

SÍNDROME DE DESPOBLAMIENTO DE COLMENAS. ESTUDIO DE CASO EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES.

Genchi García ML.^{*1,2,3}, Plischuk S.^{4,5}, Bravi CM.^{2,4}, Reynaldi FJ.^{3,4}

Nombre: Genchi García María Laura

Dirección: Calle 63 n°483

Tel.: 0221 15419-2588

Correo electrónico: ml.genchigarcia@gmail.com

Nombre: Reynaldi Francisco José

Dirección: Calle 60 y 118 - Facultad de Ciencias Veterinarias

Tel.: 0221 423-6663

Correo electrónico: freynaldi@yahoo.com

Nombre: Bravi Claudio Marcelo

Dirección: Calle 526 y Con. General Belgrano - IMBICE

Tel.: 0221 4210121

Correo electrónico: cmbravi@yahoo.com.ar

Nombre: Plischuk Santiago

Dirección: Boulevard 120 s/n - CEPAVE

Tel.: 0221 423-2327

Correo electrónico: santiago@cepave.edu.ar

¹ CIC - Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

² IMBICE - Instituto Multidisciplinario de Biología Celular – CIC-CONICET-UNLP

³ Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP

⁴ CONICET - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

⁵ CEPAVE – Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores – CONICET-UNLP

INTRODUCCIÓN

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) cumplen un rol importante como polinizadores de diversos cultivos y contribuyen con los ecosistemas, su disminución amenaza a la polinización tanto de plantas silvestres como cultivadas, poniendo en peligro la biodiversidad, el alimento y la producción agrícola (Simon-Delso et al. 2014). El Síndrome de despoblamiento de colmenas (SDC) es un fenómeno que afecta a las poblaciones de abejas y que se caracteriza por la pérdida masiva de sus colonias, en especial durante la temporada invernal (vanEngelsdorp et al., 2009).

Varios factores podrían estar relacionados al SDC. Inicialmente, algunas hipótesis sugirieron que los pesticidas, el ácaro *Varroa* spp., virus y bacterias eran los posibles causantes de la muerte de las colonias (Meana et al., 2017). Otras, integran a la problemática factores como el clima desfavorable y la consiguiente falta de alimento disponible, prácticas de trashumancia a gran escala, o predisposición genética (Stokstad, 2007; Ellis et al., 2010; Francis et al., 2014). Posteriormente, otras hipótesis propusieron que el SDC sería producto de una combinación de factores, tales como la interacción entre patógenos, determinadas condiciones climáticas desfavorables, disminución de la flora apícola o incluso factores asociados al propio manejo (Ratnieks y Carreck, 2010; Ellis et al., 2010; vanEngelsdorp et al., 2009; Richardson, 2017). Finalmente, algunos autores señalan que las extensas pérdidas de colonias no son inusuales y han ocurrido repetidamente a lo largo de muchos siglos y lugares (Ratnieks y Carreck, 2010; Oldroyd, 2007).

La pérdida de colmenas observada durante las últimas décadas aparenta ser un problema extendido. Algunos apicultores en Estados Unidos han reportado pérdidas de hasta el 75% de sus colmenas entre 2006 y 2007 (vanEngelsdorp et al., 2009; 2010; 2017; Ellis et al., 2010; Oldroyd, 2007), La mortandad que ocasiona este fenómeno abarca desde el 35% al 100% de las colmenas en cada episodio. En Europa se han reportado fenómenos similares (Crailsheim et al., 2009; Dainat et al., 2012; Meana et al., 2017), pero en estos casos los síntomas no habrían sido los mismos que en Estados Unidos (Stokstad, 2007). En los últimos años también se han reportado numerosos casos de SDC en Asia (Haddad et al., 2009; Soroker et al., 2009) y Japón (Gutierrez, 2009), pero no hay casos registrados en Sudamérