfología correspondía a esporos de microsporidios.

La ubicación de los patógenos fue el tubo digestivo medio y el recto. El primero presentó aspecto flácido y estriación característica disminuida. No se hallaron esporos en los túbulos de Malpighi ni en el cuerpo graso. En algunos casos se detectaron formas vegetativas con núcleos diplocariontes. No se registraron infecciones mixtas con otro protista (Fig. 32).

La morfología de los esporos hallados coincidió en todos los casos con la de los aislados a partir de *A. mellifera*.

¹² En abejas y otros insectos se denomina **ventrículo** a la porción media del tubo digestivo, donde se llevan a cabo los procesos de absorción de nutrientes (Gillott, 2005; Jean-Prost *et al.*, 2007).

Análisis molecular

Luego de completar el análisis molecular, se identificó un amplicón de 218 p.b. correspondiente con los patrones de *N. ceranae* en todas las muestras obtenidas a partir de *A. mellifera*, mientras que ninguna de ellos coincidió con los patrones de *N. apis*. La secuencia de consenso obtenida (1.171 p. b.) correspondiente a parte del gen 16sSSU-rRNA fue depositada en la base de datos NCBI GenBank bajo el código de acceso EU025027 (Fig. 13).

De igual forma, también se confirmó la presencia del microsporidio *N. ceranae* en 49 de las muestras de *Bombus* analizadas (Fig. 19 – Tabla V). La secuencia de consenso obtenida (211 p. b.) fue depositada en el GenBank NCBI con el código de acceso FJ227957 (Fig. 14). No fueron detectados amplicones correspondientes a *N. apis* ni a *N. bombi* en ninguna de las muestras aisladas de *Bombus* spp. (Fig. 18).

```

1 taacccatgc atgtttttga catttgaaaa atggactgct cagtaatact cactttattt
61 tatgtaaatt ttttaattaac taccttcaag ttagataag atgtttacag taagagtggag
121 acctatcagc tagttgtaa ggtaatggct taacaaggct gtgacgggta acggtattac
181 tttgtaatat tccggagaag gaggctgaga gacggctact aagtctaagg attgcagcag
241 gggcgaaact tgacctatgg attttatctg aggcagttat gggaaagtaatt attatattgt
301 ttcataatgtt aaaagtatat gaggtgatta attggagggc aaatcaagtg ccagcagccg
361 cgtaataact tgtccaaga gtgtgatga tgattgatgc agttaaaaag tccgtagttt
421 atttttttta gaagcaatat gaggggtact gtatagttgg gagaaagatg aaatgtgacg
481 acctgactg gacgaacaga agcgaagact gtacacttgt atgtattttt tgaacaagga
541 cgtaagctgg aggagcgaag atgattagat accattgtag ttccagcagt aaactatgcc
601 gacgatgtga tatggaaaat attaatattgt attacataat agaaatttga gttttttggc
661 tctggggata gtatgatcgc aagattgaaa attaaagaaa ttgacggaag aataaccacaa
721 ggagtggatt gtgcgctta atttgactca acgcgaggta acttaccaat attttattat
781 tttgagagaa cggttttttg tttgagaatg ataatagtgg tgcattggccg ttttcaatgg
841 atgctgtgaa gttttgatta atttcaacaa gacgtgagac cttatttttt tattaaagac
901 agacacaatc agttaggaa ggaaggatt aaaacaggtc cgttatgccc tctgacattt
961 tgggctgcac gcgcaatata atagatatat aatctttatg ggataatatt ttgtaagaga
1021 tatttgaact tgaattgct agtaaatttt attaaataag tagaattgaa tgtgtccctg
1081 ttctttgtac acaccgccc tgcctatcta agatgatata tgtttgaaa ttagtgaaaa
1141 ctacttaaac aatatgtatt agatctgata t

```

Figura 13 - Secuencia parcial (1.171 p.b.) del gen 16sSSU-RNAr de *Nosema ceranae* aislado de *Apis mellifera* de Argentina. Código de acceso NCBI: EU025027.

```

1 cgacgatgtg atatgaaaat attaatattgt attacataat agaaatttga gttttttggc
61 tctggggata gtatgatcgc aagattgaaa attaaagaaa ttgacggaag aataaccacaa
121 ggagtggatt gtgcgctta atttgactca acgcgaggta acttaccaat attttattat
181 tttgagagaa cggttttttg tttgagaatg a

```

Figura 14 - Secuencia parcial (211 p.b.) del gen 16sSSU-RNAr de *Nosema ceranae* aislado de *Bombus* spp. de Argentina. Código de acceso NCBI: FJ227957.

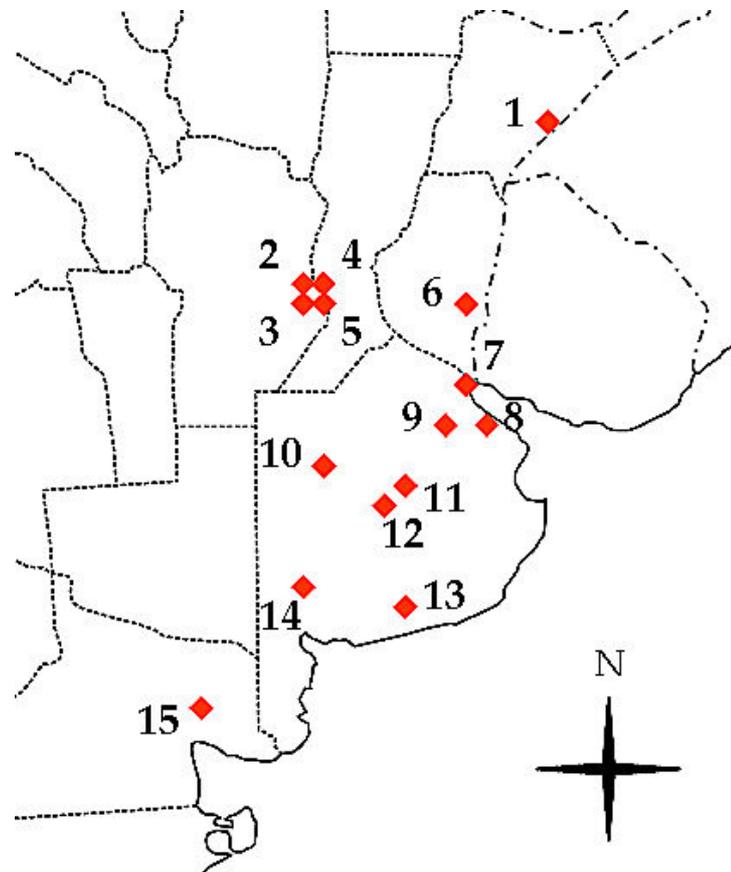


Figura 15 – Localidades con casos de *Nosema ceranae* en *Apis mellifera* de Argentina. 1: Paso de los libres; 2: General Roca; 3: Cruz Alta; 4: Armstrong; 5: Villa Eloísa; 6: Federación; 7: Tigre; 8: La Plata; 9: Lobos; 10: Pehuajó; 11: Sierra Chica; 12: Olavarría; 13: San Cayetano; 14: Saavedra; 15: General Conesa.

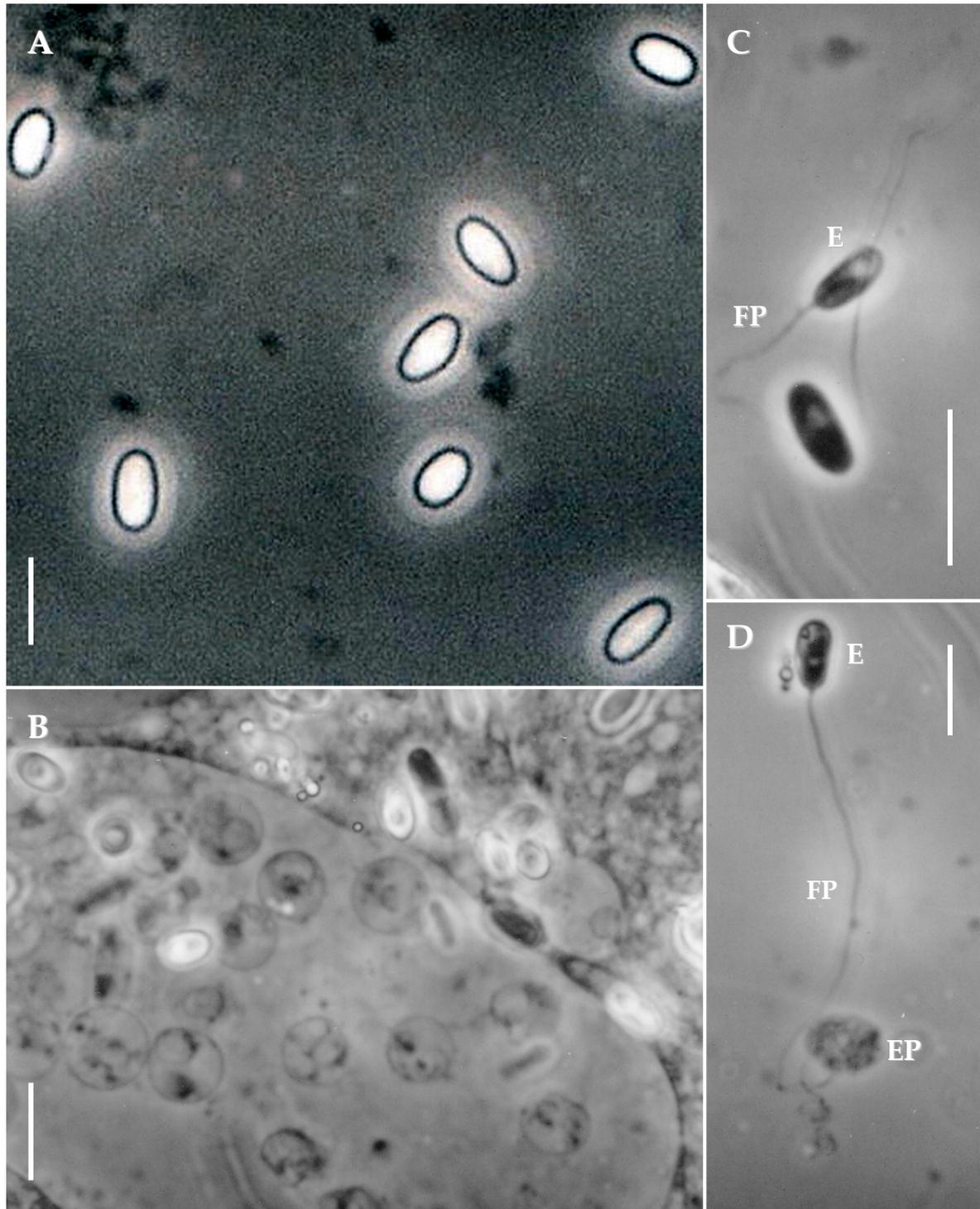


Figura 16 – Fotomicrografías (contraste de fases) de *Nosema ceranae* realizadas a partir de preparados frescos (solución salina) de tubo digestivo de *A. mellifera* A) Esporos maduros. B) Enterocito conteniendo diferentes estados de desarrollo del patógeno. C) y D) Extrusión del filamento polar [E: Esporo; FP: Filamento polar; EP: Esporoplasma] (Escala = 5 μ)

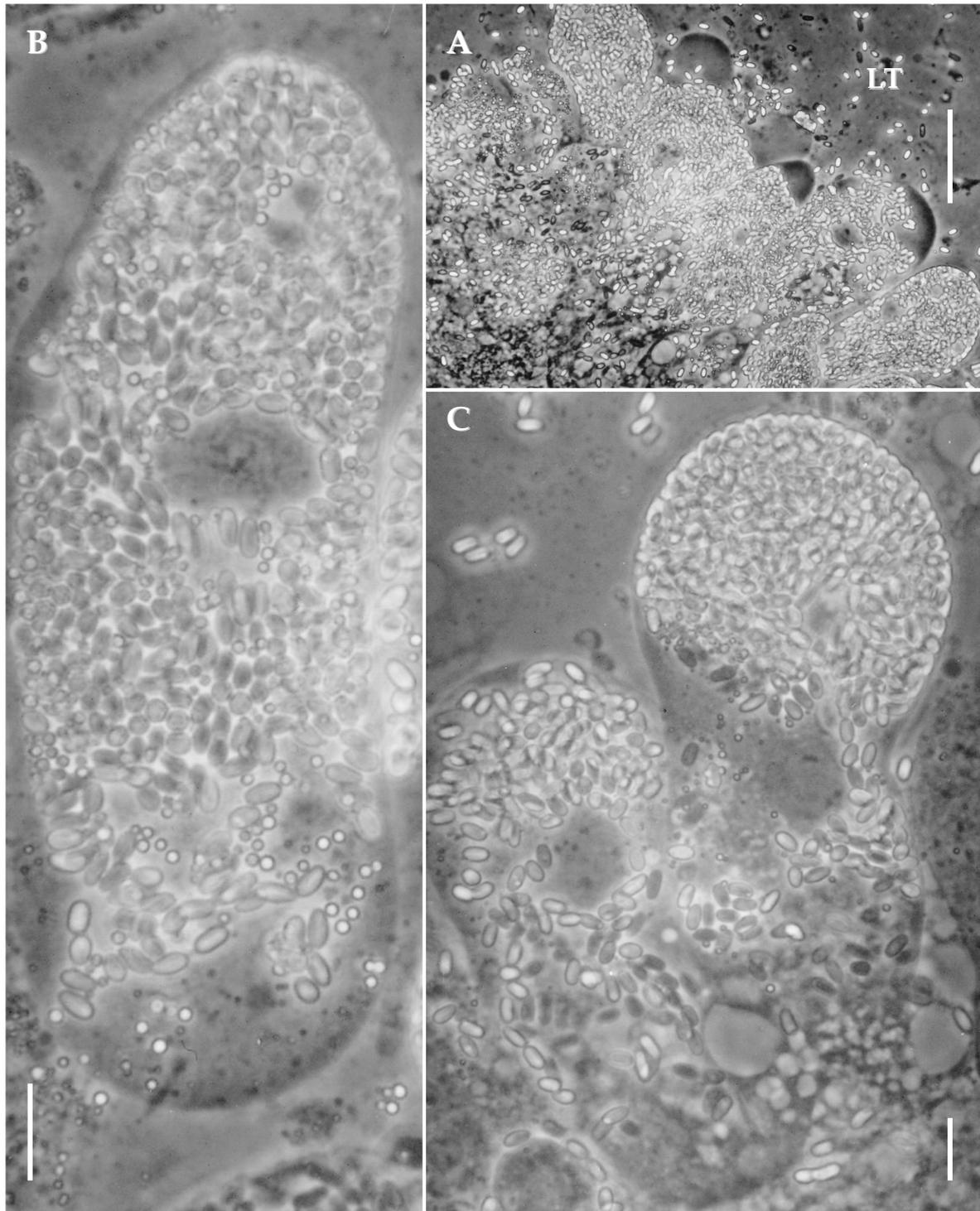


Figura 17 – Fotomicrografías (contraste de fases) de *Nosema ceranae* realizadas a partir de preparados frescos (solución salina) de tubo digestivo de *A. mellifera*. A) Epitelio intestinal infectado [LT: Luz del tubo digestivo] (Escala = 50 μ). B) y C) Enterocitos infectados (Escala = 10 μ).

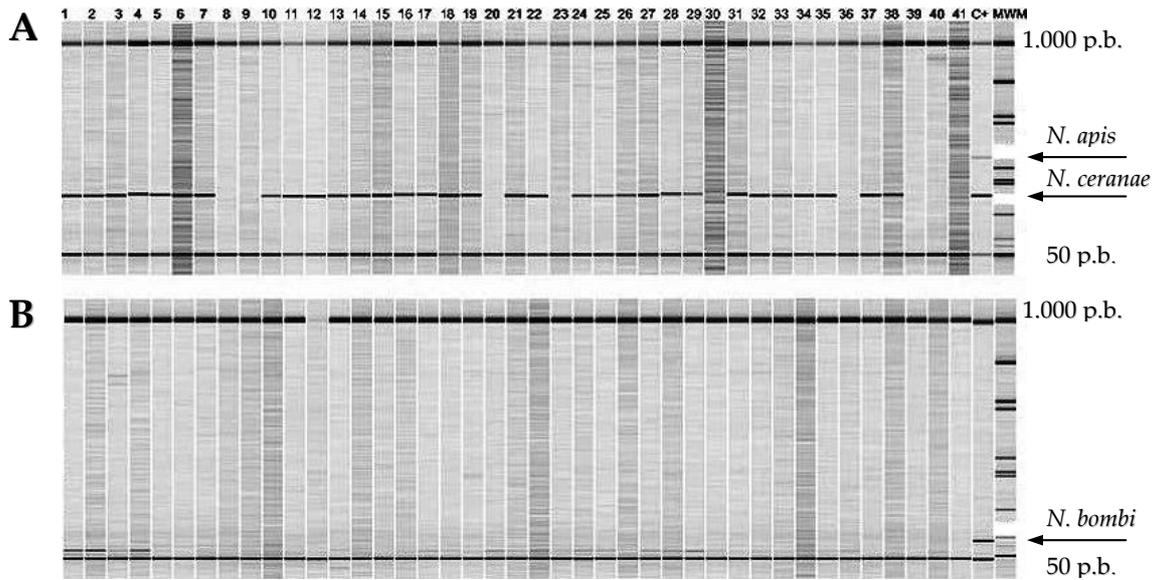


Figura 18 - Análisis por electroforesis en gel de agarosa de 41 muestras aisladas de *Bombus* spp., con controles positivos de *N. apis* y *N. ceranae* (A) y *N. bombi* (B). [Carril C+: controles positivos; MWM: marcador de peso molecular; Líneas 50 y 1.000 p.b.: marcas de alineación]. (Plischuk *et al.*, 2009).

ESPECIE	CASTA	N	n	<i>N. ceranae</i> -POSITIVOS	%	CARGA DE ESPOROS ± E. S.
<i>B. atratus</i>	R	383	105	4	3,8	$5,76 \pm 1,38 \times 10^6$
	O		256	41	16	$8,05 \pm 1,44 \times 10^6$
	M		22	1	4,5	$3,15 \times 10^5$
<i>B. morio</i>	R	45	26	2	7,7	$1,66 \times 10^8 / 1,1 \times 10^8$
	O		17	-	-	-
	M		2	-	-	-
<i>B. bellicosus</i>	R	23	9	-	-	-
	O		14	1	7,1	$1,14 \times 10^7$
	M		-	-	-	-

Tabla V - Detalle de las colectas y castas positivas a *Nosema ceranae* en *Bombus* spp. En la última columna se indica la carga media de esporos ± error standard (E. S.) cuando $n > 2$. [R: Reinas; O: Obreras; M: Machos].

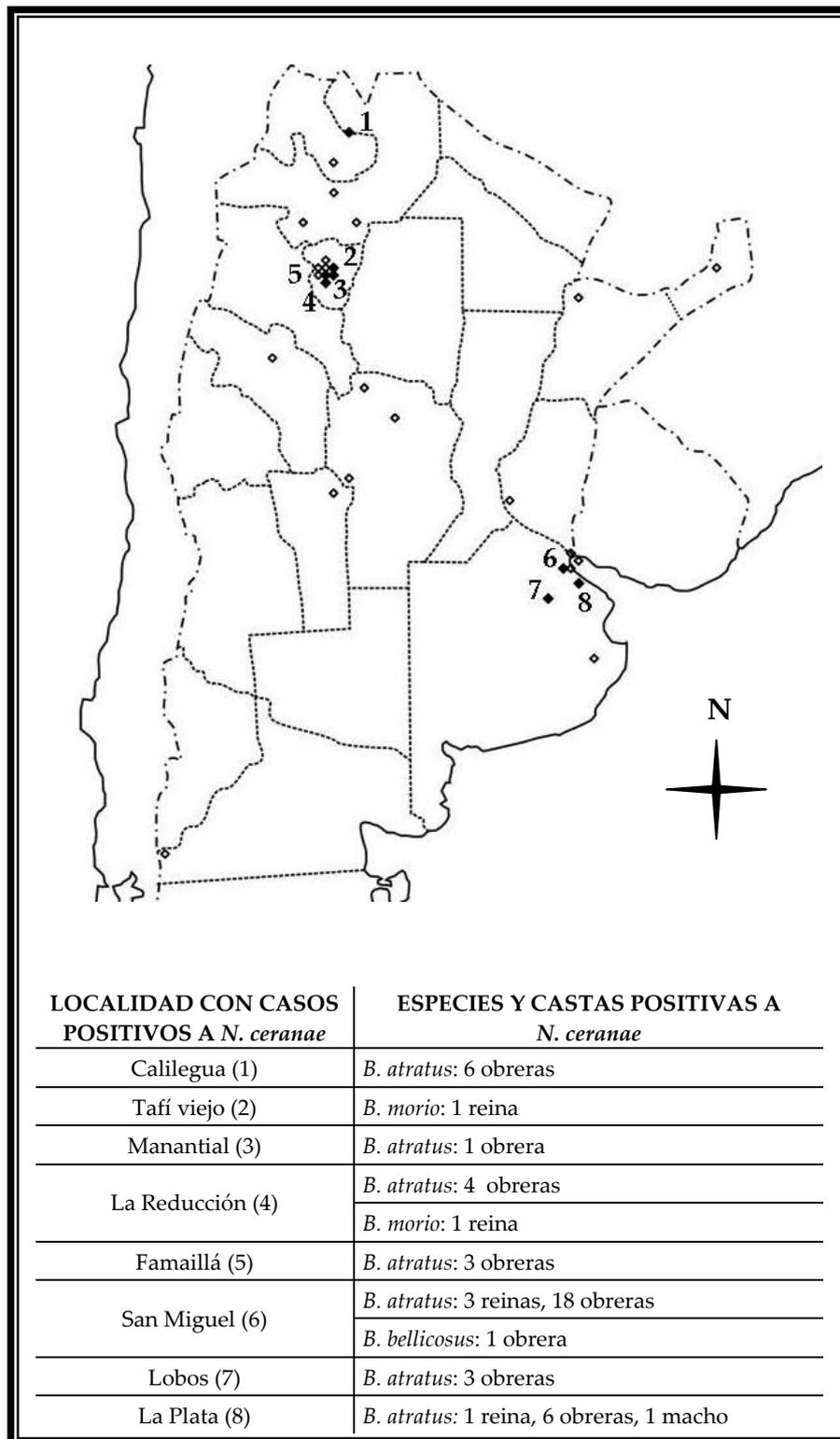


Figura 19 – Sitios de colecta de *Bombus* spp. [◆: Localidades con hallazgos de *Nosema ceranae*; ◇: Localidades sin hallazgos de *N. ceranae*].

Nosema ceranae en *Apis mellifera*: Aspectos epizootiológicos

Dado que las muestras analizadas molecularmente revelaron que la especie involucrada resultó ser, en todos los casos, *N. ceranae*, se consideró que el principal causante de nosemosis en la región es esta especie y no *N. apis*.

A partir de las muestras obtenidas cada 30 días en colmenares de la región Pampeana (Media: 69 muestras mensuales), se graficaron curvas correspondientes a cada una de las zonas analizadas, a lo largo de las tres temporadas de estudio (Doull, 1961). La figura 20 muestra los valores medios de prevalencia de *N. ceranae*. Los valores medios por temporada de cada una de las zonas se detallan en la tabla VI.

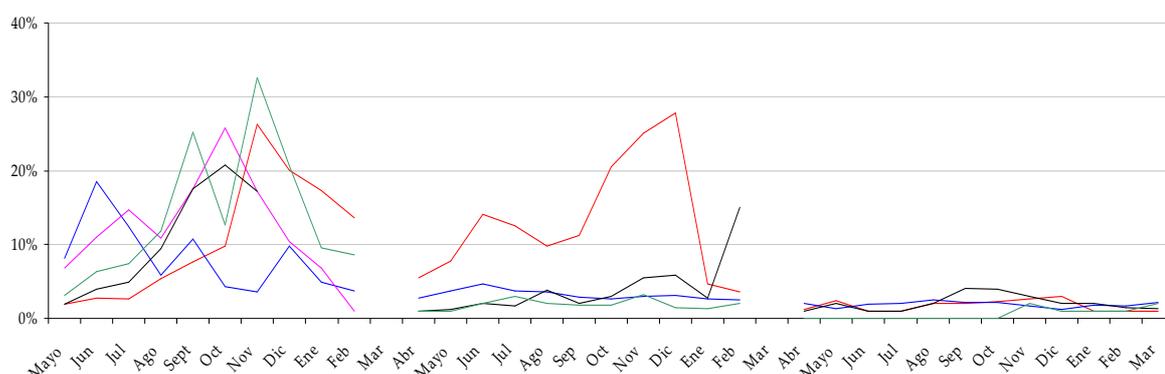


Figura 20 – Valores medios de prevalencia de *Nosema ceranae* en apiarios de la región Pampeana, obtenidos mensualmente entre 2006 y 2009. Eje Y: Porcentaje de casos positivos; Eje X: Escala temporal; Línea azul: Zona Noreste; Línea fucsia: Zona Noroeste; Línea roja: Zona Central; Línea negra: Zona Sudeste; Línea verde: Zona Sudoeste. [Por razones de claridad gráfica no se detallan los errores standard correspondientes].

ZONA	TEMPORADA 2006-07	TEMPORADA 2007-08	TEMPORADA 2008-09
Noreste	8,05 ± 1,02% (143)	3,15 ± 0,21% (176)	1,91 ± 0,12% (112)
Noroeste	13,67 ± 1,09% (115)	2,79 ± 0,7 (29)*	-*
Central	11,73 ± 1,2% (146)	14,5 ± 1,77% (126)	2,0 ± 0,17% (48)
Sudeste	12,4 ± 1,42% (83)	3,83 ± 0,88% (58)	2,42 ± 0,35% (72)
Sudoeste	14,64 ± 1,64% (134)	1,91 ± 0,19% (55)	1,4 ± 0,24 (5)

Tabla VI – Prevalencias medias (± ES) de *Nosema ceranae* en las diferentes zonas de la región Pampeana durante este estudio. Se indica el número de casos entre paréntesis. [(*) No graficados en la Fig. 20 (véase pág. 40 y referencias al pie)]

Por su parte, las cargas parasitarias medias fueron de $19,6 \pm 0,6 \times 10^6$ esporos/abeja en la primer temporada (n = 620), $17,1 \pm 0,5 \times 10^6$ esporos/abeja en la segunda (n = 458) y $16,5 \pm 0,7 \times 10^6$ esporos/abeja en la última de ellas (n = 231). Una vez analizado el total de las muestras, se obtuvo una carga parasitaria media de $18,16 \pm 0,35 \times 10^6$ esporos por abeja (n = 1.309) (Fig. 21).

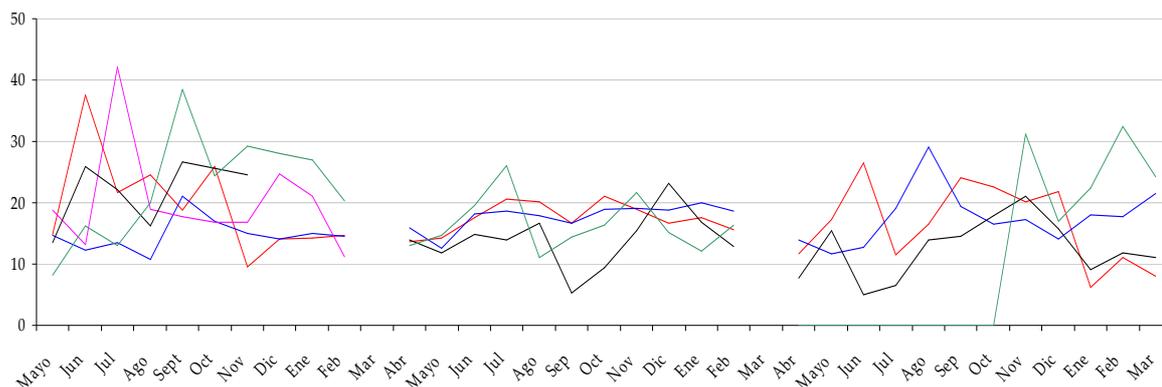


Figura 21 – Cargas parasitarias promedio de *Nosema ceranae* en apiarios de la región Pampeana, obtenidos mensualmente entre 2006 y 2009. Eje Y: Millones de esporos. Eje X: Escala temporal. Claves restantes: ver figura 20.

Por ultimo, la figura 22 representa la proporción de muestras positivas (N = 1.357)¹³ sobre el total de muestras analizadas (N = 2.502; Media= 74 muestras mensuales)¹⁴ entre 2006 y 2009, independientemente de las intensidades de cada infección.

El valor medio correspondiente a la primer temporada (2006-07) fue de $68,6 \pm 4,3\%$. El correspondiente a la temporada 2007-08 fue de $63,9 \pm 4,6\%$, mientras que el promedio de casos en la última temporada (2008-09) fue de $30,4 \pm 2,5\%$ de las muestras analizadas.

¹³ Al igual que en las tablas III y IV, el número de muestras se indica como N, en contraposición al número de individuos, señalado como n.

¹⁴ Si bien el número total de muestras en el presente estudio es de 2.503, en esta figura se excluye una muestra colectada en enero de 2010.

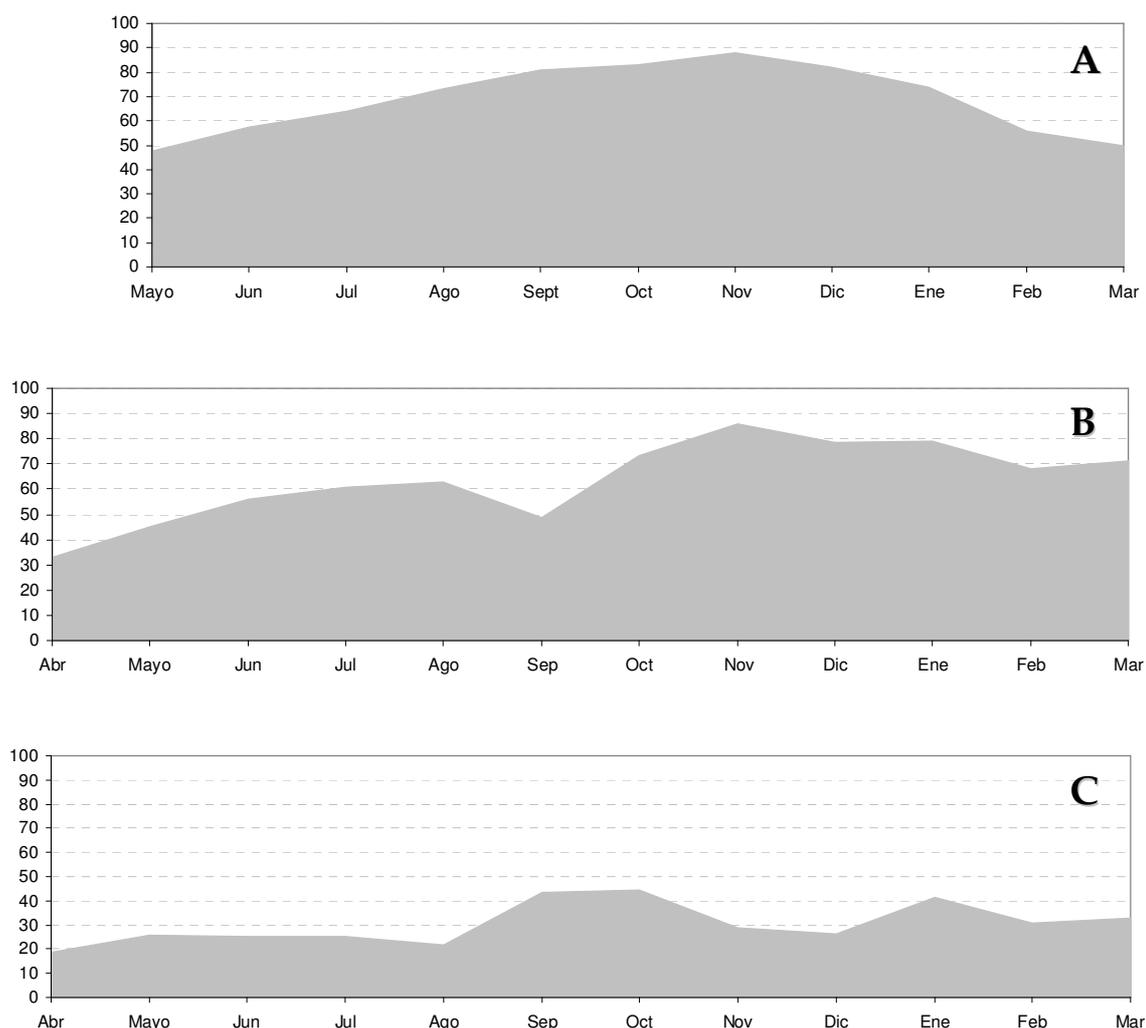


Figura 22 – Casos de *Nosema ceranae* en *Apis mellifera* en función de las muestras analizadas en los períodos 2006-07 (A), 2007-08 (B) y 2008-09 (C). Eje Y: Porcentaje de casos; Eje X: Escala temporal.

Nosema ceranae en *Bombus* spp.: Aspectos epizootiológicos

Las cargas parasitarias contabilizadas en las distintas castas y especies (Fig. 23 – Tabla V) mostraron mayores valores en las dos reinas de *B. morio* infectadas ($1,66 \times 10^8$ y $1,1 \times 10^8$ esporos), en comparación con las cuatro de *B. atratus* ($5,76 \pm 1,38 \times 10^6$ esporos).

Las 41 obreras de *B. atratus* expresaron valores entre $3,22 \times 10^5$ y $3,19 \times 10^7$, con una media de $8,05 \pm 1,44 \times 10^6$ esporos ($n = 38$). La única obrera de *B. bellicosus* infectada mostró un valor dentro del citado rango ($1,14 \times 10^7$ esporos).

Por último, la intensidad de la infección del único macho hallado (*B. atratus*) fue la menor de todos los casos ($3,15 \times 10^5$ esporos) (Véase también tabla IX).

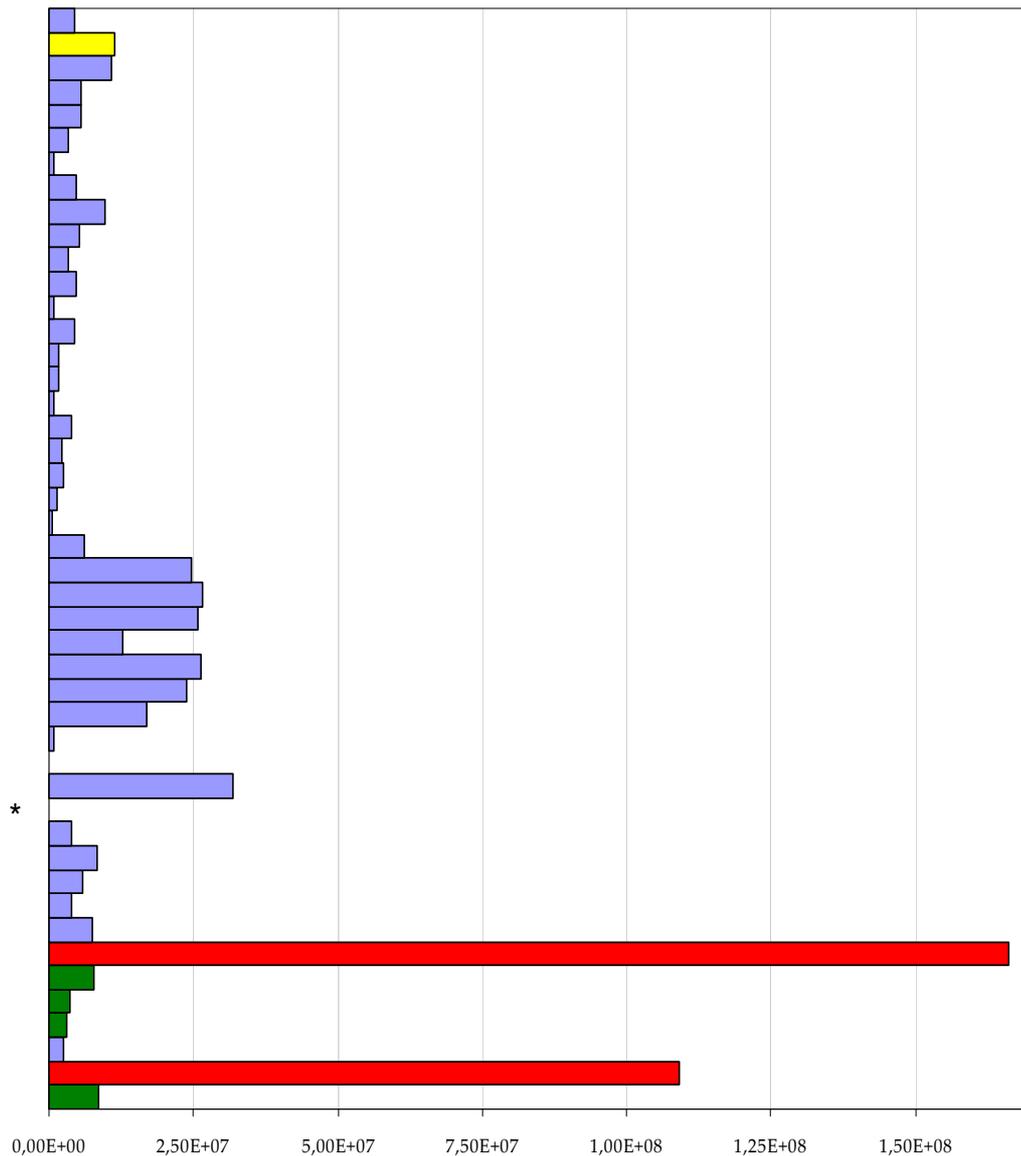


Figura 23 – Cargas parasitarias de *Nosema ceranae* indicada en millones de esporos, según especie de *Bombus* y casta afectada. *B. atratus*: Verde = reinas; Azul = obreras; Gris = macho [se indica con asterisco]; *B. morio*: Rojo = reinas; *B. bellicosus*: Amarillo = obrera.

Nephridiophaga apis (Nephridiophagidae)

Detección, morfología y ubicación

Observaciones de homogenatos obtenidos a partir de muestras periódicas de *A. mellifera* de la localidad de Saavedra (37° 48' 54,42" S; 62° 13' 27,82" O; Fig. 10 – Tabla III), colectadas entre agosto y noviembre de 2006, revelaron la presencia de un protista esporogénico cuyas características no concordaban con las de un microsporidio. Las disecciones hechas *a posteriori* pusieron de manifiesto que el lumen y el epitelio de los túbulos de Malpighi era el lugar de desarrollo de las infecciones.

No se manifestaron anomalías en el aspecto externo de los túbulos de Malpighi. Internamente se observaron esporos maduros, refringentes (Fig. 24), mientras que los estadios vegetativos del protista no lograron ser detectados.

Los esporos presentaron una forma ovoide bicóncava y se hallaron comúnmente agrupados en cúmulos (Fig. 24-A, B). Las dimensiones de dichos esporos mostraron valores de $4,8 \pm 0,05$ (4,0 – 6,0) μ x $2,4 \pm 0,03$ (1,6 – 3,2) μ (n = 75).

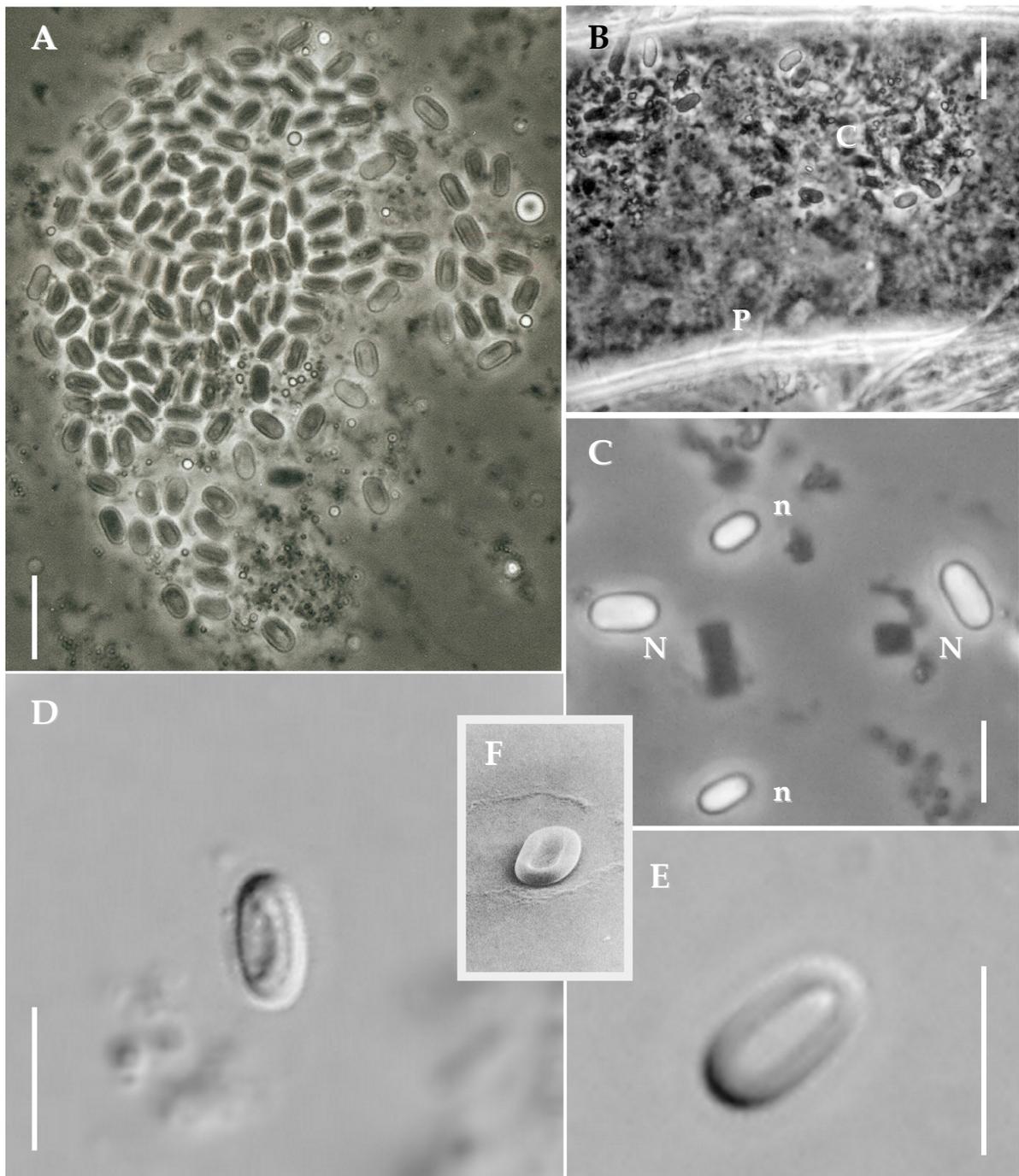


Figura 24 – Fotomicrografías de *Nephridiophaga apis* aislado de *Apis mellifera* (Saavedra, Buenos Aires). A) Cúmulo esporal disturbado (Escala = 10 μ). B) Túbulo de Malpighi conteniendo parte de un cúmulo esporal [P: pared del túbulo; C: cúmulo esporal] (Escala = 10 μ). C) Infección mixta con *Nosema* sp. [n: *Nosema* sp.; N: *Neph. apis*] (Escala = 5 μ). D) y E) *Nephridiophaga apis* (Escala = 5 μ). F) Comparación morfológica con *Nephridiophaga blatellae*, otro Nephridiophagidae (M.E.B., 10.000X).

Aspectos epizootiológicos

A lo largo del estudio, esta especie se detectó únicamente en 5 colmenas de la zona Sudoeste durante 2006 [Apiario Nuevo Lucero, Dufaur (Véase Apéndice II)] (Fig. 28).

De un total de 15 colmenas analizadas esa temporada, se registraron 6,7% de casos positivos (n = 1; Colmena 5) en septiembre, y 20% (n = 3) tanto en octubre (Colmenas 1, 2 y 4) como en noviembre (Colmenas 1, 2 y 3). La prevalencia del protista en las colmenas positivas osciló entre 1 y 16,7%, con un valor medio de 4,69% (Fig. 25).

La intensidad promedio de las infecciones (carga esporal) fue de $7,0 \pm 2,76 \times 10^6$ esporos/abeja ($1,43 \times 10^5 - 1,81 \times 10^7$) (n= 6).

Casi el 60% de los individuos positivos (n = 26) para este organismo presentaron parasitación mixta con *Nosema* sp. (Figs. 26/32).

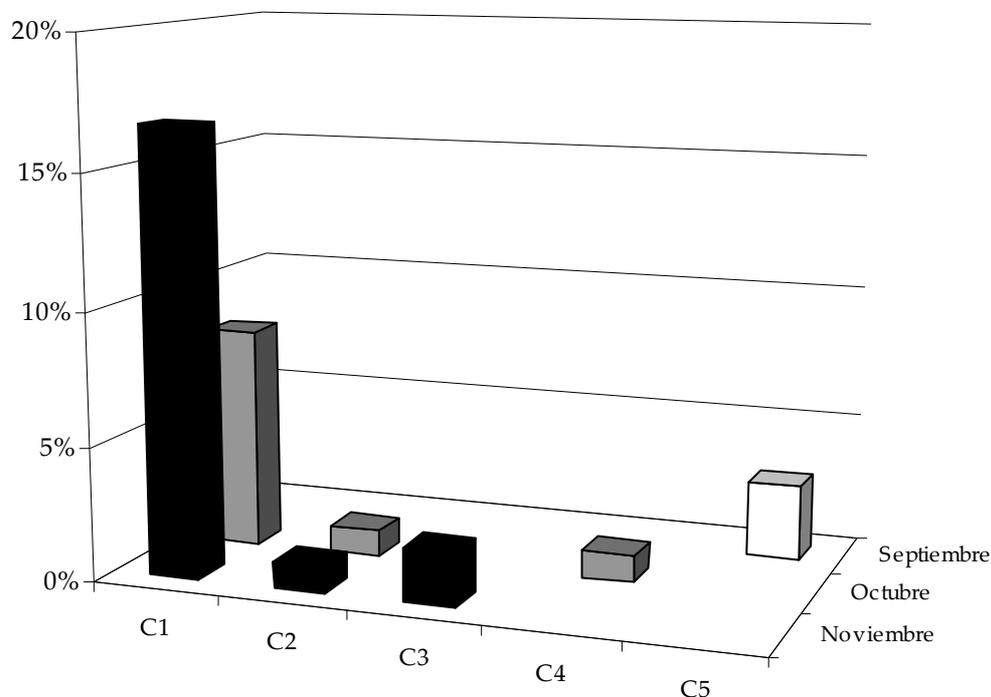


Figura 25 – Muestras positivas y prevalencias de *Nephridiophaga apis* en colmenas de Saavedra durante 2006. [Eje X: Colmenas positivas; Eje Y: prevalencias; Eje Z: Período analizado].

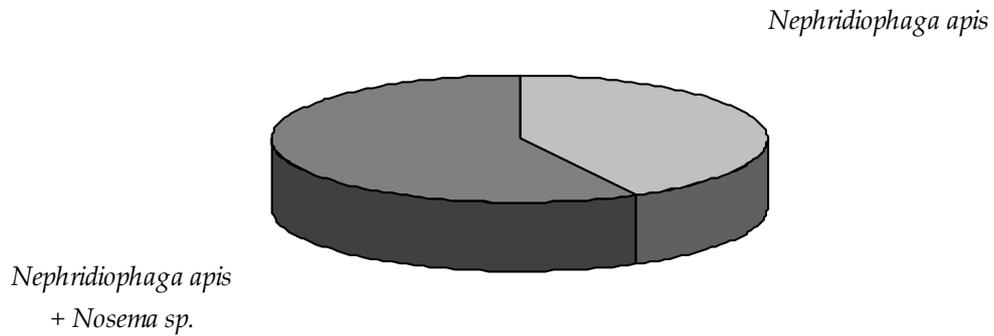


Figura 26 – Relación porcentual entre infecciones por *Nephridiophaga apis* como único agente (42,3%) e infecciones mixtas por *Nephridiophaga apis* y *Nosema* sp. (57,7%; n = 26) en colmenas de Saavedra durante 2006.

Malpighamoeba mellificae (Amoebozoa)

Detección, morfología y ubicación

A partir de muestras periódicas de *A. mellifera* de la localidad de San Cayetano (38° 20' 18,64" S; 59° 34' 55,12" O; Figs. 10 – Tabla III) colectadas en el mes de octubre de 2007, se detectaron tanto formas vegetativas como quísticas, cuyas características correspondían con las de una ameba.

Luego del análisis por disección se individualizó a los túbulos de Malpighi como el asiento de las infecciones. Estos presentaron un color blanco lechoso, alternado por sectores oscuros y se notaron frágiles durante el examen. El lumen de los mismos resultó invadido por cuerpos refringentes, esférico-ovoideos, de tamaño homogéneo [$7,48 \pm 0,06$ (6,8 – 8,0) μ x $6,33 \pm 0,05$ (5,6 – 6,8) μ (n = 60)]. En menor cantidad se observaron cuerpos de dimensiones algo más reducidas, circulares o semi-circulares, no refringentes (Fig. 27).

Posteriormente, durante el mes de febrero de 2010, se colectó una muestra de 59 abejas obreras pecoreadoras (Tipo III; pág. 37) en las cercanías de San Carlos de Bariloche (41° 07' 33" S; 71° 23' 55" O; Fig. 11 – Tabla III). Luego del análisis se corroboró que un ejemplar presentó en sus túbulos de Malpighi numerosos cuerpos coincidentes con los observados en las muestras de San Cayetano.

Los hallazgos correspondieron tanto a quistes (refringentes) como a estados vegetativos o trofozoítos (formas ameboides, no refringentes).

Las características descriptas (ubicación, medidas y morfología), así como su especie hospedadora indican que en ambos casos el protista aislado es *Malpighamoeba mellificae* (Amoebozoa), hasta el momento nunca detectado en nuestro país.

Aspectos epizootiológicos

En la localidad de San Cayetano [Apiario Don Federico (Véase Apéndice II)], sobre un total de 15 colmenas analizadas esa temporada, se registró a este patógeno en una de ellas (6,7 %) en muestras de octubre de 2007. La prevalencia de abejas infectadas con *M. mellificae* en la colmena fue de 9 %.

La intensidad media de las infecciones fue de $5,13 \pm 0,94 \times 10^5$ ($4 \times 10^4 - 9,9 \times 10^5$) quistes/abeja ($n = 9$). No se detectaron infecciones mixtas con otro protista en ninguno de los individuos positivos ($n = 9$) para este organismo (Fig. 32).

La prevalencia de la muestra observada en San Carlos de Bariloche fue de 1,69% ($n = 59$).

El conteo en el hemocitómetro indicó un valor de $3,25 \times 10^5$ quistes en la abeja infectada. El ejemplar parasitado contenía también esporos de *Nosema* sp. en su tubo digestivo ($8,5 \times 10^6$ esporos) (Fig. 27-E).

Combinando los hallazgos de ambos sitios ($n = 10$) (Fig. 28), se obtuvo una carga media de $4,95 \pm 0,86 \times 10^5$ quistes de *M. mellificae* por abeja.

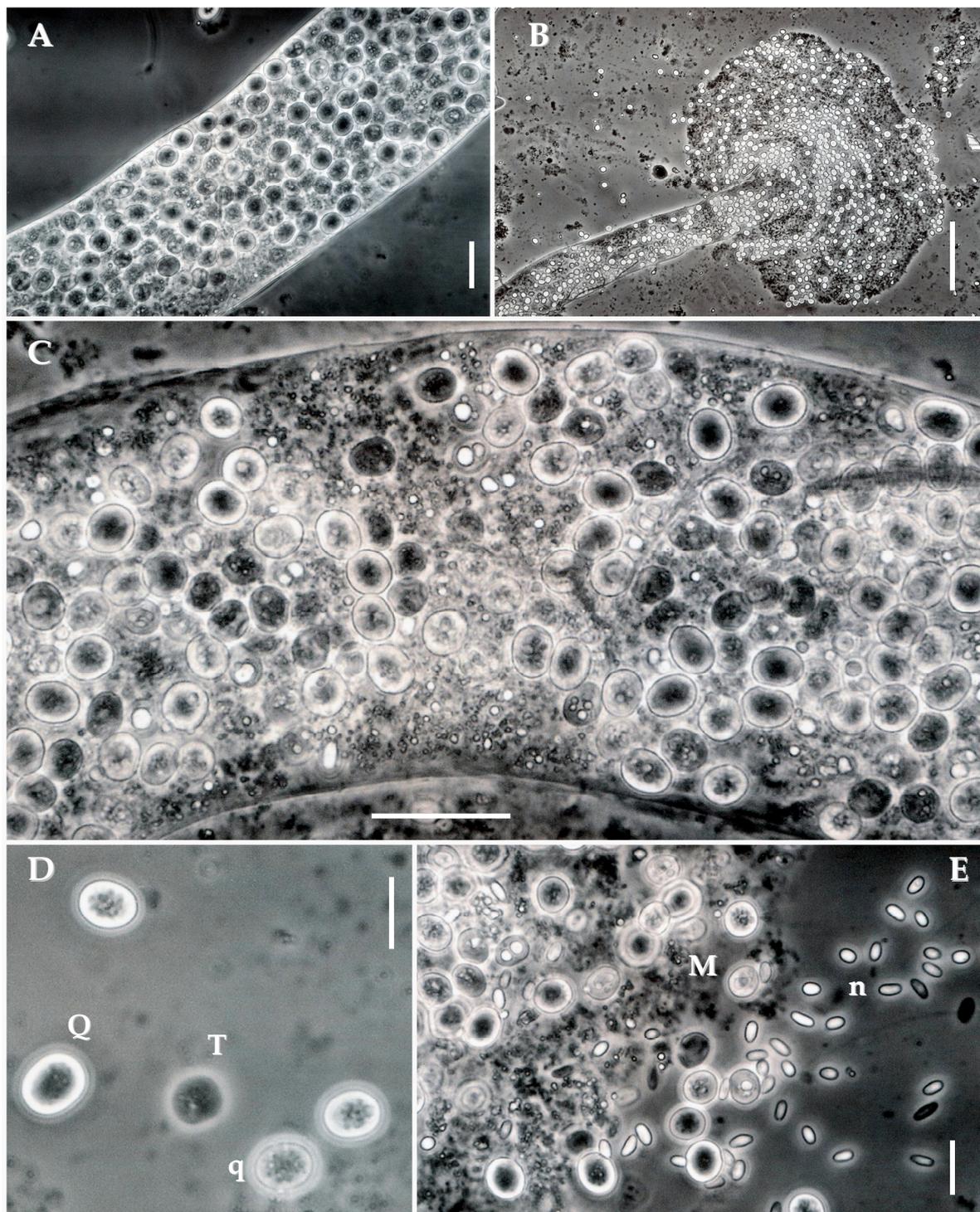


Figura 27 – Fotomicrografías de *Malpighamoeba mellificae* aislada de *Apis mellifera*. (San Carlos de Bariloche, Río Negro). A) Túbulo de Malpighi infectado (Escala = 20 μ). B) Túbulo de Malpighi seccionado liberando formas quísticas (Escala = 100 μ). C) Detalle de túbulo de Malpighi conteniendo diferentes estados de maduración (Escala = 20 μ). D) Quiste maduro [Q], quistes inmaduros [q] y trofozoíto [T] (Escala = 10 μ). E) Infección mixta con *Nosema* sp. [n: *Nosema* sp.; M: *M. mellificae*] (Escala = 10 μ).

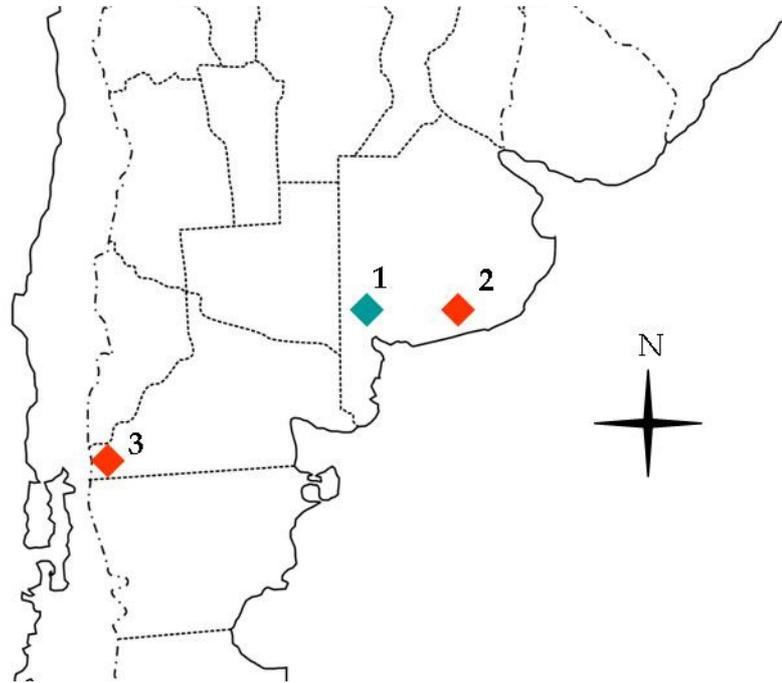


Figura 28 – Localidades con detecciones de *Nephridiophaga apis* [1: Saavedra (Bs. As.)] y *Malpighamoeba mellificae* [2: San Cayetano (Bs. As.); 3: San Carlos de Bariloche (Río Negro)] en *Apis mellifera* de Argentina.

Crithidia bombi (Euglenozoa)

Detección, morfología y ubicación

Del total de ejemplares de *Bombus* colectados (n = 581), 114 pertenecieron a la especie invasora *B. terrestris* (74 machos, 38 obreras y 2 reinas). Fueron colectados pecoreando sobre amancay (*Alstroemeria aurea* Graham) y lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), 8 Km. al Oeste de San Carlos de Bariloche (41° 07' 33" S; 71° 23' 55" O; Fig. 11 – Tabla IV).

Durante el análisis de dichas muestras se detectaron infecciones en el tracto digestivo, en especial entre la sección posterior del intestino medio y el inicio del intestino grueso. Tanto el aspecto externo de los insectos infectados como el del tejido interno afectado no mostraron signos diferentes al de insectos sanos. No se detectaron flagelados en las otras especies de *Bombus* colectadas.

Los organismos hallados se presentaron en dos morfotipos (**amastigotas** y **coanomastigotas**) en cantidades aproximadamente iguales. Los primeros fueron en su mayoría cuerpos esféricos, a veces ovales, con un núcleo ubicado excéntricamente, citoplasma granular, y un flagelo reducido o retraído dentro del reservorio (Fig. 29-A, B). Las formas coanomastigotas se observaron como cuerpos piriformes, con un extremo anterior truncado del cual emergía el flagelo, y una ligera constricción en el tercio anterior del cuerpo (Fig. 29-A, C, D). El núcleo se ubicó cerca del centro de la célula, más cerca del extremo posterior, adyacente al kinetoplasto y al reservorio flagelar (Fig. 29-C). No se observaron **promastigotas** (Logan *et al.*, 2005).

En base a preparados en fresco, las dimensiones medias de las formas amastigotas fueron de $3,45 \pm 0,21 \mu \times 3,42 \pm 0,22 \mu$, con un flagelo de $0,96 \pm 0,07 \mu$ (n = 16). Los coanomastigotas midieron en promedio $4,41 \pm 0,09 \mu \times 2,64 \pm 0,01 \mu$, con un flagelo de $2,21 \pm 0,11 \mu$ (n = 21).

Las mediciones obtenidas a partir de preparados permanentes teñidos con Giemsa arrojaron valores medios de $3,47 \pm 0,06 \mu$ para los amastigotas¹⁵ (n = 30) y de $4,17 \pm 0,08 \mu \times 2,56 \pm 0,06 \mu$ para los coanomastigotas (n = 30).

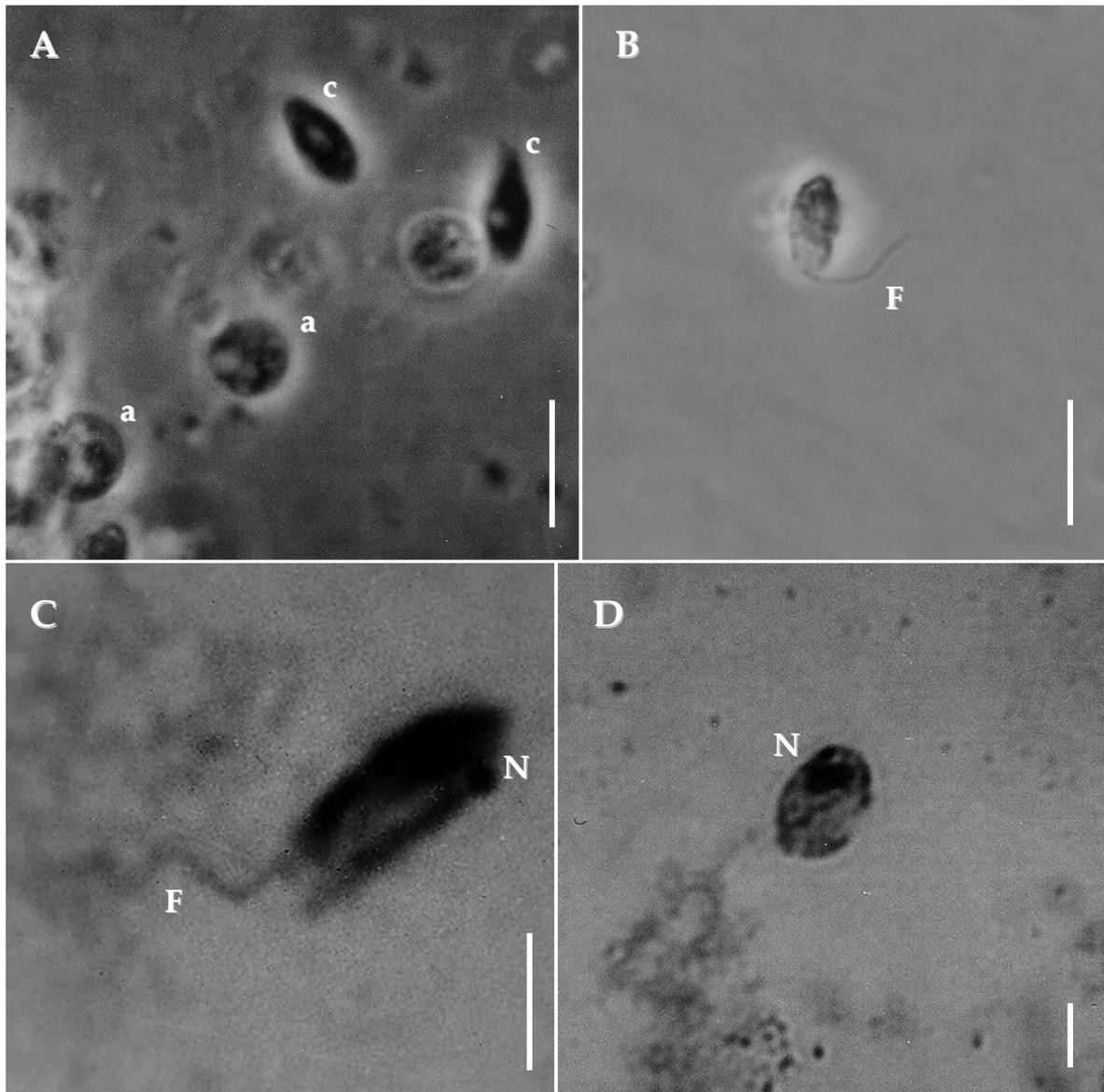


Figura 29 – Fotomicrografías de los diferentes estados vegetativos de *Crithidia bombi* aislados de *Bombus terrestris* (San Carlos de Bariloche, Río Negro). A) Amastigotas [a] y coanomastigotas [c] (Escala = 5 μ ; en fresco). B) Coanomastigota mostrando el flagelo [F] (Escala = 5 μ ; en fresco). C) Coanomastigota mostrando el flagelo [F] y el núcleo [N] (Escala = 2 μ ; tinción Giemsa). D) Amastigota mostrando el núcleo excéntrico [N] (Escala = 2 μ ; tinción Giemsa).

¹⁵ No existió diferencia entre el largo y el ancho medios de los amastigotas en este tipo de preparaciones.

Los rangos obtenidos en las mediciones tanto de formas amastigotas como coanomastigotas se muestran en la tabla VII, en conjunto con las medidas originalmente descriptas para la especie parásita de *B. terrestris*, *Crithidia bombi* (Lipa & Triggiani, 1988).

<i>Crithidia bombi</i>		
Coanomastigotas	Amastigotas	REFERENCIAS
4,9 – 6,9 x 1,5 – 2,4*	3,4 – 5,4*	Lipa & Triggiani, 1988.
-	-	
3,2 – 4,8 x 2,0 – 3,2*	3,2 – 4,4*	Presente estudio.
3,6 – 5,0 x 1,6 – 3,2 [†]	2,4 – 5,0 [†]	

Tabla VII - Comparación entre las medidas de las formas coanomastigotas y amastigotas de *Crithidia bombi* registradas en *Bombus terrestris* de Argentina y las descriptas originalmente por Lipa & Triggiani (1988) (Medidas en μ). (*) Preparaciones fijadas y coloreadas con tinción Giemsa [n = 30 (coanomastigotas); n = 30 (amastigotas)]. ([†]) Preparaciones en fresco [n = 21 (coanomastigotas); n = 16 (amastigotas)]. (Adaptado de Plischuk & Lange, 2009).

Aspectos epizootiológicos

Veinticuatro ejemplares de *B. terrestris* [3 machos (4%), 21 obreras (55%), 1 reina (50%)] se encontraron parasitados por *C. bombi*, mostrando una prevalencia de 21 % (n = 114) (Fig. 32 – Tabla IX).

La carga de flagelados por insecto fue de $1,13 \pm 0,37 \times 10^5$ (n = 10). Las obreras mostraron valores medios de $1,4 \pm 0,49 \times 10^5$ (n = 7) mientras que la intensidad promedio en los machos fue de $0,5 \pm 0,2 \times 10^5$ (n = 3).

Del total de individuos infectados con *C. bombi*, únicamente una obrera, la cual contenía $1,44 \times 10^5$ flagelados, mostró una infección mixta con la neogregarina *Apicystis bombi* (Véase página siguiente).

Apicystis bombi (Apicomplexa)

Detección, morfología y ubicación

En las muestras de *B. terrestris* de enero de 2009 (n = 114) provenientes de San Carlos de Bariloche, también fueron detectados individuos conteniendo cuerpos naviculares refringentes en su tejido graso, correspondientes a una neogregarina (Apicomplexa: Neogregarinorida) (Fig. 30). Externamente los insectos no evidenciaron indicios de enfermedad.

Las formas observadas con mayor frecuencia fueron los ooquistes, tanto maduros como inmaduros. Los primeros lucieron homogéneos en apariencia, mostrando una forma navicular, alta refringencia, y una estructura más densa en cada extremo [*cap-like* (Lipa & Triggiani, 1996)]. Los ooquistes inmaduros presentaron un tamaño medio ligeramente mayor, aspecto menos estilizado y menor refringencia respecto a los anteriores. Mediante tinción Giemsa se observaron cuatro núcleos en el interior de los ooquistes (Fig. 30-C). Ocasionalmente se detectaron formas correspondientes a merontes micronucleares.

El tamaño medio de los ooquistes maduros observados en fresco fue de $12,94 \pm 0,08 \mu \times 3,36 \pm 0,04 \mu$ (n = 50). Luego de la fijación y tinción, el mismo fue de $9,99 \pm 0,15 \mu \times 2,63 \pm 0,05 \mu$ (n = 50).

Los rangos de tamaño de los ooquistes hallados se muestran en la tabla VII, en conjunto con los reportados en la descripción original de la neogregarina *Apicystis bombi* (Lipa & Triggiani, 1996), especie con la que concuerdan tanto la especie hospedadora como el tejido infectado y los aspectos morfológicos descriptos.

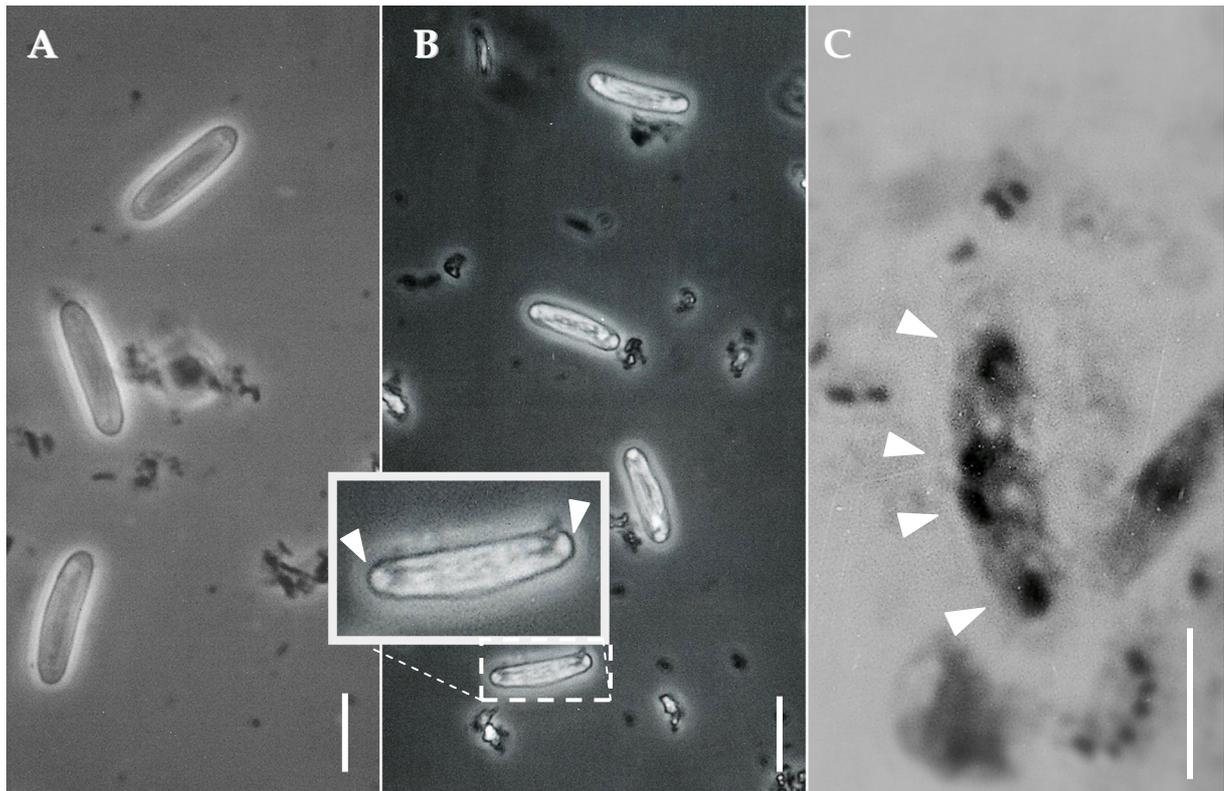


Figura 30 – Fotomicrografías de *Apicystis bombi* obtenido de *Bombus terrestris* (San Carlos de Bariloche, Río Negro). A) Ooquistes inmaduros (Escala = 10 μ). B) Ooquistes maduros. Las flechas sobre el ooquiste detallado (2X) indican las zonas polares densas (Escala = 10 μ). C) Ooquiste fijado y coloreado con tinción Giemsa. Las flechas indican sus cuatro núcleos (Escala = 5 μ).

<i>Apicystis bombi</i>	
OOQUISTES MADUROS	REFERENCIAS
11,1 – 14,4 x 3,6 – 5,4*	Lipa & Triggiani, 1996.
16,2 – 21,6 x 5,6 [†]	
8,8 – 12,0 x 2,4 – 3,2*	Presente estudio.
12,0 – 14,4 x 2,8 – 4,0 [†]	

Tabla VIII - Comparación entre las medidas de los ooquistes maduros de *Apicystis bombi* registrados en *Bombus terrestris* de Argentina con las descritas originalmente por Lipa & Triggiani, 1996 (Medidas en micras). (*) Preparaciones fijadas y coloreadas con tinción Giemsa (n = 50). (†) Preparaciones en fresco (n = 50). (Adaptado de Plischuk & Lange, 2009).

Aspectos epizootiológicos

Se registraron cuatro ejemplares de *B. terrestris* (3,5%) infectados por esta neogregarina, específicamente una obrera (2,6%; n = 38) y tres machos (4,1%; n = 74).

La intensidad media de las infecciones fue de $5,42 \pm 2,82 \times 10^6$ ooquistes (n = 4). La única obrera de los cuatro insectos parasitados se halló co-infectada con *C. bombi*, y mostró una carga de $9,54 \times 10^5$ ooquistes (Fig. 32 – Tabla IX). Los machos mostraron un valor medio de $6,9 \pm 3,4 \times 10^6$ ooquistes/insecto (n = 3), no detectándose infecciones mixtas sobre esta casta.

Apicystis bombi no fue detectado en ninguna otra especie de *Bombus* de las seis colectadas en diferentes puntos del país, no obstante se han hallado formas similares a ooquistes de este patógeno en el tejido graso y la hemolinfa de abejas colectadas en San Carlos de Bariloche, pecoreando junto a *B. terrestris* (Fig. 31). Dichos resultados mantienen un carácter preliminar y serán objeto de futuros estudios.

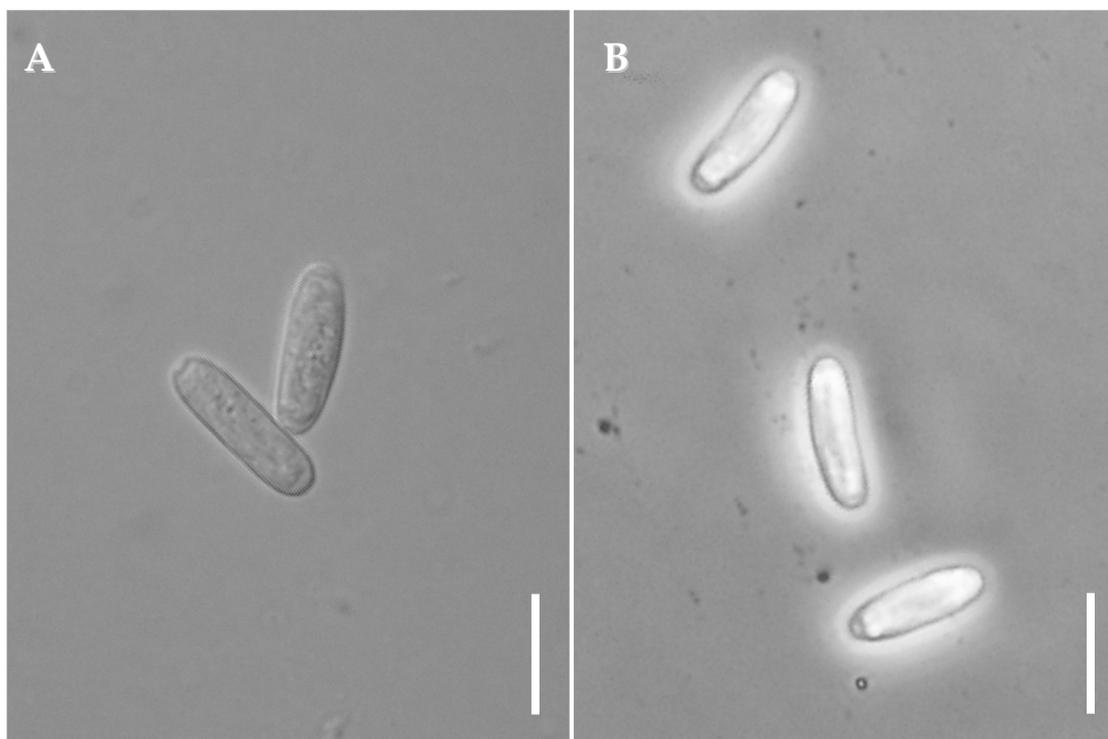


Figura 31 – Formas similares a ooquistes inmaduros (A) y maduros (B) de *Apicystis bombi* hallados en homogenatos de *Apis mellifera* en San Carlos de Bariloche, Río Negro. Escalas = 10 μ .

ESPECIE	CASTA	N	n	<i>N. ceranae</i> - POSITIVOS	<i>A. bombi</i> - POSITIVOS	<i>C. bombi</i> - POSITIVOS	INTENSIDAD ± E. S.
<i>B. atratus</i>	R	383	105	4	-	-	$5,76 \pm 1,38 \times 10^6$
	O		256	41	-	-	$8,05 \pm 1,44 \times 10^6$
	M		22	1	-	-	$3,15 \times 10^5$
<i>B. terrestris</i>	R	114	2	-	-	1	-
	O		38	-	1	21	$9,54 \times 10^5$ (†) $1,40 \pm 0,49 \times 10^5$ (*)
	M		74	-	3	3	$6,90 \pm 3,38 \times 10^6$ (†) $5,00 \pm 2,20 \times 10^4$ (*)
<i>B. morio</i>	R	45	26	2	-	-	$1,66 \times 10^8 / 1,1 \times 10^8$
	O		17	-	-	-	-
	M		2	-	-	-	-
<i>B. bellicosus</i>	R	23	9	-	-	-	-
	O		14	1	-	-	$1,14 \times 10^7$
	M		-	-	-	-	-
<i>B. opifex</i>	R	9	2	-	-	-	-
	O		7	-	-	-	-
	M		-	-	-	-	-
<i>B. tucumanus</i>	R	6	2	-	-	-	-
	O		4	-	-	-	-
	M		-	-	-	-	-
<i>B. dahlbomii</i>	R	1	1	-	-	-	-
	O		-	-	-	-	-
	M		-	-	-	-	-

Tabla IX - Resumen de las detecciones correspondientes a *Nosema ceranae*, *Apicystis bombi* y *Crithidia bombi* registradas en ejemplares de *Bombus* spp. de Argentina. (†) *A. bombi*. (*) *C. bombi*. R = reina; O = Obrera; M = Macho.

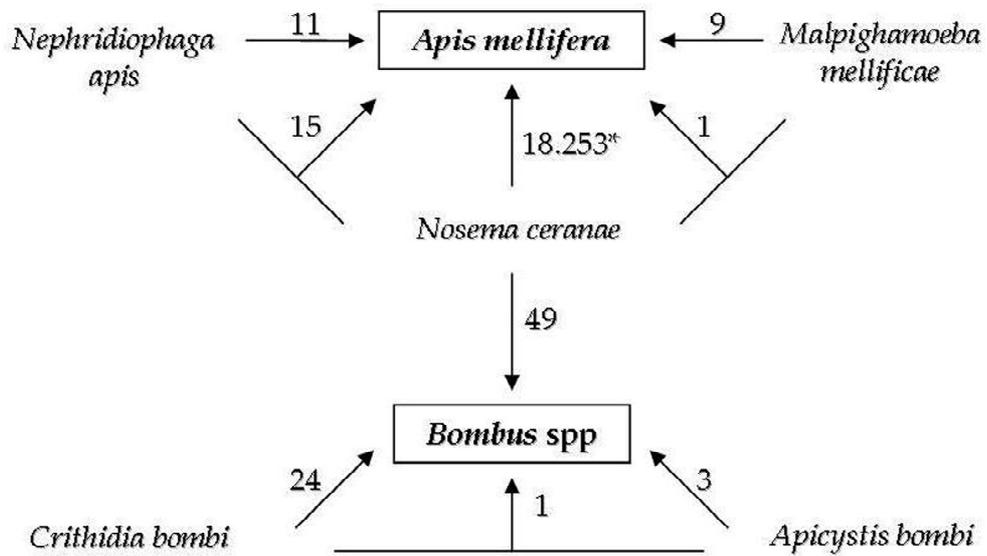


Figura 32 - Esquema que indica el número de infecciones individuales y co-infecciones tanto en *Apis mellifera* como en *Bombus spp.* registradas en ejemplares de Argentina entre 2006 y 2010. No se incluyen posibles casos de *Apicystis bombi* en *A. mellifera*. (*) Valor aproximado.

DISCUSIÓN

Nosema ceranae / *Nosema apis*

Los microsporidios son parásitos intracelulares obligados, cuyo ciclo consta de una alternancia de fases merogónica y esporogónica con formación de cuerpos de transmisión resistentes denominados **esporos** (Keeling & Fast, 2002), siendo estos últimos los únicos estados capaces de sobrevivir fuera de la célula hospedadora. La sinapomorfía conspicua de este grupo es la presencia de un tubo enrollado dentro del esporo llamado **filamento polar**. Bajo disparadores aún no bien determinados, este filamento es extruido rápidamente y penetra en una célula hospedadora, permitiendo vehicular su esporoplasma (material nuclear y parte del citoplasma) hasta dentro de ésta (Keeling & Fast, 2002; Smith, 2009). Una vez reestructurado el patógeno en la célula, sobreviene una etapa de división y multiplicación (merogonia) del estado vegetativo o **meronte**. Posteriormente una fase esporogónica da lugar a la formación de **esporos**, los que, una vez en el exterior podrán reiniciar el ciclo¹⁶. Se han descrito más de 1.500 especies de microsporidios parasitando a casi todos los *phyla* animales (van der Steen & Fries, 2006; Keeling, 2009). Debido a su estructura genómica, la ausencia de mitocondrias típicas y la composición proteica de la pared esporal, la ubicación taxonómica de los microsporidios ha variado desde su establecimiento, considerándose en la actualidad como un grupo perteneciente al reino Fungi, vinculado al *phylum* Zygomycota (Adl *et al.*, 2005; Keeling, 2009).

El género *Nosema* también ha sido objeto de controversias en cuanto a su posición sistemática dentro de los microsporidios debido a su heterogeneidad. Los caracteres más representativos del género son la presencia de ciclos relativamente simples, sin reproducción sexual y la presencia de dos núcleos apareados (**diplocarion**) en su desarrollo (van der Steen & Fries, 2006). En la actualidad, este género contiene alrededor de 215 especies, muchas de las cuales son reconocidas como importantes entomopatógenos (Larsson, 1999). La enfermedad producida por especies de este

¹⁶ En muchas especies de microsporidios el ciclo es más complejo pudiendo presentar esporos de formación temprana, los que infectarán células adyacentes, o incluso ciclos heteroxenos (Becnel & Andreadis, 1999).

género en *A. mellifera* es conocida como **nosemosis** y tal como se comentó en la página 19 es una de las tres enfermedades más graves que puede padecer este insecto. Se ha reportado en prácticamente todos los países con prácticas de apicultura (Bailey & Ball, 1991; Matheson, 1996).

Nosema ceranae en *Apis mellifera*

La nosemosis se atribuyó durante *ca.* 100 años a la especie *Nosema apis* hasta que, en el año 2006, la especie *N. ceranae* fue reportada como otro agente etiológico, con una amplia dispersión mundial (Fig. 33) afectando tanto a *A. cerana* (su especie hospedadora original) como a *A. mellifera* (Fries *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2005, 2007; Higes *et al.*, 2006a).

El espectro de estudios inherentes a ambas especies de *Nosema* es extremadamente amplio a nivel mundial, y especialmente desde la detección de *N. ceranae* en *A. mellifera* los trabajos acerca de esta especie se han multiplicado (Bailey, 1968; Fries, 1988, 1993, 2009; Fries *et al.*, 1992, 1996, 2006; Webster, 1993, 1994; Higes *et al.*, 2006a, b, 2007, 2008a, b, 2009a, b, 2010a, b; Huang *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008, 2009; Paxton, 2010 y otros). Los estudios focalizados en esta nueva asociación muestran que *N. ceranae* diferiría de *N. apis* tanto en su morfología, ciclo vital y sintomatología, como en la dinámica de la enfermedad a nivel de la colonia afectada (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2007, 2008b, 2009b; COLOSS Workshop, 2009). Las enfermedades producidas por *N. apis* y *N. ceranae* se denominan nosemosis tipo "A" y "C", respectivamente (COLOSS Workshop, 2009; Higes *et al.*, 2010a).

El mayor inconveniente para la identificación de estas dos especies es la similitud morfológica externa que presentan sus esporos, tanto en tamaño como en forma. Por lo tanto, para una correcta diagnosis son necesarias técnicas de tipo molecular (Martín-Hernández *et al.*, 2007; O.I.E., 2008).

Las presentes detecciones de *N. ceranae* constituyen las primeras realizadas a nivel molecular en Argentina, confirmando resultados preliminares obtenidos por Sarlo (2007) mediante microscopía electrónica, e incluyen el registro más austral en su distribución geográfica a nivel mundial, establecido por la muestra de General Conesa, provincia de Río Negro (40° 06' 00" S, 64° 25' 60" O).

Con los presentes resultados no solo se amplía la distribución geográfica de este patógeno emergente (Fig. 33), sino que se pone de manifiesto su capacidad de infectar a *A. mellifera* en diferentes áreas geográficas y climáticas coincidiendo con Martín-Hernández *et al.* (2009a) y Higes *et al.* (2010b), teniendo en cuenta que dicha localidad puede alcanzar un rango de amplitud térmica mayor a los 50 °C (-10 °C a 44 °C). Estas interpretaciones discrepan con las sugeridas por Fenoy *et al.* (2009) y Gisder *et al.* (2010), quienes luego de comprobar experimentalmente que la viabilidad de los esporos de *N. ceranae* podría disminuir luego de una breve exposición a entornos de 4 °C, han propuesto que las bajas temperaturas atentarían contra la infección y propagación de este patógeno en regiones climáticas con inviernos rigurosos.

No menos importante es la ausencia de hallazgos de *N. apis*, el patógeno históricamente asociado a nosemosis en abejas en Argentina (Ringuelet, 1947; Cornejo & Rossi, 1974; Root, 1990; Sarlo 2002a, b) y en otros países sudamericanos (Piccirillo & de González, 1995; Hinojosa & González, 2004; Invernizzi *et al.*, 2005). La falta de utilización de técnicas diagnósticas modernas anteriores a 2006, indican que identificaciones atribuidas a *N. apis* podrían haber correspondido, en realidad, a casos de *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2007).

Recientemente se ha reportado en Uruguay un aislamiento de *N. ceranae* a partir de una muestra previa a 1990, evidenciando que este microsporidio se encuentra en Sudamérica desde hace más de 20 años (Invernizzi *et al.*, 2009). La cercanía geográfica y comercial entre los países sumada a la amplitud de los registros logrados en esta tesis sugieren que la presencia de *N. ceranae* en Argentina podría tener la misma o mayor antigüedad, debido al desarrollo de la industria apícola en

nuestro país y las constantes exportaciones e importaciones de material vivo. Posibles deficiencias en los controles sanitarios requeridos en estas operaciones, así como en los traslados de colmenas dentro del país (transhumancia), serían algunas de las causas de la amplia dispersión de esta especie.

Exceptuando algunos casos en los que *N. apis* presenta mayores prevalencias que *N. ceranae* (Fries, 2009), un panorama similar al de Argentina se observa a nivel mundial (COLOSS Workshop, 2009). Se ha propuesto que *N. ceranae* podría estar desplazando a *N. apis* por competencia sobre el mismo hospedador (Klee *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008a), o bien que la dominancia y rápida dispersión de *N. ceranae* con respecto a *N. apis* solo esté reflejando la capacidad de la primera para sobrevivir y completar su ciclo de vida bajo rangos climáticos más amplios (Martín-Hernández *et al.*, 2009a; Higes *et al.*, 2008b, 2010b). Ambas hipótesis podrían estar explicando los datos presentados en el presente estudio.

Una tercera alternativa es que *N. apis* se encontraría en la región Pampeana, pero en una prevalencia sumamente baja, tal como sugieren los resultados obtenidos por Sarlo *et al.* (2008) para el sudeste de la provincia de Buenos Aires.



Figura 33 - Infecciones de *Nosema ceranae* registradas en *Apis mellifera* entre 2006 y 2009. (Mapa: Adaptado de Microsoft Encarta, 2007)

Dinámica de la nosemosis en la región Pampeana

Se ha descrito la presencia y amplia dispersión de *N. ceranae* parasitando a *A. mellifera* en Argentina pero poco se sabe de sus aspectos epizootiológicos básicos (presencia/ausencia, prevalencia) y de las fluctuaciones de éstos en función del tiempo.

Prevalencia

Una vez delimitado el contexto espacio-temporal en el que se lleva a cabo un estudio, se observa que el estado en que un patógeno se presenta en la población hospedadora normalmente fluctúa a lo largo de un rango con dos extremos opuestos: los estados **enzoótico** y **epizoótico** (Fuxa & Tanada, 1987; Lange, 2003). En el estado enzoótico, la enfermedad suele ser de baja prevalencia y se halla constantemente presente en la población del hospedador, mientras que en el estado epizoótico, es esporádica, limitada en el tiempo y caracterizada por cambios bruscos en su prevalencia. Existen patógenos tendientes a comportarse de forma enzoótica y otros más propensos a variar considerablemente entre ambos estados (Lange, 2003). En las relaciones patógeno-hospedador donde la transmisión horizontal predomina o es la única vía de contagio, la prevalencia normalmente varía en forma apreciable, alternada por epizootias, mientras que en las relaciones en las que predomina la transmisión vertical, la prevalencia suele estar mantenida en un estado estacionario o enzoótico (Andreadis, 1987; Lange, 2003).

En el presente caso, resulta indudable el establecimiento de *N. ceranae* en la región Pampeana y analizando los datos obtenidos, su comportamiento parece oscilar entre ambos estados al mostrar pulsos epizoóticos, alternados con estados de enzootia¹⁷.

La figura 20 (pág. 61) expresa las prevalencias medias registradas en las 5 zonas de la región Pampeana. Los gráficos muestran picos de mayores valores en la

¹⁷ Comparaciones estadísticas no fueron realizadas debido a que en este tipo de estudios observacionales descriptivos las mismas son poco eficientes por carecer, entre otras cosas, de grupos control (Fuxa & Tanada, 1987).

primera temporada de estudio, mientras que, excepto un caso (zona Central), en las dos temporadas subsiguientes éstos descienden manteniéndose en valores bajos y prácticamente constantes. Teniendo en cuenta que la única vía de transmisión reportada hasta el momento para *N. ceranae* es la horizontal, los datos presentados en el presente trabajo parecen coincidir con las interpretaciones citadas. Al carecer *N. ceranae* de transmisión vertical, el establecimiento de la enfermedad en una colonia a lo largo del tiempo estaría posibilitado por el reciclado constante de esporos dentro de la misma.

Los datos (especialmente de la primera temporada) también indican una heterogeneidad temporal en la aparición de eventos epizoóticos respecto a las diferentes zonas de estudio. Por lo tanto, si bien la existencia de dichos eventos podría ser considerado un fenómeno esperable (Lange, 2003), aún resulta imposible realizar predicciones en torno al momento de los mismos, su magnitud y la evolución de la enfermedad en los apiarios.

Las prevalencias medias de cada zona en particular no mostraron *a priori* una tendencia definida acerca de diferencias relacionadas a la latitud. Serán necesarias más temporadas de estudio y eventuales correlaciones con factores externos (*e.g.*: climáticos) para detectar tendencias en este aspecto.

Carga parasitaria (esporos/abeja)

En la presente tesis se han registrado valores medios de *N. ceranae* entre $16,5 \times 10^6$ y $19,6 \times 10^6$ esporos/abeja dependiendo la temporada. El valor promedio obtenido a lo largo de todo el estudio fue de $18,16 \times 10^6$ esporos/abeja (Pág. 62). Trabajos previos citan valores medios de hasta 25×10^6 esporos de *N. ceranae* por abeja en condiciones naturales (Higes *et al.*, 2008b; Williams *et al.*, 2008b), coincidiendo con los obtenidos en este trabajo.

Si bien clásicamente se consideró que el valor de esporos/abeja guardaba relación directa con el estado sanitario general de una colmena (*e.g.*: Furgala & Hyser, 1969), en los últimos años se ha propuesto que, tanto para *N. apis* (Fries, 1988) como para *N.*

ceranae (Higes *et al.*, 2008b; Martín-Hernández *et al.*, 2009b; Meana *et al.*, 2010) esto no sucedería, sino que una evaluación del porcentaje de abejas infectadas brindaría mayor información.

El uso de la técnica de tipo compuesta (Pág. 46) ha permitido determinar una correlación positiva entre el número de esporos/ml. y el porcentaje de abejas infectadas en una muestra ($R^2 = 0,865 \pm 0,019$; $N = 17$). Fueron menores las correlaciones entre el número de esporos/ml. y el número de esporos/abeja ($R^2 = 0,464 \pm 0,076$; $N = 17$), así como entre el número de esporos/abeja y la prevalencia de abejas infectadas ($R^2 = 0,337 \pm 0,061$; $N = 17$). Así, un homogenato de abejas con un gran número de esporos se correspondería con una cantidad proporcional de abejas con infecciones medias, y no con unas pocas con infecciones muy desarrolladas, de acuerdo con Fries (1988).

Estos resultados, si bien en contraposición a estudios anteriores enfocados en *N. apis* (Doull, 1965), coincidirían con los reportados por L'Arrivéé (1963b), Bailey (1968), Fingler *et al.* (1982), Fries (1988) y Kauko *et al.* (2002) también para esa especie, y podrían explicarse imaginando un nivel o umbral de tolerancia por parte del hospedador hacia el patógeno, tal como ha sido propuesto por L'Arrivéé (1965b) y Malone *et al.* (1992).

Presencia/ausencia

Los estudios realizados en el siglo pasado consideraron a *N. apis* el agente etiológico de la enfermedad al describir la epidemiología y patología de la nosemosis en todo el mundo. Los informes de su dinámica están relacionados con niveles bajos de presencia y prevalencia durante el verano, picos generalmente pequeños en otoño y/o invierno y un súbito e importante aumento de casos a inicios de la primavera, posterior al confinamiento invernal y paralelo al inicio de la postura de huevos por parte de la reina (Cornejo & Rossi, 1974; Sarlo, 2002a; Martín-Hernández *et al.*, 2007). Por el contrario, se considera que las fluctuaciones anuales de los casos y la prevalencia de *N. ceranae* parecen carecer de una estacionalidad marcada, a

diferencia de la experimentada por *N. apis* (Doull, 1961; Doull & Cellier, 1961; Dyess & Wilson, 1978; Kwei & Ho, 1981; Fries, 1993; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2010b).

Análisis realizados en España a lo largo de seis años mostraron que en la estacionalidad de la nosemosis registrada en la primer mitad del estudio se fue allanando en forma paralela a la abundancia de muestras positivas a *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2007) (Fig. 34). En adición, las fluctuaciones de esta enfermedad clásicamente relacionada con los valores de precipitación (Dyess & Wilson, 1978), dejó de corresponderse con éstos los últimos años del estudio, sugiriendo una independencia entre ellos (Martín-Hernández *et al.*, 2007).

Los datos obtenidos en esta tesis muestran que los valores medios de la primera y segunda temporada de estudio [68,6% (2006-07) y 63,5% (2007-08)] casi no difieren, no así el valor correspondiente a la última de ellas (2008-09), menor a la mitad de los anteriores (30,4%). Si bien los mayores porcentajes de las dos primeras temporadas se observaron en el mes de noviembre, tampoco se individualizan como los eventos o picos súbitos primaverales reportados para *N. apis*.

Por lo tanto, los resultados provenientes de la región Pampeana parecerían mostrar coincidencia en la escasez o ausencia de estacionalidad, pero revelarían una tendencia inversa a la registrada en España en cuanto al número de muestras positivas (Fig. 34). Al respecto, Martín-Hernández *et al.* (2007) han propuesto que la presencia de *N. ceranae* en Europa sugiere una colonización exitosa, pero aún desprovista de equilibrio con su nuevo hospedador, *A. mellifera*, lo que generaría las disparidades en su comportamiento. Estos autores propusieron que *N. ceranae* se hallaría en España desde hace aproximadamente una década. Casi paralelamente, otros estudios han determinado que *N. ceranae* se encuentra en Europa al menos desde 1996 (Paxton *et al.*, 2007).

Debido a que en Sudamérica la presencia de esta especie se ha registrado en muestras colectadas antes del año 1990 (Invernizzi *et al.*, 2009), cabría pensar que su establecimiento pudo haberse llevado a cabo antes que en Europa y que la asociación

N. ceranae - *A. mellifera* estaría adquiriendo, o bien ya habría adquirido un mayor grado de equilibrio. En vista de no contar con muestras de *A. mellifera* conservadas adecuadamente como para realizar un análisis retrospectivo, el presente trabajo representa un punto inicial para el monitoreo de *N. ceranae* en nuestro país.

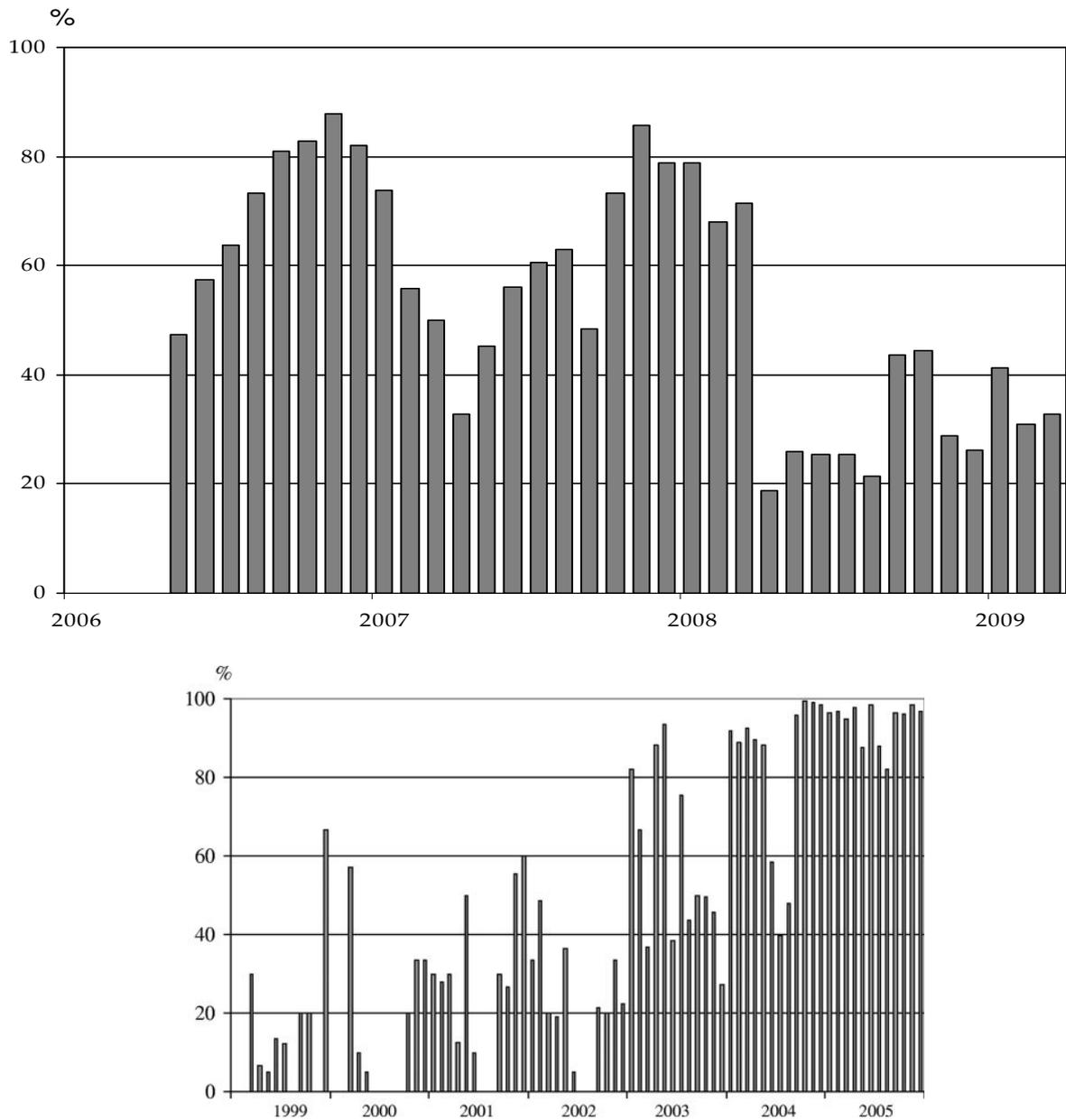


Figura 34 – Porcentajes de muestras positivas a *Nosema ceranae* desde 2006 hasta 2009, en relación al número de muestras analizadas en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), Argentina. Debajo, la misma relación realizada en base a las muestras analizadas en Laboratorio de Patología Apícola de Marchamalo, España. (Martín-Hernández *et al.*, 2007. Incluido bajo autorización de los autores).

Nosema ceranae y el Síndrome de Despoblamiento de Colmenas (S.D.C.)

Este fenómeno produce una inexplicable desaparición de las abejas adultas, desatención de las crías por parte de las abejas nodrizas, reducción del vigor general de la colmena, acentuada tasa de mortalidad invernal sin patologías aparentes, descenso en la producción de miel y finalmente el deceso de la colonia. Los insectos muertos, curiosamente, no se encuentran dentro de la colmena ni en sus cercanías.

Debido a que dichos síntomas son inespecíficos, la afección es difícil de detectar a tiempo y comúnmente confundida con otras (Underwood & vanEngelsdorp, 2007). El S.D.C. se ha observado casi simultáneamente en distintos países desde *ca.* 2006, y especialmente en Estados Unidos, Japón y gran parte de Europa se habrían registrado los mayores valores de mortandad de abejas (Higes *et al.*, 2006b, 2009a; Ratnieks & Carreck, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Aún no existe una respuesta definitiva en torno a los posibles agentes involucrados y el responsable principal de este síndrome sigue siendo una incógnita.

Existen trabajos sosteniendo que el causante principal del S.D.C. sería *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008b, 2009b, 2010a). Inoculaciones de esporos realizadas en *A. mellifera* bajo condiciones controladas provocaron altos valores de mortalidad y ausencia de signos externos en el insecto. En comparación con *N. apis*, *N. ceranae* presentó una virulencia y agresividad mucho mayor¹⁸ (Higes *et al.*, 2006a, 2007, 2008b). Un análisis epizootiológico con datos de campo demostró que el efecto de *N. ceranae* sería aumentar entre 6 y 10 veces el riesgo de una colonia de padecer el citado síndrome (Martín- Hernández *et al.* 2007; Higes *et al.*, 2009b).

Otros investigadores han minimizado la responsabilidad de *N. ceranae* en el S.D.C., o lo han considerado uno más de los múltiples factores causantes. Tanto la varroasis y su efecto como vector del virus israelí de la parálisis aguda (IAPV, *Israeli Acute Paralysis Virus*), como la acción de insecticidas (*e.g.*: imidacloprid, fipronil, endosulfán, cipermetrina) o herbicidas (*e.g.*: glifosato) parecen ser otros de los

¹⁸ Discutido por ciertos autores debido a que los tratamientos no se realizaron en idénticas condiciones (ver Fries, 2009).

factores actuantes más plausibles. También los factores climáticos o nutricionales, otros patógenos, o la expansión de agroecosistemas, monocultivos y cultivos de organismos genéticamente modificados son algunas hipótesis alternativas postuladas como responsables de este fenómeno (Chauzat *et al.*, 2007; Cox-Foster *et al.*, 2007; Gómez Pajuelo *et al.*, 2008; Oldroyd, 2007; Underwood & vanEngelsdorp, 2007; Decourtye *et al.*, 2009; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Paxton, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

En Argentina se han observado fenómenos de despoblamiento acentuados desde el año 2006, y especialmente en el invierno de 2007 (González, 2007; Petit, 2007), coincidentes con altos valores de prevalencia de *N. ceranae* obtenidos y presentados en este trabajo. Oficialmente se ha desestimado la correspondencia de estas mermas poblacionales con el S.D.C., apuntando a un conjunto de factores formado por varroasis, nutrición deficiente y abuso de pesticidas como el responsable primario de los mismos (Bacci, 2007 –SENASA-).

***Nosema ceranae* en *Bombus* spp.**

Los resultados presentados constituyen los primeros registros a nivel mundial del microsporidio *N. ceranae* parasitando especies de *Bombus* (*B. atratus*, *B. morio* y *B. bellicosus*).

Este microsporidio se consideraba patógeno de *A. cerana* (Fries *et al.*, 1996) y *A. mellifera* (Higes *et al.*, 2006a), y se reconocía a *Nosema bombi* (Fantham & Porter, 1914) como la única especie de microsporidio capaz de infectar especies de *Bombus* (Van den Eijnde & Vette, 1993; McIvor & Malone, 1995; Jilian *et al.*, 2005; Paxton, 2006; van der Steen & Fries, 2006)¹⁹. A diferencia de *N. ceranae*, *N. bombi* normalmente se desarrolla en los túbulos de Malpighi, aunque se han hallado infecciones en el ventrículo, cuerpo graso y cerebro (Fries *et al.*, 2001; van der Steen, 2006). En la

¹⁹ Si bien, al menos experimentalmente, *B. fervidus* sería susceptible también a *N. apis* (Showers *et al.*, 1967).

página 113 se discutirán posibles aspectos relativos la ausencia de detecciones en el país.

Cuando se evalúan en conjunto los datos cuantitativos obtenidos, la presencia de esporos solo en el intestino medio, y las lesiones macroscópicas presentadas en el mismo, es lógico pensar que *Bombus* se hallaría cumpliendo un rol de hospedador activo de *N. ceranae*, y no solo de vehículo u hospedador accidental.

Una primera evaluación en torno a las cargas parasitarias indicaría una notable predisposición de las reinas de *B. morio* a desarrollar la infección, debido a los mayores valores contabilizados en comparación con las reinas de *B. atratus*. El tamaño corporal no parecería, *a priori*, ser una limitante, debido a la similitud presentada en ese aspecto por ambas especies (Abrahamovich, *et al.*, 2005). Tampoco la época del año en la que fueron colectados los insectos parece serlo, debido a que las seis reinas fueron capturadas en un lapso menor a 60 días (9/09/2007 a 2/11/2007).

Eventualmente la latitud podría tener algún tipo de influencia en este sentido, debido a que ambas reinas de *B. morio* fueron capturadas en la provincia de Tucumán, mientras que todas las de *B. atratus* provinieron de la provincia de Buenos Aires (Fig. 11 – Tabla IV). Posiblemente un inicio temprano de la temporada en el Norte haya permitido a este patógeno contar con mayores tiempos para desarrollar la infección.

Al no haberse detectado obreras ni machos de *B. morio* parasitados, tampoco es posible generalizar aún una mayor predisposición a *N. ceranae* en todas las castas de la especie.

Por otra parte, no se descarta que las especies en las que no se ha aislado *N. ceranae* sean también susceptibles en mayor o menor medida, solo que aún no han sido capturados ejemplares enfermos.

Rango hospedador de Nosema ceranae

En el último año se han reportado infecciones naturales de *N. ceranae* en otras tres especies de *Apis* [*A. koschevnikovi*, *A. dorsata* y *A. florea* (Botías *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2010)]. Las infecciones de *N. ceranae* reportadas en cinco especies de este género y ahora en tres especies de *Bombus* sugerirían una baja especificidad, característica poco habitual entre los microsporidios (Larsson, 1999), aunque no desconocida (Lange, 2005). Previamente, a partir de estudios coevolutivos basados en caracteres moleculares, se había sugerido una potencial capacidad de *N. ceranae* de parasitar activamente una o más especies de *Bombus*, lo que se confirmó en el presente trabajo (para mayor detalle, véase Shafer *et al.*, 2009).

En este sentido, también resultan de interés recientes hallazgos de una gran variabilidad genética intraespecífica tanto en *N. ceranae* (Sagastume *et al.*, 2010) como en la especie afín *N. bombi* (Tay *et al.*, 2005), posiblemente relacionada con el amplio rango hospedador de ambas. Esta gran variabilidad, instalada en un genoma muy reducido podría brindar a estas especies de *Nosema* una notable plasticidad en las interacciones patógeno-hospedador, sugiriendo la factibilidad de futuros hallazgos en nuevas especies hospedadoras.

El intercambio de *N. ceranae* entre especies estaría posibilitado por diferentes vías, tales como el forrajeo (Schmid-Hempel & Loosli, 1998), el agua de bebida (Ringuelet, 1947; L'Arrivée, 1965a), o el pillaje²⁰ sobre colonias enfermas (Goulson *et al.*, 2008). Las aves insectívoras también parecerían jugar un importante rol en este aspecto al ingerir insectos infectados y regurgitar esporos viables a lo largo de sus vuelos migratorios, como se ha descrito en España para el abejaruco común *Merops apiaster* (Coraciiformes: Meropidae) (Higes *et al.*, 2008a; Valera *et al.*, 2010). Aves con roles ecológicos similares podrían estar realizando lo propio en este continente.

²⁰ Conducta de hurto de reservas de una colmena por abejas ajenas a ésta, generalmente ante la escasez de néctar. Puede culminar en un ataque violento e incluso en la destrucción de la colonia agredida.

Por lo tanto, al comprobarse en este estudio que el rango de especies susceptibles es más amplio aún del que se pensaba, se pone en duda que su hospedador de origen o natural sea de hecho *A. cerana* y no alguna especie de *Bombus* sudamericana, área de donde provienen las muestras positivas más antiguas de este patógeno (Invernizzi *et al.*, 2009).

Nephridiophaga apis

Los rasgos morfológicos del protista aislado en colmenas de Saavedra (esporos bicóncavos; Fig. 24-D, E) y el tipo de relación simbiótica con el hospedador, parasitando los túbulos de Malpighi indican que el mismo pertenece a la familia Nephridiophagidae. El hallazgo de cúmulos esporales (Fig. 24-A, B) sumado a la identidad de la especie hospedadora, sugieren fuertemente que se trata de *Nephridiophaga apis* Ivanić, 1937, especie tipo del género.

Las especies de la familia Nephridiophagidae se consideran simbiontes en los túbulos de Malpighi de insectos, mayormente de los órdenes Dictyoptera y Coleoptera (Lange, 1993). Esta familia ha permanecido desde hace más de cien años como un grupo de filiaciones taxonómicas inciertas. Sus especies integrantes fueron incluidas en la familia Haplosporidiidae (Protozoa: Haplosporea) desde fines del siglo XIX hasta 1965-1970 (Caullery & Mesnil, 1899, 1905; Kudo, 1931; Caullery, 1953). Posteriormente, Sprague (1966, 1970) distribuyó a esas especies en dos familias, Haplosporidiidae y Nephridiophagidae, e incluyó a la clase Haplosporea en el *subphylum* Microspora. El mismo autor rechazó años después esta última familia (Sprague, 1979). Más tarde, Lange (1993) la restituyó al status de familia [Nephridiophagidae (Protista *incertae sedis*)] si bien haciendo notar que la misma difiere sustancialmente de los otros phyla esporogénicos existentes, de modo que reuniría suficientes condiciones para erigirse como un nuevo *phylum*. Sin embargo, este autor desestima su instauración hasta no contar con estudios ultraestructurales de la especie tipo, en vista de evitar un aumento de categorías taxonómicas (*rank inflation*), coincidiendo con Patterson & Larsen (1991) y Radek & Herth (1999).

A fines del siglo pasado, la detección de divisiones criptomitóticas en *N. blatellae* sugirieron un vínculo filogenético con los hongos (Radek & Herth, 1999). Poco después, análisis moleculares del mismo organismo, sumados a la detección de quitina fúngica en la composición de la pared de sus esporos, confirmarían esta posición (Wylezich *et al.*, 2004). Actualmente, la familia Nephridiophagidae Sprague,

1970 posee el status de *sedis mutabilis* dentro de la superclase Ascomycota (Opisthokonta: Fungi) (Hausman *et al.*, 2003).

Nephridiophaga apis fue caracterizada morfológicamente en todos sus estadios, así como el desarrollo de su ciclo (Ivanić, 1937). Si bien limitada por el instrumental óptico de la época, la descripción original concuerda con la observada posteriormente en especies afines (Lange, 1993; Radek & Herth, 1999; Fabel *et al.*, 2000), caracterizada por una alternancia de estados uninucleados y plasmodiales, gemación endógena de estos últimos y formación de esporos cóncavos o bicóncavos que se liberan en la luz de los túbulos de Malpighi.

En el caso de *Neph. apis*, el ciclo se cumpliría intra y extracelularmente, al igual que en las especies afines *N. blaberi*, *N. blatellae* y *N. forficulae*, y a diferencia de *N. ormieresi* y *N. periplanetae*, donde el mismo no parece poseer fase intracelular (Lange, 1993; Fabel *et al.*, 2000).

Una interesante particularidad radica en el análisis de la patogenicidad de este parásito. Si bien se cita como muy peligroso, capaz de provocar lisis en las células de los túbulos transformándolas en una masa amorfa (Ivanić, 1937), la descripción original habría sido basada solo en un caso. Por otro lado, observaciones realizadas en *Periplaneta americana* (Hexapoda: Blatodea) parasitadas con *N. periplanetae* sugieren una relación de comensalismo entre ambas especies (Lange, 1993). De esta forma, si la alta prevalencia en la naturaleza mostrada por *N. periplanetae* (Lange, 1993) concordaría con la de una especie comensal o de relativamente baja virulencia, de modo inverso la baja prevalencia observada en *Neph. apis* podría estar brindando indicios de alto potencial de daño en *A. mellifera* (Henry, 1977).

Por otro lado, la transmisión de *Neph. apis*, así como de las demás especies de la familia parece realizarse exclusivamente por vía horizontal (Lange, 1993; Fabel *et al.*, 2000). Este hecho torna aún más enigmática la escasez de sus hallazgos, teniendo en cuenta los hábitos sociales desarrollados por el hospedador en los que la trofalaxia y el acicalamiento o *grooming* son las principales vías de contagio de otras enfermedades apícolas (L'Arrivée, 1965a; Webster, 1993; Fries & Camazine, 2001),

provocando una rápida diseminación del inóculo dentro de la colonia. Otros fenómenos comunes como el pillaje, la deriva²¹, el comportamiento de los zánganos²² o el manejo del apicultor también contribuirían a una rápida dispersión de la enfermedad entre distintas colonias (Ringuelet, 1947; Bailey, 1972; Root, 1990) tal como sucede en la nosemosis (COLOSS Workshop, 2009). En este estudio, si bien las cinco colmenas analizadas en el apiario Nuevo Lucero se hallaron infectadas, no se registró a este parásito en los demás apiarios de la zona, aún cuando pertenecían al mismo propietario y era corriente el intercambio de material apícola entre éstos.

Con respecto a las cargas parasitarias por abeja, así como a las medidas de los esporos, no existe antecedente alguno a fin de realizar comparaciones con los datos presentados. Únicamente se cita a la primavera como la época más propicia para la enfermedad (Ivanić, 1937), lo que concordaría en primera instancia con los resultados del presente trabajo, ya que dicha estación fue el único período en el cual se halló a este patógeno. Por su parte, el registro de co-infecciones con *Nosema ceranae* mostró una alta prevalencia, la que podría estar sugiriendo una acción sinérgica entre estas dos especies.

Es complejo, por último, esgrimir una explicación convincente acerca de la existencia de solo dos hallazgos de este protista, separados por *ca.* 70 años y 12.000 Km. de distancia. Una alternativa plantea que la especie registrada podría no ser en realidad *Nephridiophaga apis*, sino otra de la misma familia. Esta hipótesis, si bien poco probable, requerirá de pormenorizados estudios futuros para su validación o rechazo. Otro de los posibles motivos sería la similitud en forma y tamaño con especies de *Nosema* citadas para *A. mellifera*; un análisis poco minucioso y realizado por alguien no familiarizado con la existencia de *Neph. apis*, podría generar un diagnóstico erróneo, aún en infecciones conjuntas (Véase fig. 24-G).

²¹ Entrada por error de una abeja en otra colmena a la que no pertenece. Generalmente es rechazada por las abejas de ésta, aunque en ocasiones no ocurre.

²² Los zánganos entran indistintamente a cualquier colmena sin ser agredidos.

Por último, otra opción viable es que este organismo mantendría, de hecho, una prevalencia extremadamente baja en la naturaleza, atribuyendo más valor aún al presente hallazgo.

Debido a la escasa información disponible en la descripción original de *Neph. apis* y a que desde su detección y descripción en la antigua Checoslovaquia parece no haber reportes documentados de su presencia en otras partes del mundo, este aporte amplía la distribución de la familia Nephridiophagidae, constituyendo el primer registro de una especie de Nephridiophagidae asociada a *A. mellifera* fuera del continente europeo.

Malpighamoeba mellificae

Malpighamoeba mellificae fue hallada por primera vez a principio de siglo XX (Maassen, 1916, 1919) y descrita poco después, asignándosele en primera instancia al género *Vahlkampfia* (Prell, 1926, 1927). Actualmente se clasifica al género *Malpighamoeba* como *Amoebozoa incertae sedis*, debido a que si bien comparte caracteres típicos del grupo como la presencia de pseudópodos, posee otros que dificultan su ordenamiento (Adl *et al.*, 2005).

Su ciclo de vida, si bien no del todo conocido, consta de una fase vegetativa que infecta el epitelio intestinal, donde se divide. Los trofozoítos resultantes migran por el interior del tubo digestivo hasta los túbulos de Malpighi, donde se interdigitan con las microvellosidades de su epitelio y provocan lisis celular, disminuyendo o anulando la capacidad excretora del insecto y causando su intoxicación. Eventualmente, estos trofozoítos forman cuerpos de resistencia llamados **quistes**, los cuales se liberan a la luz del túbulo y luego al exterior, donde serán ingeridos por otra abeja para recomenzar el ciclo. No se conoce fase sexual (Giordani, 1959; Schwantes & Eichelberg, 1984).

Malpighamoeba mellificae ha sido hallada en Europa (Giordani, 1959; Schwantes & Eichelberg, 1984; Orantes, 2000; Janke & Rosenkranz, 2008), Norteamérica (Bulger, 1928), Asia (Aydin *et al.*, 2006), Oceanía (Anderson, 1987, 1990), África (Buys, 1993) y Sudamérica (Guardiola, 2002), considerándosele cosmopolita. En este trabajo, tanto las características morfométricas como los signos macroscópicos observados [*e.g.*: túbulos de Malpighi color blanco-lechoso (Schwantes & Eichelberg, 1984)] y la ubicación tisular de los parásitos hallados coinciden con la descripción original de la especie constituyendo su primer registro en Argentina.

Los estudios relacionados con *M. mellificae* no abundan, debido posiblemente al consenso existente relacionado a su baja virulencia en apiarios comerciales. Aparentemente, de no mediar una infección severa [más del 50 % de sus abejas infectadas (Hassanein, 1952)], *M. mellificae* no sería capaz de ultimar una colonia

vigorosa pero tendría la capacidad de debilitarla facilitando la susceptibilidad a otros agentes (Aydin *et al.*, 2006). Así, *M. mellifica*e se hallaría comúnmente formando infecciones mixtas con *N. apis* (Giordani, 1959; Aydin *et al.*, 2006), conformando una asociación sinérgica (Bailey, 1968; Fritsch & Bremer, 1975). En este estudio, la colmena que se halló infectada por este patógeno también lo estaba con *N. ceranae* (Prevalencia = 1 %). Al mes siguiente, si bien no se halló a *M. mellifica*e, la prevalencia de abejas con *Nosema* trepó a 27 %. La colmena finalmente murió antes del muestreo correspondiente al mes de diciembre.

Si bien el hallazgo de una única abeja infectada en San Carlos de Bariloche no aportaría información suficiente para sustentar un análisis, los casos positivos registrados en San Cayetano en el mes de octubre guardarían concordancia con observaciones previas realizadas en apiarios del hemisferio Norte (Hassanein, 1952; Giordani, 1959; Bailey & Ball, 1991; Janke & Rosenkranz, 2008). Estos trabajos reportan los mayores niveles de *M. mellifica*e durante el mes de abril (mediados de la primavera boreal), para luego desaparecer, la más de las veces, sin mayores consecuencias. Se estima que el tiempo de vida de las abejas de verano no sería suficiente para que *M. mellifica*e pueda completar su ciclo exitosamente, lo que sí ocurriría en las abejas de invierno o de larga vida (Giordani, 1959; Bailey & Ball, 1991).

A partir de la detección de co-infecciones, se plantea la necesidad de una evaluación acerca de los posibles sinergismos o antagonismos entre estos patógenos, tal como se ha ensayado para infecciones conjuntas de *M. mellifica*e y *N. apis* (Bailey, 1968; Fritsch & Bremer, 1975; Grobov & Bondarenko, 1975). Si bien el número de abejas infectadas (n = 10) podría no ser representativo, el porcentaje de abejas co-infectadas con *Nosema* (10%) no diferiría sustancialmente de los valores reportados previamente de 10 – 15% para infecciones mixtas con *N. apis* (Giordani, 1959).

Respecto del escaso número de casos registrados, los reportes previos de *M. mellifica*e en Europa también detallan bajas prevalencias [*e.g.*: 1,85% en España (Orantes, 2000), 2% en Inglaterra (Bailey & Ball, 1991) y hasta 2,8% en Italia

(Giordani, 1959)], siendo posible que este patógeno muestre una condición enzoótica (Giordani, 1959). No obstante, prospecciones llevadas a cabo en Alemania, han registrado prevalencias excepcionales de hasta 25% (Janke & Rosenkranz, 2008).

En Argentina resulta llamativo que a pesar del elevado número de colmenas emplazadas en el país, y los consecuentes análisis de rutina llevados a cabo, esta ameba nunca ha sido reportada. En esta tesis, ca. 400.100 abejas fueron analizadas y el hallazgo de *M. mellificae* en solo dos muestras (10 abejas) plantea más de una alternativa. O bien una baja prevalencia del parásito en la naturaleza, o bien una prevalencia no demasiado baja pero en la que el parásito, por distintas causas, no ha sido registrado en la población.

Una de estas posibles razones residiría en que, como otras amebas, *M. mellificae* podría permanecer por tiempo prolongado en estado de trofozoíto. En ausencia de quistes, su detección presenta cierta dificultad al confundírseles con el contenido normal de los túbulos de Malpighi (Giordani, 1959; Lange, *com. pers.*), incurriendo en posibles sub-diagnósticos. Así, tanto en Argentina como en otros países, la ausencia o baja prevalencia reportada en la mayoría de los casos podría deberse a “falsos negativos”, así como su inespecífica sintomatología (*e.g.*: abdomen hinchado, disentería) podría ser erróneamente atribuida a otro agente etiológico, en particular a *N. apis* (Fritsch & Bremer, 1975; Schwantes & Eichelberg, 1984).

La carga promedio de quistes/abeja contabilizada ($4,95 \pm 0,86 \times 10^5$) parece ser la primera reportada desde su detección, ya que los trabajos referentes a *M. mellificae* parecen obviar esta cuantificación. Se desconoce la existencia y límites de un posible umbral de daño por parte del patógeno hacia *A. mellifera*.

A nivel de la población hospedadora, se ha citado que *M. mellificae* no suele mostrar una distribución de tipo agregada en un colmenar sino que, de presentarse, es común hallar una o dos colmenas infectadas sin ninguna aparente relación espacial entre ellas (Giordani, 1959). Lo propio se ha verificado en este trabajo, al permanecer cuatro de las cinco colmenas del apiario analizado, libres de esta ameba.

Por último, resulta de particular interés que *M. mellificae* sea un patógeno comúnmente hallado en Chile. Si bien su prevalencia en diferentes localidades es en general inferior al 9% (Guardiola, 2002; Hinojosa & González, 2004; Fuentealba, 2005), se han reportado valores de hasta casi 18%, los cuales corresponden a estudios en la décima región, hallada a igual latitud que San Carlos de Bariloche pero al otro lado de la cordillera de los Andes (Fuentealba, 2005). Antecedentes en la misma zona, como la invasión de la especie *Vespula germanica* (Vespidae) y *Acromyrmex lobicornis* (Formicidae) (Willink, 1980; Farji Brener & Corley, 1998), o la entrada de *Bombus terrestris* y *B. ruderatus*, posiblemente vehiculizando patógenos exóticos (Roig-Alsina & Aizen, 1996; Torreta *et al.*, 2006; Plischuk & Lange, 2009), sugerirían un posible ingreso de esta ameba junto a *A. mellifera* desde el país vecino. No obstante, resulta intrigante que *M. mellificae* se ha hallado en San Cayetano y no en puntos de muestreo intermedios entre esta localidad y San Carlos de Bariloche.

Crithidia bombi

Con respecto a los patógenos hallados en abejorros de San Carlos de Bariloche, tanto la especie hospedadora como los sitios de infección y su morfología general, sugieren que se trata de *Crithidia bombi* Lipa & Triggiani, 1988, un patógeno hallado parasitando a especies de *Bombus* en otras partes del mundo. *Crithidia bombi* se ha considerado como un patógeno poco virulento y común en *B. terrestris* (Baer & Schmid-Hempel, 2001). Sin embargo, estudios recientes han demostrado una relación entre su virulencia y las condiciones nutricionales del hospedador (Johnson, 2007; Otterstatter & Thomson, 2008, y otros). Las formas flageladas se adosan a la pared de la última porción del ventrículo, donde se multiplican. Pocos días después de la infección, los patógenos se vehiculizan al exterior mediante las heces del hospedador pudiendo reinfectar a otros individuos (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1993). Ruiz-González & Brown (2006) han demostrado que también *A. mellifera* podría actuar como vector u hospedador accidental de este flagelado.

Debido a que los abejorros carecen de trofalaxis (Schmid-Hempel, 2001; Molet *et al.*, 2009), *C. bombi* no podría transmitirse directamente. La propagación de la infección dentro de la colonia se logra mediante el contacto con las formas infectantes dentro del panal de cría, mientras que la difusión de la misma entre las colonias parece ser más compleja. Posiblemente, obreras infectadas entren erróneamente en otros nidos, dispersando así la enfermedad, en una suerte de **deriva**, análoga a la citada para *A. mellifera* (Sakofski & Koeniger, 1988; Root, 1990). Sin embargo, la ruta más importante para la transmisión ente colonias parece ser a través de la pecorea. Estudios experimentales han demostrado que un insecto sano podría recoger el inóculo previamente depositado por un abejorro infectado (Durrer & Schmid-Hempel, 1994; Ruiz-González & Brown, 2006). Este tipo de pasaje ocurriría en el 20-40% de los casos y guardaría relación con la arquitectura de la flor o inflorescencia y con la exposición de los patógenos a la luz solar directa.

En una colonia infectada, mantenida en condiciones controladas y alimentación *ad libitum*, *C. bombi* no manifestaría mayor virulencia. Por el contrario, se ha observado que al emerger las reinas de la hibernación y escasear el alimento, la infección por *C. bombi* reduciría su capacidad individual para iniciar la colonia y el desarrollo normal de la misma por alterar la capacidad de forrajeo entre otras patologías. En situaciones de déficit nutricional severo, el aumento de la tasa de mortalidad de la colonia afectada aumentaría en un 50% (Shykoff & Schmid-Hempel, 1991; Brown *et al.*, 2000, 2003; Schmid-Hempel, 2001; Logan *et al.*, 2004; Gegear *et al.*, 2005, 2006). Paralelamente, se ha propuesto que el genotipo de la colonia guardaría relación con la probabilidad de infección, la susceptibilidad a ésta y la eficaz transmisión de *C. bombi* (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1993; Liersch & Schmid-Hempel, 1998; Brown *et al.*, 2003).

En el presente caso, las relativamente altas cargas parasitarias registradas sugieren que las infecciones fueron detectadas en un estado avanzado de desarrollo, es decir que la población analizada podría considerarse, aunque preliminarmente, como receptora y posiblemente susceptible a este patógeno. Es limitada la información de estudios de campo detallando cargas parasitarias de *C. bombi*. Solo Baer & Schmid-Hempel (2001) citan una intensidad de $1 - 2,5 \times 10^6$ flagelados por obrera de *B. terrestris*, unas diez veces mayor a la media registrada en este trabajo ($1,4 \times 10^5$). Sin embargo, como las reinas fundadoras de las colonias estudiadas habían sido fecundadas artificialmente, ambos estudios podrían no ser comparables.

Por otra parte, se cree que las formas promastigotas serían más abundantes en etapas iniciales de la infección, al menos en abejorros con buen estado nutricional (Logan *et al.*, 2004). Asumiendo un curso normal de la infección y una disponibilidad suficiente de polen en los sitios de colecta, la ausencia de formas promastigotas en el presente trabajo también podría estar indicando estados avanzados de la enfermedad.

Con relación a la prevalencia registrada (21,5%), la misma se incluye en el rango de valores reportados (9 - 83%) para esta especie en *B. terrestris* (Shykoff & Schmid-Hempel, 1991; Çankaya & Kaftanoglu, 2006; Allen *et al.*, 2007).

En lo que respecta a la prevalencia propia de cada casta, *C. bombi* mostró un mayor valor en hembras (obreras: 55%; reinas: 50%) que en machos (4%). Posiblemente la infección durante la pecorea juegue un papel de importancia en este aspecto, debido a diferencias en el número de visitas, tiempo de permanencia y manipuleo de las hembras sobre las flores. Otras alternativas residirían en una mayor predisposición genética propia de las hembras, o bien en un mayor tiempo de permanencia en el nido e interacción con los integrantes de la colonia por parte de estas con respecto a los machos (Shykoff & Schmid-Hempel, 1991). Los resultados presentados coinciden con los obtenidos en Suiza por estos últimos autores.

A pesar de las diferencias de tamaño entre los aislamientos de Argentina (del presente estudio) y de Italia (descripción original) (Tabla VI), el hallazgo de infecciones naturales en su hospedador original *B. terrestris* así como las similitudes en las características morfológicas y en la ubicación tisular tienen suficiente peso como para asumir que se trata de la especie en cuestión. La desigualdad de tamaños podría estar explicada por las diferencias en los procedimientos utilizados al realizar los preparados o las fijaciones. Otra alternativa factible residiría en la presencia de diferentes genotipos (variabilidad intraespecífica) tal como se ha descrito para *C. bombi* en Suiza (Schmid-Hempel & Reber Funk, 2004). De modo que, aunque el presente registro pueda ser calificado como provisional hasta que estudios de tipo molecular sean optimizados y aplicados (Meeus *et al.*, 2009), resulta pertinente informar sobre el mismo, ya que no existe registro alguno de flagelados asociados a *Bombus* de Sudamérica.

Apicystis bombi

El conocimiento de *Apicystis bombi* es mucho menor que el que se tiene acerca de *C. bombi*. Esta neogregarina fue descrita parasitando especies de *Bombus* en Canadá, y asignada al género *Mattesia* (Liu *et al.*, 1974). Dos décadas después, Lipa y Triggiani (1996) redescubrieron a la especie como *Apicystis bombi* n. comb., hallándola en Italia, en las especies *B. hortorum* y *B. terrestris*, así como en Finlandia, parasitando un individuo de *A. mellifera*. La exclusión del género *Mattesia* fue recientemente confirmada mediante estudios moleculares (Meeus *et al.*, 2009). En la actualidad, se la incluye en la familia Lipotrophidae, dentro del orden Neogregarinorida (Meeus *et al.*, 2009).

En su ciclo, los esporozoítos emergen en el intestino a partir de ooquistes ingeridos por el hospedador. Estos esporozoítos penetran a través de la pared del intestino medio en la cavidad del cuerpo e infectan las células de los cuerpos grasos donde crecen y se multiplican asexualmente hasta diferenciarse en merozoítos, tanto macro como micronucleados. Mediante procesos de gametogonia, se producen ooquistes tetranucleados los cuales pueden producir reinfecciones (Lipa & Triggiani, 1996). Liu *et al.* (1974) reportaron la presencia de ooquistes en las espermatecas de las reinas grávidas indicando una posible vía de transmisión congénita o vertical. Si bien se infiere una vía horizontal, aún se desconoce.

Este patógeno se considera causante de graves efectos físicos (destrucción del tejido graso) y comportamentales (reducción del éxito en el establecimiento de la colonia, aumento de las tasas de mortalidad de obreras, conflictos en la comunicación entre reina y obreras) (Schmid-Hempel, 1998, 2001; Allen *et al.*, 2007).

Prácticamente se carece de datos epizootiológicos referidos a *A. bombi* y se estima que este patógeno posee, en general, una baja prevalencia. Se lo ha registrado en 11 especies de *Bombus* (*B. affinis*, *B. bimaculatus*, *B. fervidus*, *B. griseocollis*, *B. hortorum*, *B. impatiens*, *B. perplexus*, *B. pratorum*, *B. terrestris*, *B. terricola*, y *B. vagans*) y en *A. mellifera* (Liu *et al.*, 1974; Lipa & Triggiani, 1996; Baer & Schmid-Hempel, 1999;

Rutrecht & Brown, 2008; Meeus *et al.*, 2009). La prevalencia hallada en el presente estudio (3,5%) no parece diferir sustancialmente de las reportadas en Suiza (1 - 8%), Irlanda (3,8 - 5,5%), Canadá (5,3%), o Turquía (6,9%)²³ (Lipa & Triggiani, 1996; Çankaya & Kaftanoglu, 2006; Allen *et al.*, 2007; Rutrecht & Brown, 2008). La aparente ausencia de liberación de formas infectantes con las heces y una alta virulencia podrían explicar en parte este aspecto (Henry, 1977).

No existen informes previos acerca de la carga parasitaria de este patógeno. En este estudio se obtuvo una media de *ca.* 5×10^6 ooquistes/insecto. Por su parte, las prevalencias tampoco difirieron en demasía entre machos y hembras obreras, más allá del reducido número de muestras positivas. Los resultados serían coincidentes con los reportados por Rutrecht & Brown (2008) entre obreras y reinas.

Las infecciones mixtas (*A. bombi* – *C. bombi*), si bien no registradas por Rutrecht & Brown (2008) en *B. pratorum*, sí lo fueron por Lipa & Triggiani (1996) en *B. terrestris*, tanto con *C. bombi* como con el microsporidio *N. bombi*. Çankaya & Kaftanoglu (2006), detallan hallazgos en *B. terrestris* de los tres protistas citados, pero no mencionan casos de co-infección.

Aunque existen diferencias de tamaño entre los aislamientos argentinos e italianos (Lipa & Triggiani, 1996) (Tabla VII), las similitudes en la morfología de los ooquistes así como la presencia de cuatro núcleos en los mismos, apomorfía del género monotípico *Apicystis* (Meeus *et al.*, 2009), sustentan la identificación del patógeno hallado. De forma similar a lo planteado para *C. bombi*, las desigualdades de tamaño podrían explicarse por diferencias en los procedimientos utilizados al realizar los preparados, las fijaciones o las tinciones entre el presente trabajo y la descripción original²⁴. De todos modos, dicha descripción carece de valores medios, lo que impediría cuantificar la real diferencia de tamaño con los hallazgos en nuestro país.

²³ Solo se incluyeron reinas en dicho estudio (Çankaya & Kaftanoglu, 2006).

²⁴ A modo de ejemplo, el método de tinción utilizado por Lipa & Triggiani (1996) incluyó una inmersión en 0,25% Giemsa durante 8-12 hs, mientras que el tiempo utilizado en este estudio fue diez veces menor.

Debido a que *A. bombi* ha sido hallado en Canadá, Finlandia, Francia, Italia, Turquía y Suiza (Liu *et al.*, 1974; Lipa & Triggiani, 1996; Baer & Schmid-Hempel, 1999; Allen *et al.*, 2007; Rutrecht & Brown, 2008; Meeus *et al.*, 2009 y otros), el presente constituye el primer registro de este patógeno en el hemisferio Sur.

Conforme a la segunda hipótesis planteada al comienzo de este estudio, se ha comprobado que *N. ceranae* es capaz de parasitar activamente tanto *A. mellifera* como *Bombus* spp. También se han comentado los resultados de Ruiz-González & Brown (2006), quienes citan la capacidad de *A. mellifera*, en condiciones controladas, de albergar al flagelado *C. bombi*. Por lo tanto, y con respecto al hallazgo de formas similares a *A. bombi* en abejas, no debe descartarse un posible salto de hospedador entre poblaciones de *B. terrestris* y *A. mellifera* en nuestro país, en forma análoga a lo reportado en su descripción original.

Otra posibilidad, planteada oportunamente por Lipa & Triggiani (1996), contemplaría la existencia de una segunda especie de neogregarina que tenga a *A. mellifera* como su especie hospedadora.

APÉNDICE I
LA INTRODUCCIÓN DE ESPECIES NO NATIVAS

La introducción de especies no nativas en un nuevo territorio, tanto intencional como accidentalmente, es un importante componente de los cambios ambientales inducidos por el hombre (Vitousek *et al.* 1997). Como se ha comentado en la sección introductoria, autores como Goulson (2003) o Morales (2007a), han expuesto las posibles implicancias de estos procesos, aspectos retomados progresivamente por otros autores (Nagamitsu *et al.*, 2007, 2010; Grixti *et al.*, 2009; Xie & Tang, 2009).

A fines de siglo pasado, la cría comercial de *Bombus* para polinización de cultivos, en especial de aquellos bajo cubierta, tomó un importante auge (Banda & Paxton, 1991; van der Steen & Fries, 2006) y llevó a su propagación en todo el mundo. Se han reportado introducciones en Nueva Zelanda (*B. terrestris*, *B. ruderatus*, *B. hortorum* y *B. subterraneus*), Chile (*B. terrestris* y *B. ruderatus*), México (*B. terrestris* y *B. impatiens*), Japón, Sudáfrica, Marruecos y Túnez (*B. terrestris*), Canadá, Costa Rica y Guatemala (*B. impatiens*) (Hingston *et al.*, 2002; Flanders *et al.*, 2003; Morales, 2007a; J. van Veen, *com. pers.*), así como sus subsecuentes invasiones a países vecinos, como Tasmania (Semmens *et al.*, 1993; Buttermore, 1997) o Argentina (Roig-Alsina & Aizen, 1996; Torreta *et al.*, 2006)²⁵. Estas importaciones de abejorros por parte de distintos países ha sido motivo de controversias y numerosos estudios a fin de comprobar si existen efectos no deseados en torno a las mismas. De los más factibles ya citados (Pág. 26), el ítem menos abordado con evidencia experimental o datos de campo es el intercambio de patógenos entre organismos nativos e introducidos (Goulson, 2003; Goulson *et al.*, 2008), si bien considerado en los últimos años como el de mayor importancia (Evans *et al.*, 2009; Grixti *et al.*, 2009).

En forma paralela, tanto en Norteamérica (Evans *et al.*, 2009) como en Europa (Biesmeijer *et al.*, 2006; Fitzpatrick *et al.*, 2007) se han reportado importantes descensos poblacionales y extinciones de *Bombus* nativos, principalmente durante la segunda mitad del siglo XX (Kosior *et al.*, 2007). Estudios recientes también han registrado una retracción en la distribución de *B. bellicosus* en Brasil (Martins & Melo, 2009). En nuestro país se han detectado descensos en las poblaciones de *B. dahlbomii*,

²⁵ También existen reportes imprecisos o sin confirmar de introducciones realizadas en otros países (véase Morales, 2007a).

el abejorro de distribución más austral conocido, en concordancia con el incremento de las especies invasoras *B. ruderatus* y *B. terrestris* (Morales, 2007a, b; Madjidian *et al.*, 2008). Si bien deben evaluarse la mayor cantidad de aspectos posibles, en ningún caso la correspondencia con enfermedades puede ser subestimada.

Megachile rotundata

Megachile rotundata (Megachilidae) es una especie Euroasiática establecida en forma accidental en Norteamérica *ca.* 1930. Actualmente se ha dispersado en EE.UU. y parte de Canadá (Goulson, 2003). Con posterioridad fue introducida en Nueva Zelanda para polinizar cultivos de alfalfa, y detectada más tarde en el Sur de Australia (Woodward, 1996). También se han realizado importaciones a Chile y Argentina durante la década de 1970 con el mismo fin (Martínez, 2001; Ruz, 2002).

Estudios llevados a cabo en otros países reportan parasitoides como *Sapyga pumila* (Vespoidea), *Monodontomerus* sp. y *Tetrastichus* sp. (Chalcidoidea), y derméstidos (Coleoptera) del género *Trogoderma* (Torchio, 1972; Ruz, 2002). En Canadá, solo luego de la invasión de *M. rotundata*, se ha aislado al hongo *Ascospaera aggregata* de las especies nativas *M. pugnata* y *M. relativa* (Goulson, 2003).

En Argentina no existen estudios parasitológicos en relación a *M. rotundata*, de modo que su condición sanitaria es una incógnita, así como su probable rol como vehículo de enfermedades entre ésta y otras especies nativas afines.

El caso de Norteamérica y *Nosema bombi*

Entre 1992 y 1994, reinas de *B. occidentalis* y *B. impatiens* fueron enviadas desde EE.UU. a instalaciones de cría en Europa, desarrolladas, y retornadas al país para su uso en polinización de tomates y otros cultivos. Algunos autores postulan que estas colonias habrían regresado infectadas con el microsporidio *Nosema bombi*, a partir de

ejemplares de *B. terrestris* criados en las mismas instalaciones (R. Thorp, *com. pers.*). Al carecer los abejorros locales de resistencia a ese nuevo patógeno, la enfermedad se habría extendido a las poblaciones silvestres de *B. occidentalis* y *B. franklini* en el Oeste (a partir de los *B. occidentalis* infectados), y de *B. affinis* y *B. terricola* en el Este (vehiculizados por los *B. impatiens* infectados). A finales de los '90, las cuatro especies mostraron serios descensos poblacionales, en especial *B. franklini*, probablemente ya extinta (Winter *et al.*, 2006; Colla & Packer, 2008; Evans *et al.*, 2009).

La mayor debilidad de tal hipótesis residía en otras especies que han mantenido poblaciones viables en las mismas áreas (*e.g.*: *B. vosnesenskii*, *B. impatiens*) y en que solo se contaba con registros de este patógeno en Canadá²⁶, incluso anteriores (Liu, 1973; Colla *et al.*, 2006), contradiciendo un establecimiento de *N. bombi* en EE. UU. luego de la reintroducción de abejorros desde Europa (R. Thorp, *com. pers.*). No obstante, esta hipótesis se ha confirmado recientemente, detectando la presencia de *N. bombi* infectando a *B. impatiens* y *B. sandersoni* en Carolina del Norte. Mas aún, la comparación de las secuencias de ADN de los aislamientos norteamericanos y europeos indicó una correspondencia casi exacta entre ellos (Sokolova *et al.*, 2010).

Si bien el mencionado caso no incluye la introducción de especies alóctonas, muestra como solo el traslado de éstas, en oportunidades careciendo de las debidas medidas sanitarias, conlleva la posibilidad de introducir patógenos. En nuestro país se ha evaluado el ingreso de *B. impatiens* con los mismos fines, pero afortunadamente los informes de investigadores convocados *ad hoc* han recomendado su negativa advirtiendo el riesgo asociado a este tipo de comercio (Morales & Aizen, 2006; Sánchez *et al.*, 2006).

No se ha reportado aún la presencia de *N. bombi*, pero tampoco se excluye la posibilidad debido a que *B. terrestris* es un común hospedador de esta especie. Su prevalencia en distintas poblaciones de *Bombus* parece no ser elevada ni homogénea entre colonias incluso cercanas y de igual especie, como para tornar sencilla su detección (McIvor & Malone, 1995; Imhoof & Schmid-Hempel, 1999; Fries *et al.*, 2001;

²⁶ Existiría solo un caso datado en 1997, aunque no confirmado, en *B. occidentalis* (Thorp, 2003).

Korner & Schmid-Hempel, 2005; Paxton, 2006; Sokolova *et al.*, 2010). Tampoco deberá excluirse la posible existencia de otros microsporidios aún no descritos que tengan como hospedador al género *Bombus* (Schmid-Hempel & Loosli, 1998).

CONSIDERACIONES FINALES

La situación actual de Argentina y el riesgo para sus polinizadores

En primer lugar, se resaltaré la importancia de los hallazgos de *Crithidia bombi* y de *Apicystis bombi* en poblaciones de *B. terrestris*. En este trabajo ambos protistas son reportados por primera vez en Sudamérica y específicamente el segundo de ellos en el hemisferio Sur.

Si bien la virulencia de *C. bombi* en condiciones naturales es discutida, algunos autores consideran que su importancia como patógeno está subestimada, y que podría estar actuando como uno de los factores de mortalidad en las poblaciones de *Bombus* norteamericanas (Otterstatter & Thomson, 2008; Grixti *et al.*, 2009). En nuestro país podría estar actuando en forma similar, y en vista de lo analizado en la presente tesis, la posibilidad de hallar a este patógeno expandiéndose hacia áreas aún libres del mismo parece esperable. Por su parte, *A. bombi* parece presentar una baja prevalencia, pero debido a su virulencia también podría ser un factor importante de mortalidad en las poblaciones de *B. terrestris*.

Al margen de la influencia de estos patógenos en poblaciones ya establecidas de *B. terrestris*, su amplio rango de hospedadores susceptibles avalaría la posibilidad de nuevas asociaciones con abejorros nativos. Si bien no se han detectado *A. bombi* ni *C. bombi* en nueve de las diez especies de *Bombus* presentes, considerando que la mayoría de los entomopatógenos tendería a presentar distribuciones espaciales irregulares y prevalencias variables, aún no es posible aseverar que estos patógenos no se encuentren parasitándolas. Tampoco deberá descartarse la viabilidad de *A. mellifera* como reservorio de *C. bombi* demostrada en forma experimental. Considerando la capacidad de dispersión de *B. terrestris* y su interacción con especies nativas, cabría esperar futuros hallazgos de *C. bombi* y *A. bombi* infectando otras especies de *Bombus* en nuestro país.

La confirmación mediante estudios moleculares de la presencia de *Nosema ceranae* en Argentina, tanto en *A. mellifera* como en tres especies nativas de *Bombus* abre otro abanico de interrogantes. Se ha comentado que su presencia en *A. mellifera* se asocia a una acentuada virulencia, pudiendo ser uno de los principales responsables del S.D.C. (Pág. 92). La alta mortandad de colonias en el año 2007 y su relación con *N. ceranae* en Argentina se ha descartado, aunque con escasas bases empíricas, por los entes oficiales (Pág. 93). Desafortunadamente, como el diseño y ejecución de un estudio *ad hoc* excede los objetivos del presente trabajo, las mayores prevalencias registradas si bien coincidentes con las épocas de gran mortandad de colonias, no pueden asegurar una inequívoca relación causa-efecto entre ambas.

Con respecto a la presencia de *N. ceranae* en abejorros, debido a que éstos sólo se recogieron mientras pecoreaban y que los protistas patógenos suelen causar efectos de tipo subletal tales como reducción de actividad y cambios de comportamiento (Lacey & Brooks, 1997), los datos obtenidos podrían estar subestimando la ocurrencia de los mismos y no debe descartarse que la prevalencia real supere a la reportada en este estudio. Las lesiones observadas en los individuos infectados sugieren que *N. ceranae* estaría actuando como un importante factor de perjuicio para estos insectos.

Más allá del hospedador en cuestión, en el presente estudio se ha reportado la presencia de *N. ceranae* en regiones del país distantes más de 1.800 Km., como Calilegua, en la provincia de Jujuy, y General Conesa, en Río Negro, lo que indica una amplia dispersión geográfica y la euritermia de este patógeno. Teniendo en cuenta la gran cantidad de apiarios comerciales dispersos por todo el país y que las especies de *Bombus* que se hallaron afectadas también presentan una gran distribución (Tabla II), la interacción entre *Apis*, *Bombus* y *N. ceranae* permanecería en una constante retroalimentación. Por lo tanto, en el plano productivo, el papel de *Bombus* como agente dispersor de la enfermedad no debe ser minimizado. En este contexto, la apicultura, la agricultura y el comercio de especies carentes de herramientas diagnósticas adecuadas podrían dar lugar a una amplia difusión de

estos microsporidios. Una dificultad latente para el apicultor residirá en prevenir las infecciones o reinfecciones de sus colmenas en territorios con abundancia de *Bombus* y alternativamente, si la virulencia de *N. ceranae* en una o más especies de abejorros es tan acentuada como en *A. mellifera*, cabría esperar importantes descensos poblacionales de estos polinizadores.

Por último, una potencial importación de *Bombus* exóticos con fines comerciales debería ser evitada, basándose en las complicaciones asociadas a la introducción de organismos alóctonos observada en numerosos ambientes de todo el mundo (Véase Vitousek *et al.*, 1997; Rodríguez, 2001; Pimentel, 2002; Reinhardt *et al.*, 2003; Petillon *et al.*, 2005; Vilà *et al.*, 2006; Wallem *et al.*, 2007 y otros).

El hallazgo de *Nephridiophaga apis* en nuestro país incita a una futura profundización en el conocimiento tanto de su filogenia como de la interacción con los himenópteros. Este parásito, debido a la baja prevalencia observada, parecería *a priori* no estar generando importantes problemas sanitarios en la industria apícola argentina.

Finalmente, se ha expuesto que el hallazgo de *Malpighamoeba mellificae* en Argentina constituye el primer registro de esta ameba en el país, y bajo ningún concepto se deberá minimizar su presencia, la que podría constituir otra amenaza para la apicultura. Si bien la prevalencia de *M. mellificae* aún no pudo establecerse fehacientemente, no se descarta que podría estar causando mermas en apiarios de ambas localidades donde se la ha detectado, en forma individual o en conjunto con *N. ceranae*. En ese sentido serán necesarios muestreos más numerosos y espacialmente más abarcativos a fin de monitorear su real distribución y potencial daño en colmenares de Argentina.

APÉNDICE II
APIARIOS MONITOREADOS EN ESTE ESTUDIO

Zona Noreste (Fig. A1)

Apiario	Localidad	Temporada
Fe y Esperanza	Tres bocas (Tigre, Bs. As.)	2006 – 2009
Los silos	Cuartel V (Lobos, Bs. As.)	2006 – 2008
La concepción	Cuartel V (Lobos, Bs. As.)	2006 – 2008



Figura A1 – Zona Noreste: A) *Fe y Esperanza* (Tigre). B) *Los silos* (Lobos). C) *La concepción* (Lobos).

Zona Noroeste (Fig. A2)

Apiario	Localidad	Temporada
Alentué fondo	Roosevelt (Rivadavia, Bs. As.)	2006 – 2007
Alentué medio	Roosevelt (Rivadavia, Bs. As.)	2006 – 2007
El médano	Roosevelt (Rivadavia, Bs. As.)	2006 – 2007
Laguna de Arrese	Abel (Pehuajó, Bs. As.)	2007 – 2008
Leonardi	Abel (Pehuajó, Bs. As.)	2007 – 2008
Ray	Abel (Pehuajó, Bs. As.)	2007 – 2008
Del Poppolo	Rufino (Santa Fe)	2008 – 2009
Mil hectáreas	Rufino (Santa Fe)	2008 – 2009



Figura A2 – Zona Noroeste: A) Laguna de Arrese (Pehuajó). B) Alentué fondo (Rivadavia). C) El médano (Rivadavia). D) Del Poppolo (Rufino)

Zona Central (Fig. A3)

Apiario	Localidad	Temporada
Galpón	Olavarría (Bs. As.)	2006 – 2007
Los rollos	Olavarría (Bs. As.)	2006 – 2007
La tapera	Olavarría (Bs. As.)	2006 – 2007
Unidad Penal N° 2 – S.P.B.	Sierra chica (Olavarría, Bs. As.)	2006 – 2007
Cuña	Olavarría (Bs. As.)	2006 – 2008
Los troncos	Olavarría (Bs. As.)	2006 – 2008
Anto-Mic	Olavarría (Bs. As.)	2007 – 2009
Las lomas	Olavarría (Bs. As.)	2007 – 2009
Arroyo	Olavarría (Bs. As.)	2008 – 2009
Vialidad	Olavarría (Bs. As.)	2008 – 2009



Figura A3 – Zona Central: A) Unidad penal N° 2 – Servicio Penitenciario Bonaerense (Sierra chica). B) Cuña (Olavarría). C) Los troncos (Olavarría). D) Galpón (Olavarría)

Zona Sudeste (Fig. A4)

Apiario	Localidad	Temporada
El monte	Necochea (Bs. As.)	2006 – 2007
El correntino	Necochea (Bs. As.)	2006 – 2007
La taza	Necochea (Bs. As.)	2006 – 2007
Martín Millera	San Cayetano (Bs. As.)	2007 – 2008
La crotera	San Cayetano (Bs. As.)	2007 – 2009
Don Federico	San Cayetano (Bs. As.)	2007 – 2009
Cortaderas	San Cayetano (Bs. As.)	2008 – 2009

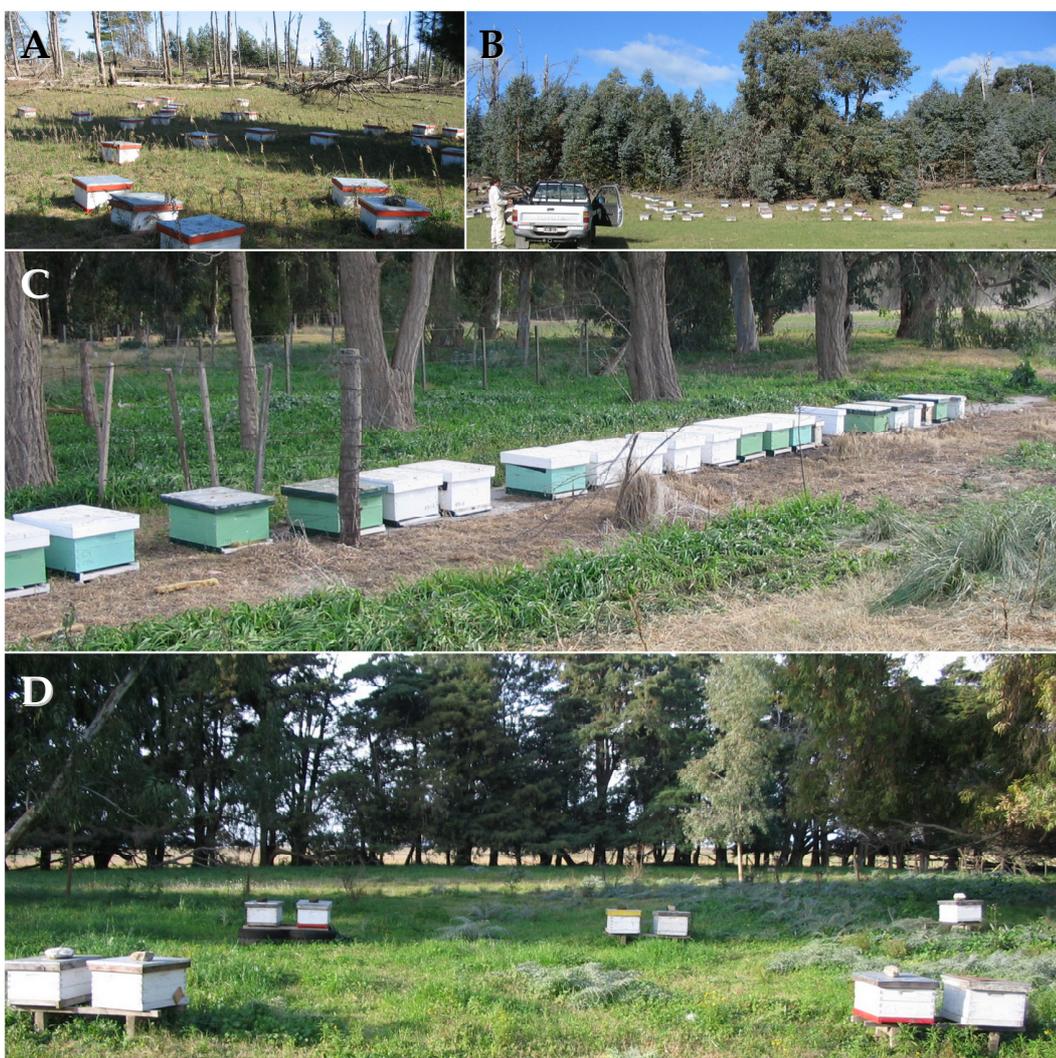


Figura A4 – Zona Sudeste: A) *El monte* (Necochea). B) *La taza* (Necochea). C) *Martín Millera* (San Cayetano). D) *La crotera* (San Cayetano).

Zona Sudoeste (Fig. A5)

Apiario	Localidad	Temporada
Nuevo lucero	Dufaur (Saavedra, Bs. As.)	2006 – 2007
La Lola	Dufaur (Saavedra, Bs. As.)	2007 – 2008
El cerro	Dufaur (Saavedra, Bs. As.)	2007 – 2008
El descanso I	M. Buratovich (Villarino, Bs. As.)	2008 – 2009
El descanso II	M. Buratovich (Villarino, Bs. As.)	2008 – 2009



Figura A5 – Zona Sudoeste: A) *El cerro* (Saavedra). B) *Nuevo lucero* (Saavedra). C) *El descanso I* (Villarino).

REFERENCIAS

Figuras²⁷

Figura 1 - Subórdenes de himenópteros.....	10
Figura 2 – Relaciones entre los Apiformes	11
Figura 3 – Corbícula de <i>Apis mellifera</i>	13
Figura 4 – Forrajeo de <i>Bombus atratus</i>	15
Figura 5 – <i>Apis mellifera</i>	16
Figura 6 – Producción anual de miel argentina.....	17
Figura 7 – Principales organismos causales de enfermedad en <i>Apis mellifera</i> en Argentina.....	19
Figura 8 – Cinco de las diez especies de <i>Bombus</i> presentes en Argentina	24
Figura 9 – Regiones geográficas de la República Argentina.....	35
Figura 10 – Región Pampeana	39
Figura 11 – Sitios de colecta en Argentina	44
Figura 12 - Métodos de colecta y procesamiento de material	48
Figura 13 – Sec. parcial del gen 16sSSU-RNAr de <i>Nosema ceranae</i> aislado de <i>A. mellifera</i>	55
Figura 14 – Sec. parcial del gen 16sSSU-RNAr de <i>Nosema ceranae</i> aislado de <i>Bombus</i> spp.....	55
Figura 15 – Localidades con casos de <i>Nosema ceranae</i> en <i>Apis mellifera</i>	56
Figura 16 – <i>Nosema ceranae</i>	57
Figura 17 – <i>Nosema ceranae</i>	58
Figura 18 – Detección de <i>Nosema ceranae</i> por electroforesis en gel	59
Figura 19 – Localidades con y sin casos de <i>Nosema ceranae</i> en <i>Bombus</i> spp.....	60
Figura 20 – Prevalencia media de <i>Nosema ceranae</i>	61
Figura 21 – Cargas parasitarias promedio de <i>Nosema ceranae</i>	62
Figura 22 – Casos de <i>Nosema ceranae</i> en <i>Apis mellifera</i>	63
Figura 23 – Cargas parasitarias de <i>Nosema ceranae</i> en <i>Bombus</i> spp.	64
Figura 24 – <i>Nephridiophaga apis</i>	66
Figura 25 – Muestras positivas y prevalencias de <i>Nephridiophaga apis</i>	67
Figura 26 – Porcentaje de coinfecciones de <i>Nephridiophaga apis</i> y <i>Nosema</i> sp.	68
Figura 27 – <i>Malpighamoeba mellificae</i>	71
Figura 28 – Localidades con detecciones de <i>Nephridiophaga apis</i> y <i>Malpighamoeba mellificae</i>	72
Figura 29 – <i>Crithidia bombi</i>	74
Figura 30 - <i>Apicystis bombi</i>	77
Figura 31 – Formas similares a <i>Apicystis bombi</i> hallados en <i>Apis mellifera</i>	78
Figura 32 – Prevalencia y coinfecciones de los protistas hallados en <i>Apis mellifera</i> y en <i>Bombus</i> spp. durante este estudio	80
Figura 33 – Registros mundiales de <i>Nosema ceranae</i> en <i>Apis mellifera</i>	86
Figura 34 – Casos de Nosemosis analizados en el CEPAVE y en el Laboratorio de Patología Apícola de Marchamalo, España.....	91

Tablas

Tabla I – Tipos de polinización y agentes polinizadores correspondientes.	14
Tabla II – Especies del género <i>Bombus</i> en Argentina	23

²⁷ Todas las fotografías son propiedad del autor, excepto las especificadas en el epígrafe correspondiente.

Tabla III – Localidades de colecta de <i>Apis mellifera</i>	42
Tabla IV – Localidades de colecta de <i>Bombus</i> spp.....	43
Tabla V - Colectas y castas positivas a <i>Nosema ceranae</i> en <i>Bombus</i> spp.....	59
Tabla VI – Prevalencias de <i>Nosema ceranae</i> en la región Pampeana.....	61
Tabla VII - Medidas de <i>Crithidia bombi</i>	75
Tabla VIII - Medidas de <i>Apicystis bombi</i>	77
Tabla IX - Resumen de las detecciones de <i>Nosema ceranae</i> , <i>Apicystis bombi</i> y <i>Crithidia bombi</i> en <i>Bombus</i> spp.	79

Comunicaciones personales

Página 13 - **Dr. Keith S. Delaplane.** *Department of Entomology, University of Georgia, U.S.A.*

Página 14 - **Ing. Agr. Ariel Guardia-López.** *Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Bs. As. Argentina.*

Página 100 - **Dr. Carlos E. Lange.** *Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). Argentina.*

Página 110 - **Dr. Johan van Veen.** *Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales. Universidad Nacional, Heredia. Costa Rica.*

Página 112 - **Dr. Robbin Thorp.** *Department of Entomology, University of California, U.S.A.*

Bibliografía

Abrahamovich A. H. & N. B. Díaz. 2001. Distribución geográfica de las especies del género *Bombus* Latreille (Hymenoptera, Apidae) en Argentina. *Revista Brasileira de Entomología* 45(1): 23-36.

Abrahamovich A. H., N. B. Díaz & M. Lucía. 2005. Las Especies del Género *Bombus* Latreille en Argentina (Hymenoptera: Apidae). Estudio Taxonómico y Claves Para su Identificación. *Neotropical Entomology* 34(2): 235-250.

Abrahamovich A. H., N. B. Díaz & M. Lucía. 2007. 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* 106(2): 165-176.

Adl S. M., A. G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. Mccourt, L. Mendoza, Ø. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegelz & M. F. J. R. Taylor. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52(5): 399-451.

Alexander B. A. 1992. An exploratory analysis of cladistic relationships within the superfamily Apoidea, with special reference to sphecid wasps (Hymenoptera). *J. Hym. Res.* 1: 25-61.

Alexander B. A. & C. D. Michener. 1995. Phylogenetic studies of the families of short-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kansas Sci. Bull.* 55(11): 377-424.

Alippi A. M. & L. Nuñez. 1990. Técnicas de laboratorio para el aislamiento e identificación de *Bacillus larvae* White, agente causal de la Loque americana. *Circ. Int. CIC Año 2 - N° 6.*

Alippi A. M. & L. Nuñez. 1991. La loque americana en Argentina. *Vida Apícola* 49: 20-24.

- Allen G. R., O. D. Seeman, P. Schmid-Hempel & R. E. Buttermore.** 2007. Low parasite loads accompany the invading population of the bumblebee, *Bombus terrestris* in Tasmania. *Insect. Soc.* 54: 56–63.
- Anderson D. L.** 1987. Amoeba disease confirmed in New Zealand. *The New Zealand Beekeeper* 194: 11-13.
- Anderson D. L.** 1990. Pests and pathogens of the honey bee (*Apis mellifera* L.) in Fiji. *J. Apic. Res.* 29: 53-59.
- Anderson D. L. & J. W. H. Trueman.** 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experim. Appl. Acarol.* 24: 165–189.
- Anderson R. M. & R. M. May.** 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 291: 451-524
- Andrada A., A. Valle, E. Aramayo & S. Lamberto.** 1998a. Espectro polínico de las mieles de la región de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Polen* 9: 75-84.
- Andrada A., A. Valle, E. Aramayo, S. Lamberto & M. Cantamutto.** 1998b. Análisis polínico de las mieles de las Sierras Australes de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales* 13: 265-275.
- Andreadis T. G.** 1987. Transmission. En: J. R. Fuxa & Y. Tanada (Eds.). *Epizootiology of Insect Diseases*. John Wiley & Sons, New York. Pp: 159-176.
- Arretz P. V. & R. P. MacFarlane.** 1986. The introduction of *Bombus ruderatus* to Chile for red clover pollination. *Bee World* 67: 15-22.
- Aupinel P., A. Génissel, S. Gomond, J. N. Tasei & J. Poncet.** 2001. Collection of spring pollens by *Bombus terrestris* queens, assessment of attractiveness and nutritive value of pollen diets. *Acta Horticult.* 561: 101–105.
- Aydin L., E. Gulegen, I. Cakmak, A. O. Girisgin & H. Wells.** 2006. Relation between *Nosema* and Chalkbrood diseases, and its implication for an apiary management model. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 50: 471-475.
- Bacci M.** 2007. Síndrome de despoblamiento de colmenas. Programa de Control de Enfermedades de las Abejas. SENASA. Arg. (Octubre).
- Baer B.** 2000. The importance of genetic variability as a defense against parasites. PhD Thesis. Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich.
- Baer B. & P. Schmid-Hempel.** 2001. Unexpected Consequences of Polyandry for Parasitism and Fitness in the Bumblebee, *Bombus terrestris*. *Evolution* 55(8): 1639-1643.
- Bailey L.** 1968. The measurement and interrelationships of infections of *Nosema* and *Malpighamoeba mellificae* of honey bee populations. *J. Invert. Pathol.* 12(2): 175-179.
- Bailey L.** 1972. *Nosema apis* in drone honeybees. *J. Apic. Res.* 11: 171-174.

- Bailey L. & B. V. Ball.** 1991. *Honey bee pathology*. 2nd ed. Harcourt Brace Jovanovich (Ed.). Academic Press, London. UK.
- Banda H. J. & R. J. Paxton.** 1991. Pollination of greenhouse tomatoes by bees. 6th International Symposium on pollination. *Acta Horticult.* 288: 194-198.
- Basualdo M. & E. Bedascarrasbure.** 2003. Rol de las abejas en la polinización de cultivos. *IDIA XXI* 5: 18-22.
- Basualdo M., A. Pereda & E. Bedascarrasbure.** 2006. Caracterización botánica y geográfica de mieles de la cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina. *RIA* 35(1): 5-14.
- Becnel J. & T. Andreadis.** 1999. Microsporidia in insects. En: Wittner & Weiss (Eds.). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C. Pp: 447-501.
- Bhat S. A. & B. Nataraju.** 2007. A comparative study on artificial germination of two microsporidia under the neutralization method. *Caspian J. Env. Sci.* 5(1): 105-109.
- Bierzchudek A.** 1979. *Historia de la apicultura argentina*. Tomos 1-2. H. J. Mattone (Ed.). Buenos Aires. 163 pp.
- Biesmeijer J. C., S. P. M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemüller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers, S. G. Potts, R. Kleukers, C. D. Thomas, J. Settele & W. E. Kunin.** 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313: 351-354.
- Botías C., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, M. Higes & D. L. Anderson.** 2009. *Nosema ceranae* is able to infect different *Apis* species. 41^o Cong. Apimondia. Montpellier, Francia.
- Brooks W. M.** 1988. *Entomogenous Protozoa*. Ignoffo, C. M. (Ed.), CRC Press, Boca Ratón.
- Brown M. J. F., R. Loosli & P. Schmid-Hempel.** 2000. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos* 91: 421-427.
- Brown M. J. F., R. Schmid-Hempel & P. Schmid-Hempel.** 2003. Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *J. Animal Ecol.* 72: 994-1002.
- Bulger J. W.** 1928. *Malpighamoeba* (Prell) in the adult honeybee found in the United States. *J. Econ. Entomol.* 21: 376-379.
- Gillott.** 2005. *Entomology*. 3rd ed. Springer, Netherlands. 831 pp.
- Buttermore R. E.** 1997. Observations of Successful *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) Colonies in Southern Tasmania. *Australian J. Entomol.* 36: 251-254.
- Buyts B.** 1993. Amoeba disease frustrates importation of queens from Zimbabwe. *South African Bee J.* 65: 57-59.
- Cabrera A. L.** 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* XIV(1-2). 42 pp.

- Calatayud F. & E. Simó.** 2001. *Importancia de las abejas de miel y otros insectos como agentes polinizadores de las plantas cultivadas y silvestres de la Comunidad Valenciana*. Unió de Llauradors-COAG (Ed.) Valencia, España. 13 pp.
- Camugli E. N.** 1962. Estudio bacteriológico de la loque europea, grave enfermedad de las larvas de abejas en la Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 38: 73-82.
- Cantwell G. E.** 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *Am. Bee. J.* 100(6): 222-223.
- Cantwell G. E.** 1974. Honey bee diseases, parasites and pests. En: E. Cantwell (Ed.). *Insectes Diseases*. Vol. II, Cap. 11. G., Marcel Dekker Inc., New York.
- Caullery M.** 1953. Appendice aux Sporozoaires: Classe des haplosporidies (Haplosporidia Caullery & Mesnil 1899). *Traité de Zoologie* 1(2): 922-934.
- Caullery M. & F. Mesnil.** 1899. Sur les Aplosporidies, order nouveau de la classe des Sporozoaires. *C. R. Acad. Sci., Paris* 129: 616-619.
- Caullery M. & F. Mesnil.** 1905. Recherches sur les haplosporidies. *Arch. Zool. Exp. Gen., Ser. IV*, 4: 101-181.
- Chaimanee V., N. Warrit & P. Chantawannakul.** 2010. Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *J. Invert. Pathol.* 105: 207-210.
- Chapman R. F.** 1971. *The insects. Structure and function*. 2nd ed. American Elsevier Publishing Company, Inc. New York. U.S.A. 819 pp.
- Chauzat M. P., M. Higes, R. Martín-Hernández, A. Meana, N. Cougoule & J. P. Faucon.** 2007. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *J. Apic. Res.* 46: 127-128.
- Chen Y. P., J. D. Evans, I. B. Smith & J. S. Pettis.** 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invert. Pathol.* 97: 186-188.
- Chen Y. P., J. D. Evans, C. Murphy, R. Gutell, M. Zuker, D. Gundensen-Rindal & J. S. Pettis.** 2009. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian parasite isolated for the European honey bee *Apis mellifera*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56: 142-147.
- COLOSS Workshop.** 2009. *Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization. Guadalajara. España. 38 pp.
- Colla S. R. & L. P. Packer.** 2008. Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera: Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodiv. and Conserv.* 17: 1379-1391.
- Colla S. R., M. C. Otterstatter, R. J. Gegear & J. D. Thomson.** 2006. Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological Conservation* 129: 461-467.
- Committee on the Status of Pollinators in North America National Research Council.** 2007. Status of Pollinators in North America. National Academies Press, Washington, DC.

- Cornejo L. G. & C. L. Rossi.** 1974. *Enfermedades de las abejas*. Ciencia y Abejas (Ed.). La Plata. Argentina. 176 pp.
- Cox-Foster D. L., S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P. Quan, T. Briese, M. Hornig, D. M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A. L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S. K. Hutchison, J. F. Simons, M. Egholm, J. S. Pettis & W. I. Lipkin.** 2007. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* 318: 283-287.
- Çankaya N. E. & O. Kaftanoğlu.** 2006. An Investigation on Some Diseases and Parasites of Bumblebee Queens (*Bombus terrestris* L.) in Turkey. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(7): 1282-1286.
- Danforth B. N., S. Sipes, J. Fang & S. G. Brady.** 2006. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 15118–15123.
- Decourtye A., S. Lefort, J. Devillers, M. Gauthier, P. Aupinel & M. Tisseur.** 2009. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. Hazards of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group. Pp: 75-83.
- Doull K. M.** 1961. A Theory of the Causes of Development of Epizootics of *Nosema* Disease of the Honey Bee. *J. Insect Pathol.* 3: 297-309.
- Doull K. M.** 1965. The Effects of Time of Day and Method of Sampling on the Determination of *Nosema* Disease in Beehives. *J. Invert. Pathol.* 7: 1-4.
- Doull K. M. & K. M. Cellier.** 1961. A Survey of the Incidence of *Nosema* Disease (*Nosema apis* Zander) of the Honey Bee in South Australia. *J. Insect Pathol.* 3: 280-288.
- Dramstad W. & G. Fry.** 1995. Foraging activity of bumblebees (*Bombus*) in relation to flower resources on arable land. *Agric. Ecosyst. & Environ.* 53: 123–135.
- Durrer S. & P. Schmid-Hempel.** 1994. Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 258(1353): 299–302.
- Dyess E. G. & C. A. Wilson.** 1978. A study of the seasonal variations of *Nosema apis* Zander of honey bee in Mississippi. *Am. Bee J.* 118: 33–35.
- Estay P., A. Wagner & M. Escaff.** 2001. Evaluación de *Bombus dahlbomii* (Guér.) como agente polinizador de flores de tomate (*Lycopersicon esculentum* (Mill.)), bajo condiciones de invernadero. *Agricultura Técnica de Chile* 61: 113-119.
- Estay P., N. Vitta, J. Valenzuela & R. Aguiar.** 2003. Evaluación de *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Bombidae) reproducidos en Chile, como polinizador de flores y mejorador del rendimiento y calidad en Arándano, variedad O'Neil. XXV Cong. Nac. de Entomol., Talca. Chile.
- Evans E., R. Thorp, S. Jepsen & S. H. Black.** 2009. *Status Review of Three Formerly Common Species of Bumble Bee in the Subgenus Bombus*. The Xerces Society (Ed). Portlan, OR. 63 pp.
- Fabel P., R. Radek & V. Storch.** 2000. A New Spore-Forming Protist, *Nephridiophaga blaberi* sp. nov., in the Death's Head Cockroach *Blaberus craniifer*. *Europ. J. Protistol.* 36: 387-395.

- Faegri K. & L. van der Pijl.** 1979. *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press, Oxford, NY. 244 pp.
- Fagúndez G.** 2003. Diagnósis polínica de especies características de mieles "de isla" de la provincia de Entre Ríos, Argentina. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.*, n. s. 5(2): 351-361.
- Fantham H. B. & A. Porter.** 1914. The morphology, biology and economic importance of *Nosema bombi* n. sp. parasitic in various bumblebees. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 8: 623-638.
- Farji-Brener A. G. & J. C. Corley.** 1998. Successful invasions of hymenopteran insects into NW Patagonia. *Ecología austral* 8: 237-249.
- Faye P. F., A. M. Planchuelo & M. L. Molinelli.** 2002. Apicultural flora survey and identification of pollen load for Southeastern Córdoba, Argentina. *Agriscientia* XIX: 19-30.
- Fenoy S., C. Rueda, M. Higes, R. Martín-Hernández & C. del Aguila.** 2009. High-Level Resistance of *Nosema ceranae*, a Parasite of the Honeybee, to Temperature and Desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(21): 6886-6889.
- Fernández F. & M. J. Sharkey.** (Eds.). 2006. *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. SOCOLEN, Univ. Nac. de Colombia. Bogotá. 894 pp.
- Fingler B. G., W. T. Nash & T. L. Szabo.** 1982. A comparison of two techniques for the measurement of *Nosema* disease in honey bee colonies wintered in Alberta, Canada. *Am. Bee J.* 122: 369-371.
- Fitzpatrick U., T. E. Murray, R. J. Paxton, J. Breen, D. Cotton, V. Santorum & M. J. F. Brown.** 2007. Rarity and decline in bumblebees: a test of causes and correlates in the Irish fauna. *Biological Conservation* 136: 185-194.
- Flanders R. V., W. F. Wehling & A. L. Craghead.** 2003. Laws and regulations on the import, movement, and release of bees in the United States. En: Strickler K. & J. H. Cane (Eds.) *For Nonnative Crops, Whence Pollinators of the Future? Proceedings of Thomas Say Publications in Entomology*. Entomological Society of America. Lanham, MD. Pp: 99-111.
- Freitas B.** 1998. A importancia relativa de *Apis mellifera* e outras especies de abelhas na polinização de culturas agrícolas. Anais do III Encontro sobre abelhas. Universidad de São Paulo, Junio 11-14, Riberão Preto, Brasil. Pp: 10-20.
- Frenguelli J.** 1950. Rasgos generales de la morfología y la geología de la provincia de Buenos Aires. Publicaciones del Laboratorio de Ensayo de materiales e investigaciones tecnológicas de la Provincia de Buenos Aires. Serie II, nº 33.
- Frenguelli J.** 1956. Rasgos generales de la hidrografía de la provincia de Buenos Aires. Publicaciones del Laboratorio de Ensayo de materiales e investigaciones tecnológicas de la Provincia de Buenos Aires. Serie II, nº 62.
- Fries I.** 1988. Contribution to the study of *Nosema* disease (*Nosema apis* Z.) in Honey Bee (*Apis mellifera*) colonies. *Akademisk Avhandling. Sveriges Lantbruksuniversitet. Uppsala*.
- Fries I.** 1993. *Nosema apis*: A parasite in the Honey bee colony. *Bee World* 74(1): 5-19.

- Fries I.** 2009. *Nosema ceranae* in European honeybees (*Apis mellifera*). J. Invert. Pathol. 103: S73–S79.
- Fries I. & S. Camazine.** 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. Apidologie 32: 199-214.
- Fries I. & E. Forsgren.** 2008. En: Fries, 2009.
- Fries I., R. R. Granados & R. A. Morse.** 1992. Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. Apidologie 23: 61-70.
- Fries, I., F. Feng, A. da Silva, S. B. Slemenda & N. J. Pieniasek.** 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of microsporidian parasite of the Asian honey bees *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32: 356–365.
- Fries, I., A. de Ruijter, R. J. Paxton, A. J. da Silva, S. B. Slemenda & N. J. Pieniasek.** 2001. Molecular characterization of *Nosema bombi* (Microsporidia : Nosematidae) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (Hymenoptera : Apoidea). J. Apic. Res. 40: 91-96.
- Fries I., R. Martín, A. Meana, P. García-Palencia & M. Higes.** 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. J. Apic. Res. 45: 230–233.
- Fritsch W. & R. Bremer.** 1975. *Higiene y profilaxis en apicultura*. Acribia (Ed.). Zaragoza. España. 174 pp.
- Fuentealba V. E.** 2005. Presencia y niveles de infección de los protozoos *Nosema apis* Zander y *Malpighamoeba mellificae* Prell en apiarios asociados a Apicoop Ltda. en la X Región de Chile. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 79 pp.
- Furgala B. & R. A. Hyser.** 1969. Minnesota *Nosema* survey. Distribution and levels of infection in wintering apiaries Am. Bee J. 109(12): 460-461.
- Fussell M. & S. A. Corbet.** 1991. Forage for bumblebees and honeybees in farmland: a case study. J. Apic. Res. 30: 87-97.
- Fuxa J. R. & Y. Tanada (Eds.).** 1987. *Epizootiology of insects diseases*. Wiley & Sons, N. Y.
- Gajda A.** 2009. The size of bee sample for investigation of *Nosema* sp. infection level in honey bee colony. COLOSS Workshop. *Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization. Guadalajara. España.
- Gegear R. J., M. C. Otterstatter & J. D. Thomson.** 2005. Does parasitic infection impair the ability of bumblebees to learn flower-handling techniques? Animal Behaviour 70: 209–215.
- Gegear R. J., M. C. Otterstatter & J. D. Thomson.** 2006. Bumble-bee foragers infected by a gut parasite have an impaired ability to utilize floral information. Proc. R. Soc. B. 273: 1073–1078.
- Genersch E., C. Yue, I. Fries & J. R. de Miranda.** 2006. Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. J. Invert. Pathol. 91: 61-63.

- Giersch T., T. Berg, F. Galea & M. Hornitzky.** 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40: 117-123.
- Gilliam M. & H. Shimanuki.** 1966. *In Vitro* Phagocytosis of *Nosema apis* Spores by Honey-Bee Hemocytes. *J. Invert. Pathol.* 9: 387-389.
- Giordani G.** 1959. Amoeba Disease of the Honey Bee, *Apis mellifera* Linnaeus, and an Attempt at its Chemical Control. *J. Insect Pathol.* 1: 245-269.
- Gisder S., K. Hedtke, N. Möckel, M. C. Frielitz, A. Linde & E. Genersch.** 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 76(9): 3032-8.
- Goka K., K. Okabe, M. Yoneda & S. Niwa.** 2001. Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology* 10: 2095-2099.
- Gómez Pajuelo A., C. Torres & F. J. Orantes Bermejo.** 2008. Colony losses: a double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventative treatment with fumagillin against *Nosema ceranae*. *J. Apic. Res.* 47(1): 84-86.
- González R.** 2007. Crisis Apícola Argentina: se estima más de 1.450.000 colmenas muertas. *Apicultura sin fronteras* 19: 2.
- González V. H.** 2006. Superfamilia Apoidea. En: Fernández F. & M. J. Sharkey (Eds.). *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. SOCOLEN, Univ. Nacional de Colombia. Pp: 443-448.
- González V. H., A. Mejía & C. Rasmussen.** 2004. Ecology and Nesting Behavior of *Bombus atratus* Franklin in Andean Highlands (Hymenoptera: Apidae). *J. Hym. Res.* 13(2): 234-242.
- Gordon J. & L. Davis.** 2003. *Valuing honeybee pollination*. Rural Industries Research and Development Corporation. Canberra, Australia. 36 pp.
- Goulson D.** 2003. Effects of introduced bees on native ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 34: 1-26.
- Goulson D. & M. E. Hanley.** 2004. Distribution and forage use of exotic bumblebees in South Island, New Zealand. *New Zealand J. Ecol.* 28(2): 225-232.
- Goulson D., G. C. Lye & B. Darvill.** 2008. Decline and Conservation of Bumble Bees. *Ann. Rev. Entomol.* 53: 191-208.
- Grixti J. C., L. T. Wong, S. A. Cameron & C. Favret.** 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biol. Conservat.* 142: 75-84.
- Grobov O. F. & O. I. Bondarenko.** 1975. A study of the interaction between *Malpighamoeba mellificae* and *Nosema apis* in the honey bee. *Trudy Vsesoyuz Eksper. Vet.* 43: 268-272.
- Guardiola C.** 2002. Prevalencia de nosemosis y amebiasis en un grupo de explotaciones apícolas, en la IX Región de la Araucanía, Chile. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 91 pp.
- Hassanein M. H.** 1952. Some studies on amoeba disease. *Bee World* 33: 109-112.

- Hausmann K., N. Hülsmann & R. Radek.** 2003. *Protistology*. 3^a ed. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Ed.). Stuttgart, Alemania. 379 pp.
- Heinrich B.** 1979. *Bumblebee economics*. 3rd ed. Harvard University Press, London. 245 pp.
- Henry J. E.** 1977. Development of microbial agents for the control of Acrididae. *Rev. Soc. Ent. Arg.* 36(1-4): 125-134.
- Higes M., R. Martín & A. Meana.** 2006a. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invert. Pathol.* 92: 81-83.
- Higes M., R. Martín, A. Sanz, N. Álvarez, A. Sanz, P. García-Palencia & A. Meana.** 2006b. El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola* 133: 15-21.
- Higes M., P. García-Palencia, R. Martín-Hernández & A. Meana.** 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honey bees with the Microsporidia *Nosema ceranae*. *J. Invert. Pathol.* 94: 211-217.
- Higes M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, C. Botías, P. García-Palencia & A. Meana.** 2008a. Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environ. Microbiol.* 10: 1374-1379
- Higes M., R. Martín-Hernández, C. Botías, E. Garrido-Bailón, A. V. González-Porto, L. Barrios, M. J. del Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jiménez, P. García-Palencia & A. Meana.** 2008b. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honey bee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10: 2659-2669.
- Higes M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, C. Botías & A. Meana.** 2009a. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *J. Apic. Res.* 48(3): 217-219.
- Higes M., R. Martín-Hernández, A. Martínez-Salvador, E. Garrido-Bailón, A. V. González-Porto, A. Meana, J. L. Bernal, M. J. del Nozal & J. Bernal.** 2009b. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ. Microbiol. Reports* 2(2): 243-250.
- Higes M., R. Martín-Hernández & A. Meana.** 2010a. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41(3): 375-392.
- Higes M., P. García-Palencia, C. Botías, A. Meana & R. Martín-Hernández.** 2010b. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environ. Microbiol. Reports*. En prensa.
- Higo H. A., N. D. Rice, M. L. Winston & B. Lewis.** 2004. Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Distribution and Potential for Supplementary Pollination in Commercial Tomato Greenhouses During Winter. *J. Econ. Entomol.* 97(2): 163-170.
- Hines H. M.** 2008. Historical Biogeography, Divergence Times, and Diversification Patterns of Bumble Bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Syst. Biol.* 57(1): 58-75.

- Hingston A. B., J. Marsden-Smedley, D. A. Driscoll, S. Corbett, J. Fenton, R. Anderson, C. Plowman, F. Mowling, M. Jenkin, K. Matsui, K. J. Bonham, M. Ilowski, P. B. McQuillan, B. Yaxley, T. Reid, D. Storey, L. Poole, S. A. Mallick, N. Fitzgerald, J. B. Kirkpatrick, J. Febey, A. Harwood, K. F. Michaels, M. J. Russell, P. G. Black, L. Emmerson, M. Visoiu, J. Morgan, S. Breen, S. Gates, M. N. Bantich & J. M. Desmarchelier.** 2002. Extent of invasion of Tasmanian native vegetation by the exotic bumblebee *Bombus terrestris* (Apoidea: Apidae). *Austral Ecology* 27: 162-172.
- Hinojosa A. & D. González.** 2004. Prevalencia de parásitos en *Apis mellifera* L. en colmenares del secano costero e interior de la VI Región, Chile. *Parasitol. Latinoam.* 59: 137-141.
- Hopkins I.** 1914. History of the bumble-bee in New Zealand: its introduction and results. N. Z. Dept. Agric. Ind. Comm. 46: 13-29.
- Huang W. F., J. H. Jiang & C. H. Wang.** 2005. *Nosema ceranae* infection in *Apis mellifera*. 38th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology. Anchorage, Alaska.
- Huang W. F., J. H. Jiang, Y. W. Chen & C. H. Wang.** 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38: 30-37.
- Imhoof B. & P. Schmid-Hempel.** 1999. Colony success of the bumble bee, *Bombus terrestris*, in relation to infections by two protozoan parasites, *Crithidia bombi* and *Nosema bombi*. *Insect. Soc.* 46: 233-238.
- Inari N., T. Nagamitsu, T. Kenta, K. Goka & T. Hiura.** 2005. Spatial and temporal pattern of introduced *Bombus terrestris* abundance in Hokkaido, Japan, and its potential impact on native bumblebees. *Population Ecology* 47: 77-82.
- Invernizzi C., E. Santos, E. García & G. Daners.** 2005. *Nosema apis* and *Varroa destructor* from honeybee colonies of *Eucalyptus* spp. forestations in Uruguay. Proceedings of the XXXIX Apimondia International Apicultural Congress. Dublin, Ireland.
- Invernizzi C., C. Abud, I. H. Tomasco, J. Harriet, G. Ramallo, J. Campá, H. Katz, G. Gardiol & Y. Mendoza.** 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Invert. Pathol.* 101(2): 150-153.
- Ivanić M.** 1937. Die Entwicklungsgeschichte und die Parasitare Zerstorungsarbeit einer in den Zellen der Malpighischen Gefäße der Honigbiene (*Apis mellifica*) schmarotzenden Haplosporidie *Nephridiophaga apis* n. g., n. sp. *La Cellule* 45: 291-324.
- Janke M. & P. Rosenkranz.** 2008. Periodical honey bee colony losses in Germany: preliminary results from a four years monitoring project. Hazards of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group. Bucarest, Rumania. Pp: 108-117.
- Javorek S. K., K. E. Mackenzie & S. P. Vander Kloet.** 2002. Comparative Pollination Effectiveness Among Bees (Hymenoptera: Apoidea) on Lowbush Blueberry (Ericaceae: *Vaccinium angustifolium*). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 95(3): 345-351.
- Jaycox E. R.** 1960. Surveys for Nosema Disease of Honey Bees in California. *J. Econ. Entomol.* 53(1): 95-98.

- Jean-Prost P., P. Médori & Y. Le Conte.** 2007. *Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena.* Mundi-Prensa (Ed.). Madrid, España. 791 pp.
- Jilian J., W. Jie, P. Wenjun, A. Jiandong, G. Zhanbao & T. Yuemin.** 2005. *Nosema bombi*, a microsporidian pathogen of the bumble bee *Bombus lucorum*. *J. Apic. Sci.* 49: 53-57.
- Johnson A. P.** 2007. Host variability and parasitism in *Bombus terrestris*. PhD Thesis. Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich.
- Kamler M., D. Titěra, J. Ty, Š. Ryba & B. Koudela.** 2009. *Nosema* situation in the Czech republic. COLOSS Workshop. *Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization. Guadalajara. España.
- Kauko L., S. Honko & H. Vartiainen.** 2002. Winter mortality and *Nosema apis* Z. The diagnostical value of *Nosema* spore counts – a clinical approach. *Ann. Univ. Marie Curie-Sklodowska LVII(19)*: 199-204.
- Keeling P. J.** 2009. Five Questions about Microsporidia. *PLoS Pathog.* 5(9): e1000489.
- Keeling P. J. & N. M. Fast.** 2002. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* 56: 93–116.
- Klee J., A. M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D. Q. Tam, T. X. Chinh, F. Puerta, J. M. Ruz, P. Kryger, D. Message, F. Hatjina, S. Korpela, I. Fries & R. J. Paxton.** 2007. Widespread dispersal of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invert. Pathol.* 96: 1–10.
- Klein A. M., J. H. Vaissiere, J. H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen & T. Tscharntke.** 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Lond.* 274: 303–313.
- Korner P. & P. Schmid-Hempel.** 2005. Correlates of parasite load in bumblebees in an Alpine habitat. *Entomol. Science* 8: 151–160.
- Kosior A., W. Celary, P. Olejniczak, J. Fijat, W. Krol, W. Solarz & P. Plonka.** 2007. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of western and central Europe. *Oryx* 41: 79-88.
- Kraus F. B., S. Wolf & R. F. A. Moritz.** 2009. Male flight distance and population substructure in the bumblebee *Bombus terrestris*. *J. Animal Ecol.* 78: 247-252.
- Kudo R. R.** 1931. *Handbook of protozoology.* Charles C. Thomas, Springfield. 451 pp.
- Kwei J. & K. Ho.** 1981. Studies on *Nosema* disease of Honey bee (*Apis mellifera*). The seasonal variation of *Nosema apis* Zander in Taiwan. *Chinese J. Entomol.* 1: 113.
- L'Arrivée J. C. M.** 1963a. The effects of Sampling on *Nosema* Determination. *J. Insect. Pathol.* 5: 349-355.
- L'Arrivée J. C. M.** 1963b. Comparison of Composite Versus Individual Bee Sampling for *Nosema apis* Zander. *J. Insect. Pathol.* 5: 434-439.

- L'Arrivée J. C. M.** 1965a. Sources of *Nosema* infection. *Am. Bee J.* 105: 246–248.
- L'Arrivée J. C. M.** 1965b. Tolerance of Honey Bees to *Nosema* Disease. *J. Invert. Pathol.* 7: 408-413.
- Lacey L. A. & W. M. Brooks.** 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. En: Lacey L. A. (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego. Pp: 1–15.
- Lange C. E.** 1993. Unclassified Protists of Arthropods: The Ultrastructure of *Nephridiophaga periplanetae* (Lutz & Splendore, 1903) N. comb., and the affinities of the Nephridiophagidae to other protists. *J. Eukariot. Microbiol.* 40(6): 689-700.
- Lange C. E.** 1996. Protistas patógenos de insectos terrestres. En: Lecuona, R. (Ed.). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de plagas*. M. Mas., Bs. As. Pp: 87-104.
- Lange C. E.** 2003. Long-term Patterns of occurrence of *Nosema locustae* and *Perezia dichroplusae* (Microsporidia) in Grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) of the Pampas, Argentina. *Acta Protozool.* 42: 309-315.
- Lange C. E.** 2005. The host and geographical range of the grasshopper pathogen *Paranosema (Nosema) locustae* revisited. *J. Orth. Res.* 14(2): 137-141.
- Lange C. E. & J. E. Henry.** 1996. Métodos de estudio y producción de protistas entomopatógenos. En: Lecuona, R. (Ed.). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de plagas*. M. Mas., Bs. As. Pp: 169-176.
- Langridge D. F.** 1961. *Nosema* disease in the honey bee and some investigations into its control in Victoria, Australia. *Bee World* 42: 36-40.
- Langridge D. F. & R. B. McGhee.** 1967. *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. *J. Protozool.* 14(3): 485-487.
- Larsson J. I. R.** 1999. Identification of Microsporidia. *Acta Protozool.* 38: 161-197.
- Larsson J. I. R.** 2007. Cytological variation and pathogenicity of the bumble bee parasite *Nosema bombi* (Microspora, Nosematidae). *J. Invert. Pathol.* 94: 1–11.
- Liersch S. & P. Schmid-Hempel.** 1998. Genetic variation within social insect colonies reduces parasite loads. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 221-225.
- Lipa J. J. & O. Triggiani.** 1988. *Crithidia bombi* sp. n., a flagellated parasite of a bumble bee *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Acta Protozool.* 27(3/4): 287-290.
- Lipa J. J. & O. Triggiani.** 1996. *Apicystis* gen. nov. and *Apicystis bombi* (Liu, Macfarlane & Pengelly) comb. nov. (Protozoa: Neogregarinida), a cosmopolitan parasite of *Bombus* and *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 27: 29-34.
- Liu H. J.** 1973. *Bombus* Latr. (Hymenoptera: Apidae) in Southern Ontario: its role and factors affecting it. M. Sc. Thesis, University of Guelph, Guelph, Canada.

- Liu H. J., R. P. Macfarlane & D. H. Pengelly.** 1974. *Mattesia bombi* n sp. (Neogregarinida: Ophrocystidae), a parasite of *Bombus* (Hymenoptera: Apidae). *J. Invert. Pathol.* 23: 225-31.
- Logan A., M. X. Ruiz-González & M. J. F. Brown.** 2004. The impact of host starvation on parasite development and population dynamics in an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology* 130: 637–642.
- Loncaric I., I. Derakhshifar, H. Köglberger, R. Moosbeckhofer, R. Martín, M. Higes & A. Meana.** 2007. First report of *Nosema ceranae* in colonies of *Apis mellifera carnica* in Austria. 3rd Meeting “Prevention of bee losses in Europe”. Wageningen, Netherlands.
- Lundberg H.** 1980. Effects of weather on foraging-flights of bumblebees (Hymenoptera, Apidae) in a subalpine/alpine area. *Holarct. Ecol.* 3: 104–110.
- Maassen A.** 1916. Über Bienenkrankheiten. *Mitt. Kas. Biol. Reichsanstalt* 16: 51-58.
- Maassen A.** 1919. Weitere Mitteilungen über Bienenkrankheiten und ihre Bekämpfung. *Mitt. Kas. Biol. Reichsanstalt* 17: 37-45.
- Macfarlane R. P.** 1975. The Nematode *Sphaerularia bombi* (Sphaerulariidae) and the Mite *Locustacurus buchneri* (Podapolipidae) in Bumble Bee queens *Bombus* spp. (Apidae) in New Zealand. *The New Zealand Entomologist* 6(1): 7-9.
- Macfarlane R. P. & R. P. Griffin.** 1990. New Zealand distribution and seasonal incidence of the nematode, *Sphaerularia bombi* Dufour, a parasite of bumblebees. *New Zealand J. Zool.* 17(2): 191-199.
- Macfarlane R. P. & L. Gurr.** 1995. Distribution of bumblebees in New Zealand. *The New Zealand Entomologist* 18: 29-36.
- Macfarlane R. P., L. A. Royce, B. K. W. Wyatt & D. F. Mayer.** 1994. Evaluation of commercial bumble bee colonies for cranberry pollination. *Melandria* 50: 13-19.
- Maddox J. V.** 1987. Protozoan diseases. En: J. R. Fuxa & Y. Tanada (Ed.). *Epizootiology of insects diseases*. John Wiley & Sons, New York. Pp: 417 – 452.
- Madjidian J. A., C. L. Morales & H. G. Smith.** 2008. Displacement of a native by an alien bumblebee: lower pollinator efficiency overcome by overwhelmingly higher visitation frequency. *Oecologia* 156: 835-845.
- Maggi M. D., N. H. Sardella, S. R. Ruffinengo & M. J. Eguaras.** 2009. Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitol. Res.* 105: 1629–1636.
- Malone L. A., H. A. Giacón, R. J. Hunapo & C. A. McIvor.** 1992. Response of New Zealand honey bee colonies to *Nosema apis*. *J. Apic. Res.* 31(3/4): 135-140.
- Martin S. J.** 2001. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J. Appl. Ecol.* 38: 1082–1093.

- Martín-Hernández R., A. Meana, L. Prieto, A. Martínez Salvador, E. Garrido-Bailón & M. Higes.** 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6331–6338.
- Martín-Hernández R., A. Meana, P. García-Palencia, P. Martín, C. Botías, E. Garrido-Bailón, L. Barrios & M. Higes.** 2009a. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2554–2557.
- Martín-Hernández R., C. Botías, A. Meana & M. Higes.** 2009b. *Nosema* diagnostic. COLOSS Workshop. *Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization. Guadalajara. España
- Martínez E.** 2001. Polinización de alfalfa. *Megachile rotundata*. Hoja informativa N° 14 - EEA INTA Hilario Ascasubi.
- Martínez E. & G. Rodríguez.** 1999. Papel de los insectos polinizadores en la producción de alimentos. *Gestión apícola* 3(15): 21-24.
- Martínez E., J. P. Renzi & R. Matarazzo.** 2007. Boletín INTA Informa N° 448.
- Martínez E., R. Matarazzo, J. P. Renzi & E. Schmid.** 2008. Efecto de la polinización en cultivos de interés apícola e industrial. Hoja informativa N° 83 - EEA INTA Hilario Ascasubi.
- Martins A. C. & G. A. R. Melo.** 2009. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? *J. Insect Conserv.* 14(2): 207-210.
- Matheson A.** 1996. World bee health update. *Bee World* 77: 45–51.
- McIvor C. A. & L. A. Malone.** 1995. *Nosema bombi*, a microsporidian pathogen of the bumble bee *Bombus terrestris* (L.). *New Zealand J. Zool.* 22(1): 25–31.
- Meana A., R. Martín-Hernández & M. Higes.** 2010. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *J. Apic. Res.* 49(2): 212-214.
- Meeus I., D. C. de Graaf, K. Jans & G. Smagghe.** 2009. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *J. Appl. Microbiol.* 109(1): 107-115.
- Melo G. A. R.** 1999. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. *Scientific Papers, University of Kansas Natural History Museum* 14: 1-55.
- Michener C. D.** 2007. *The Bees of the World*. 2nd ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. MD. 953 pp.
- Mikkola K.** 1978. Spring migrations of wasp and bumble bees on the southern coast of Finland (Hymenoptera, Vespidae and Apidae). *Annales Entomologici Fennici* 44(1): 10–26.
- Moeller F. E.** 1956. The Behaviour of *Nosema*-Infected Bees Affecting Their Position in the Winter Cluster. *J. Econ. Entomol.* 49(6): 743-745.

- Molet M., L. Chittka & N. E. Raine.** 2009. How floral odours are learned inside the bumblebee (*Bombus terrestris*) nest. *Naturwissenschaften* 96: 213–219.
- Montiel J. O.** 1978. Varroasis en abejas. Dirección Nacional de Fiscalización y comercialización ganadera. Área de Granja. Ministerio de Economía. Secretaria de estado de agricultura y ganadería. Bs. As. Arg.
- Montiel J. O.** 1980. Varroasis en la Argentina. *Gaceta del colmenar* 485: 395-398.
- Morales C. L.** 2007a. Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: causas, consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecología austral* 17: 51-65.
- Morales C. L.** 2007b. Un polinizador en riesgo. *Ecos del Parque* 4: 3.
- Morales C. L. & M. A. Aizen.** 2006. Informe sobre la solicitud de autorización de importación de *Bombus impatiens* a Argentina. 31 pp.
- Morandín L. A., T. M. Lavery & P. G. Kevan.** 2001a. Effect of Bumble Bee (Hymenoptera: Apidae) Pollination Intensity on the Quality of Greenhouse Tomatoes. *J. Econ. Entomol.* 94(1): 172-179.
- Morandín L. A., T. M. Lavery & P. G. Kevan.** 2001b. Bumble Bee (Hymenoptera: Apidae) Activity and Pollination Levels in Commercial Tomato Greenhouses. *J. Econ. Entomol.* 94(2): 462-467.
- Morrone J. J.** 2001. *Biogeografía de América Latina y el Caribe*. Vol. 3. M&T- Manuales & Tesis SEA (Ed.). Zaragoza. 148 pp.
- Moure J. S. & S. F. Sakagami.** 1962. As mamangabas sociais do Brasil (*Bombus* Latreille) (Hymenoptera, Apoidea). *Studia Entomol.* 5: 65-194.
- Murphy G. M.** 2008. *Atlas agroclimático de la Argentina*. 1ª ed. U.B.A. Bs. As. 160 pp.
- Nagamitsu T., T. Kenta, N. Inari, E. Kato & T. Hiura.** 2007. Abundance, body size, and morphology of bumblebees in an area where an exotic species, *Bombus terrestris*, has colonized in Japan. *Ecol. Res.* 22: 331–341.
- Nagamitsu T., H. Yamagishi, T. Kenta, N. Inari & E. Kato.** 2010. Competitive effects of the exotic *Bombus terrestris* on native bumble bees revealed by a field removal experiment. *Popul. Ecol.* 52(1): 123-136.
- Nates-Parra G.** 2006. Familia Apidae. En: Fernández F. & M. J. Sharkey (Eds.). *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. SOCOLEN, Univ. Nacional de Colombia. Pp: 487-503.
- Naug D. & S. Camazine.** 2002. The Role of Colony Organization on Pathogen Transmission in Social Insects. *J. Theor. Biol.* 215: 427-439.
- Nieves-Aldrey J. L. & F. M. Fontal-Cazalla.** 1999. Filogenia y Evolución del Orden Hymenoptera. *Bol. Soc. Entomol. Aragonesa* 26: 459-474.
- Noll F. B.** 2002. Behavioral Phylogeny of Corbiculate Apidae (Hymenoptera; Apinae), with Special Reference to Social Behavior. *Cladistics* 18: 137–153.

Núñez J. 1977. Nectar flow by melliferous flora and gathering flow by *Apis mellifera ligustica*. J. Insect Physiol. 23: 265-276.

O.I.E. 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 1 (2.2.4): 410-414.

Oldroyd B. P. 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. Tree 14(8): 312-315.

Oldroyd B. P. 2007. What's killing American honey bees? PLoS Biol. 5: 1195-1199.

Onstad D. W., J. R. Fuxa, R. A. Humber, J. Oestergaard, D. I. Shapiro Ilan, V. V. Gouli, R. S. Anderson, T. G. Andreadis & L. A. Lacey. 2006. *An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology*. 3rd ed. Society of Invertebrate Pathology.

Orantes F. 2000. Amebiosis y tripanosomiosis. Estudio de su prevalencia en apiarios del sur de España. Vida apícola 102: 25-27.

Otterstatter M. C. & J. D. Thomson. 2008. Does Pathogen Spillover from Commercially Reared Bumble Bees Threaten Wild Pollinators? PLoS ONE 3(7): e2771.

Page R. D. M. 1994. Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. Cladistics 10: 155-173.

Patterson D. J. & J. Larsen. 1991. Nomenclatural problems with protists. En: Hawksworth, D. L. (Ed.). *Improving the Stability of Names: Needs and Options*. Koeltz Scientific Books, Königstein. Pp: 197-208.

Paxton R. J. 2006. The distribution and abundance of microsporidia in bumble bees of Europe. En: *Biodiversity, Impact and Control of Microsporidia in Bumble Bee (*Bombus* spp.) Pollinators: Technical report on *Nosema bombi**. The Pollinator Parasite project group. Pp: 79-92.

Paxton R. J. 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)? J. Apic. Res. 49(1): 80-84

Paxton R. J., J. Klee, S. Korpela & I. Fries. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. Apidologie 38: 558-565.

Petillon J., F. Ysnel, A. Canard & J. C. Lefeuvre. 2005. Impact of an invasive plant (*Elymus athericus*) on the conservation value of tidal salt marshes in western and implications for management: Responses of spider populations. Biol. Conserv. 126: 103-117.

Piccirillo G. A. & M. Q. de González. 1995. Distribución de los apiarios y diagnóstico sanitario de las abejas africanizadas, *Apis mellifera scutellata* (L.) (Hymenoptera: Apidae) del Estado Zulia. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 12: 269-283.

Pilgrim E. M., C. D. von Dohlen & J. P. Pitts. 2008. Molecular phylogenetics of Vespoidea indicate paraphyly of the superfamily and novel relationships of its component families and subfamilies. Zoologica Scripta 37(5): 539-560.

Pimentel D. (Ed.). 2002. *Biological Invasions. Economics and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species*. CRC Press, Boca Raton. FL. 384 pp.

- Plischuk S. & C. E. Lange.** 2009. Invasive *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) parasitized by a flagellate (Euglenozoa: Kinetoplastea) and a neogregarine (Apicomplexa: Neogregarinorida). *J. Invert. Pathol.* 102: 263–265.
- Plischuk S., R. Martín-Hernández, C. E. Lange & M. Higes Pascual.** 2008a. Detección de *Nosema ceranae* (Microsporidia) en *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) de la región Pampeana. VII^o Congreso Argentino de Entomología. Huerta Grande, Córdoba, Arg.
- Plischuk, S., R. Martín-Hernández, A. Meana, C. E. Lange & M. Higes.** 2008b. First report of *Nosema ceranae* in depopulated honey bee colonies in Argentina. 3rd European Conference of Apidology (EurBee3). Belfast, UK.
- Plischuk S., R. Martín-Hernández, L. Prieto, M. Lucía, C. Botías, A. Meana, A. H. Abrahamovich, C. E. Lange & M. Higes.** 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Reports* 1: 131-135.
- Poinar G. O. & G. M. Thomas.** 1984. *Laboratory guide to insect pathogens and parasites*. Plenum Press. New York. 392 pp.
- Prell H.** 1926. Beiträge zur Kenntnis der Amöbenseuche der erwachsenen Honigbiene. *Arch. Bienenkd.* 7: 113-121.
- Prell H.** 1927. Beiträge zur Kenntnis einer Amöbenseuche der Honigbiene. *Z. Angew. Entomol.* 12: 163-168.
- Price P. W.** 1980. *Evolutionary biology of parasites. Monographs in population biology*. Princeton University Press, Princeton. NJ.
- Proctor M., P. Yeo & A. Lack.** 1996. *The natural history of Pollination*. Great Britain Harper & Collins Publishers. Bath Press, Britain. 479 pp.
- Prouveau A.** 1984. Biologie et écologie des bourdons. En: Person P. & Louveaux J. (Eds). *Pollinisation et Productions Végétales*. Paris, Francia. Pp: 595–630.
- Radek R. & W. Herth.** 1999. Ultrastructural investigation of the spore-forming protist *Nephridiophaga blatellae* in the Malpighian tubules of the German cockroach *Blattella germanica*. *Parasitol. Res.* 85: 216-231.
- Rasmont P., A. Coppee, D. Michez & T. De Meulemeester.** 2008. An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). *Ann. soc. entomol. Fr. (n.s.)* 44(1): 243-250.
- Ratnieks F. L. W. & N. L. Carreck.** 2010. Ecology: Clarity on Honey Bee Collapse? *Science* 327: 152.
- Razmaraii N. & H. Karimi.** 2010. A Survey of *Nosema* of Honey Bees (*Apis mellifera*) in East Azarbaijan Province of Iran. *J. An. Veter. Adv.* 9(5): 879-882.
- Reinhardt F., M. Herle, F. Bastiansen & B. Streit.** 2003. *Economic Impact of the Spread of Alien Species in Germany*. Federal Environmental Agency of Germany. 190 pp.

- Reynaldi F. J., G. H. Sguazza, M. R. Pecoraro, M. A. Tizzano & C. M. Galosi.** 2010. First report of viral infections that affect argentine honeybees. *Environ. Microbiol. Reports*. En prensa.
- Ringuelet R. A.** 1947. Difusión de las enfermedades parasitarias de las abejas en la Argentina y las medidas para combatirlas. Ministerio de Agricultura de la Nación. Arg. Publ. Misc. N° 261. 15 pp.
- Rodríguez J. P.** 2001. La amenaza de las especies exóticas para la conservación de la biodiversidad suramericana. *INCI* 26(10): 479-483.
- Roig-Alsina A.** 2008. Apiformes. En: Claps L., G. Debandi & S. Roig-Juñent (Eds.). *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos*. Vol II. Sociedad Entomológica Argentina Ediciones. Argentina. Pp: 373-390.
- Roig-Alsina A. & M. A. Aizen.** 1996. *Bombus ruderatus* Fabricius, un nuevo *Bombus* para la Argentina (Hymenoptera: Apidae). *Physis* 51(120- 121): 49-50.
- Roig-Alsina A. & C. D. Michener.** 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 55: 124-162.
- Root A. I.** 1990. *ABC y XYZ de la apicultura*. 37ª edición. Hemisferio Sur S. A. (Ed.). Buenos Aires. Arg. 723 pp.
- Rossi C. O. & M. R. Carranza.** 1980. Momificación de larvas de abeja (*Apis mellifera* L.) provocada por *Ascosphaera apis*. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 56: 11-15.
- Ruiz-González M. X. & M. J. F. Brown.** 2006. Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission. *Ecol. Entomol.* 31: 616-622.
- Rutrecht S. T. & M. J. F. Brown.** 2008. The life-history impact and implications of multiple parasites for bumble bee queens. *Internat. J. Parasitol.* 38: 799-808.
- Ruz L.** 2002. Bee Pollinators Introduced to Chile: a Review. En: Kevan P. & Imperatriz Fonseca V. L. (Eds.). *Pollinating Bees – The Conservation Link Between Agriculture and Nature*. Ministry of Environment. Brasilia. Pp: 155-167.
- Sagastume S., C. del Águila, R. Martín-Hernández, M. Higes & N. Henriques-Gil.** 2010. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honey bees. *Environ. Microbiol. Reports*. En prensa.
- Sakofski F. & N. Koeniger.** 1988. Natural transfer of *Varroa jacobsoni* between honeybee colonies in autumn. En: Cavalloro R. (Ed.). *European research on varroaosis control*. Rotterdam, Holanda. Pp: 81-83.
- Sánchez N. E., M. G. Luna & A. H. Abrahamovich.** 2006. Informe en relación al pedido de introducción del polinizador exótico, *Bombus impatiens*, en Argentina. 9 pp.
- Santrac V., A. Granato & F. Mutinelli.** 2009. First detection of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* from Bosnia and Herzegovina. COLOSS Workshop. *Nosema disease: lack of knowledge and work standardization*. Guadalajara. España.
- Sarlo G. E.** 2007. *Nosema ceranae*: parásito sin fronteras. *Apicultura sin fronteras* 13: 2-3.

- Sarlo G. E., S. Medici & J. Marcángeli.** 2002a. Curva anual de esporulación de *Nosema apis* en colmenas de *Apis mellifera* en el sudeste de la provincia de Bs. As. Vº Cong. Arg. de Entomología. Buenos Aires.
- Sarlo G. E., S. Medici & J. Marcángeli.** 2002b. Efecto de la sal de biciclohexilamonio sobre el grado de esporulación y tiempo de reversión de *Nosema apis* Z. (Microsporidea: Nosematidae) en la abeja melífera *Apis mellifera*. Tratamiento primaveral. Vº Cong. Arg. de Entomología. Buenos Aires.
- Sarlo E., S. Medici, D. Porrini & M. Eguaras.** 2005. Variaciones en la toma de muestra destinada a la evaluación del grado de infección por *Nosema apis* Z. en colonias de *Apis mellifera* L., del sudeste de la provincia de Buenos Aires. 1º Cong. de Apicultura del Mercosur. Punta del Este, Uruguay.
- Sarlo E. G., S. K. Medici, M. Braunstein & M. Eguaras.** 2008. Presencia y distribución de *Nosema ceranae* en la región sudeste de la Provincia de Buenos Aires. 2º Cong. Arg. de Apicultura. Mar del Plata, Arg.
- Schmid-Hempel P.** 1998. *Parasites in Social Insects*. Princeton Univ. Press.
- Schmid-Hempel P.** 2001. On the evolutionary ecology of host–parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften* 88: 147–158.
- Schmid-Hempel P. & R. Loosli.** 1998. A contribution to the knowledge of *Nosema* infections in Bumble bees, *Bombus* spp. *Apidologie* 29: 525-535.
- Schmid-Hempel P. & C. Reber Funk.** 2004. The distribution of genotypes of the trypanosome parasite, *Crithidia bombi*, in populations of its host, *Bombus terrestris*. *Parasitology* 129: 147–158.
- Schmid-Hempel P. & R. Schmid-Hempel.** 1993 Transmission of a pathogen in *Bombus terrestris*, with a note on division of labour in social insects. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 33: 319-327.
- Schwantes U. & D. Eichelberg.** 1984. Elektronenmikroskopische untersuchungen zum parasitenbefall der malpighischen gefäße von *A. mellifera* durch *M. mellificae* (Rhizopoda). *Apidologie* 15: 435-450.
- Screpis M. A., H. M. Monti, B. B. de García, R. Sabattini, A. M. Dall'Oglio, S. Lezcano, A. F. Dorsch, C. I. Mathern, J. Cornejo, J. Rupp, M. A. Bahler, V. I. Fussi, M. I. Riffel & A. Cuesta de Scorciapino.** 1995. *Estudio apibotánico en la provincia de Entre Ríos*. Secretaría de Estado de la Producción de la Provincia de Entre Ríos. Dirección General de Economía Regional y Desarrollo Rural, Argentina. 63 pp.
- Semmens T. D., E. Turner & E. Buttermore.** 1993. *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) now established in Tasmania. *J. Aust. Ent. Soc.* 32: 346.
- Shafer A. B., G. R. Williams, D. Shutler, R. E. Rogers & D. T. Stewart.** 2009. Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and bees (Hymenoptera: apidae) suggest both cospeciation and host switch. *J. Parasitol.* 95: 198-203.
- Sharkey M. J.** 2007. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. En: Zhang, Z. Q. & W. A. Shear (Eds.). *Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy*. *Zootaxa* 1668: 521–548.
- Showers R. E., F. A. Jones & F. E. Moeller.** 1967. Cross-Inoculation of the Bumble Bee *Bombus fervidus* with the Microsporidian *Nosema apis* from the Honey Bee. *J. Econ. Entomol.* 60(3): 774-777.

- Shykoff J. A. & P. Schmid-Hempel.** 1991. Incidence and effects of four parasites in natural population of bumble bees of Switzerland. *Apidologie* 22: 117-125.
- Silveira F. A., G. A. R. Melo & A. B. Almeida.** 2002. *Abelhas brasileiras. Sistemática e identificação*. Belo Horizonte, Brasil. 253 pp.
- Smith J. E.** 2009. The ecology and evolution of microsporidian parasites. *Parasitology* 136(14): 1901-1914.
- Sokolova Y. Y., C. E. Lange & J. R. Fuxa.** 2008. Phylogenetic relationships of *Heterovesicula cowani*, a microsporidian pathogen of Mormon crickets, *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigonidae), based on SSU rDNA-sequence analyses. *J. Invert. Pathol.* 99: 112-116.
- Sokolova Y. Y., I. M. Sokolov & C. E. Carlton.** 2010. Identification of *Nosema bombi* Fantham and Porter 1914 (Microsporidia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA). *J. Invert. Pathol.* 103: 71-73.
- Sprague V.** 1966. Some problems relevant to biology and taxonomy of Haplosporidia. *Proceed. 1st Int. Congr. Parasitol.* 1: 449-450. Pergamon Press, Londres.
- Sprague V.** 1970. Recent problems of taxonomy and morphology of Haplosporidia. *J. Parasitol.* 56: 327-328.
- Sprague V.** 1979. Classification of the Haplosporidia. En: F. O. Perkins (Ed.). *Haplosporidian and haplosporidian-like diseases of shellfish*. *Marine Fisheries Review* 41: 40-44.
- Stejskal M.** 1965. Gregarines parasitizing honey bees. *Am. Bee J.* 35(10): 374-375.
- Stejskal M.** 1972. Gregarinas (Protozoa) parásitos de abejas *Apis mellifica* L. en Venezuela. *Turrialba* 22(1): 30-39.
- Stubbs C. S. & F. A. Drummond.** 2001. *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) An Alternative to *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) for Lowbush Blueberry Pollination. *J. Econ. Entomol.* 94(3): 609-616.
- Tanada Y. & H. K. Kaya.** 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.
- Tay W. T., L. M. O'Mahony & R. J. Paxton.** 2005. Complete rRNA Gene Sequences Reveal that the Microsporidium *Nosema bombi* Infects Diverse Bumblebee (*Bombus* spp.) Hosts and Contains Multiple Polymorphic Sites. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52(6): 505-513.
- Tellería M. C.** 1988. Analyse polinique des miels du Nord-Ouest de la province de Buenos Aires (Republique Argentine). *Apidologie* 19(3): 275-290.
- Tellería M. C.** 1992. Caracterización botánica y geográfica de las mieles de la provincia fitogeográfica pampeana (República Argentina) I: Distrito Oriental. *Darwiniana* 31(1-4): 345-350.
- Tellería M. C.** 1996. Caracterización botánica y geográfica de las mieles de la provincia fitogeográfica pampeana (República Argentina) II: Tandilia. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 32(1-2): 91-94.

- Thorp R.** 2003. En: Sokolova *et al.*, 2010.
- Topolska G. & A. Hartwig.** 2005. Diagnosis of *Nosema apis* infection by investigations of two kind of samples: dead bees and live bees. *J. Apic. Sci.* 49(2): 75-78.
- Topolska G. & S. Kasprzak.** 2007. First cases of *Nosema ceranae* infection in bees in Poland. *Medycyna Weterynaryjna* 63: 1504-1506.
- Torchio P. F.** 1972. *Sapyga pumila* Cresson, a parasite of *Megachile rotundata* (F.) (Hymenoptera: Sapygidae; Megachilidae). *Melanderia* 10: 1-22.
- Torreta J. P., D. Medan & A. H. Abrahamovich.** 2006. First record of the invasive bumblebee *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Trans. Am. Entomol. Soc.* 132: 285-289.
- Undeen H. H. & J. Vávra.** 1997. Research methods for entomopathogenic Protozoa. En: L. Lacey (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Acad. Press, San Diego. Pp: 117-151.
- Underwood R. & D. vanEngelsdorp.** 2007. Colony Collapse Disorder: have we seen this before? *Bee Culture* 35: 13-18.
- Valera F., R. Martín-Hernández & M. Higes.** 2010. Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environ. Microbiol. Reports*. En prensa.
- Valle A., A. Andrada, E. Aramayo & S. Lamberto.** 1995. Análisis polínico de las mieles del sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Investigación Agraria. Serie Producción y Protección Vegetales* 10: 375-383.
- Valle A., E. Aramayo, A. Andrada, M. Gil & S. Lamberto.** 2000. Análisis polínico de las mieles de tres partidos con litoral marítimo del sur de la provincia de Buenos Aires. Argentina. *IDESIA* 18: 33-40.
- van den Eijnde J. & N. Vette.** 1993. *Nosema* infection in honey bees (*Apis mellifera* L.) and bumble bees (*Bombus terrestris* L.). *Proc. Sect. Exp. Appl. Entomol. Neth. Entomol. Soc.* 4: 205-208.
- van der Steen J.** 2006. Cross infectivity of *Nosema bombi*, transmission and impact on bumble bee colonies (*Bombus terrestris*). En: *Biodiversity, Impact and Control of Microsporidia in Bumble Bee (Bombus spp.) Pollinators: Technical report on Nosema bombi*. The Pollinator Parasite project group. Pp: 105-119.
- van der Steen J. & I. Fries.** 2006. Microsporidia in bumble bee rearing – significance and control. En: *Biodiversity, Impact and Control of Microsporidia in Bumble Bee (Bombus spp.) Pollinators: Technical report on Nosema bombi*. The Pollinator Parasite project group. Pp: 5-24.
- vanEngelsdorp D. & M. D. Meixner.** 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invert. Pathol.* 103: S80-S95.
- vanEngelsdorp D., J. D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B. K. Nguyen, M. Frazier, J. Frazier, D. Cox-Foster, Y. Chen, R. Underwood, D. R. Tarpy & J. S. Pettis.** 2009. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* 4(8): e6481. 17 pp.
- Velthuis H. H. W. & A. van Doorn.** 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie* 37: 421-451.

- Vilà M., S. Bacher, P. Hulme, M. Kenis, M. Kobelt, W. Nentwig, D. Sol & W. Solarz.** 2006. Impactos ecológicos de las invasiones de plantas y vertebrados terrestres en Europa. *Ecosistemas* 15(2): 13-23.
- Vitousek P. M., C. M. D'antonio, L. L. Loope, M. Rejmánek & R. Westbrooks.** 1997. Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zealand J. Ecol.* 21(1): 1-16.
- von Frisch K.** 1974. Decoding the language of the bee. *Science* 185: 663-668.
- Wallem P. K., C. G. Jones, P. A. Marquet & F. M. Jaksic.** 2007. Identificación de los mecanismos subyacentes a la invasión de *Castor canadensis* (Rodentia) en el archipiélago de Tierra del Fuego, Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 80: 309-325.
- Wang L. Y., D. A. Streett & J. E. Henry.** 1991. *Nosema montanae* n. sp. (Microsporidia: Nosematidae) a parasite from the grasshopper *Melanoplus packardii* (Orthoptera: Acrididae). *J. Invert. Pathol.* 58: 211-218.
- Webster T. C.** 1993. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.* 133: 869-870.
- Webster T. C.** 1994. Effects of Fumagillin on *Nosema apis* and Honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 87(3): 601-604.
- Westerkamp C.** 1991. Honeybees are poor pollinators - why? *Plant Systematics and Evolution* 177: 71-75.
- Williams G. R., A. B. A. Shafer, R. E. L. Rogers, D. Shutler & D. T. Stewart.** 2008a. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J. Invert. Pathol.* 97: 189-192.
- Williams G. R., M. A. Sampson, D. Shutler & R. E. Rogers.** 2008b. Does fumagillin control the recently-detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *J. Invert. Pathol.* 99: 342-344.
- Williams P. H., S. A. Cameron, H. M. Hines, B. Cederberg & P. Rasmont.** 2008c. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie* 39: 46-74.
- Willink A.** 1980. Sobre la presencia de *Vespula germanica* (Fabricius) en la Argentina (Hymenoptera: Vespidae). *Neotropica* 26: 205-206.
- Windsor D. A.** 1998. Most of the species on Earth are parasites. *Internat. J. Parasitol.* 28: 1939-1941.
- Winter K., L. Adams, R. Thorp, D. Inouye, L. Day, J. Asher & S. Buchmann.** 2006. Importation of non native bumble bees into North America: potential consequences of using *Bombus terrestris* and other non-native bumble bees for greenhouse crop pollination in Canada, Mexico, and the United States. A White Paper of the North American Pollinator Protection Campaign (NAPPC). 33 pp.
- Woodward D. R.** 1996. Monitoring for impact of the introduced leafcutting bee, *Megachile rotundata* (F) (Hymenoptera: Megachilidae), near release sites in South Australia. *Aust. J. Entomol.* 35: 187-191.
- Wylezich C., R. Radek & M. Schlegel.** 2004. Phylogenetische Analyse der 18S rRNA identifiziert den parasitischen Protisten *Nephridiophaga blatellae* (Nephridiophagidae) als Vertreter der Zygomycota (Fungi). *Denisia* 13: 435-442.

Xie Z. H. & Y. Tang. 2009. The progress in the study of *Bombus terrestris* invasion. J. Environ. Entomol. En prensa.

Zander E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene, Münchener Bienenzeitung 31: 196–204.

Páginas de internet

HymATol – <http://www.hymatol.org/glossary.html>

NCBI GenBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

Petit H. 2007. Preocupa desaparición de abejas en el norte de Córdoba. Acceso 26/06/07. <http://www.apicultura.entupc.com/>

SAGPyA – Dirección de Industria Alimentaria (Área apícola). 2009. Actualización del mes de Agosto. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/apicola>.

Servicio Meteorológico Nacional. 2007. <http://www.smn.gov.ar>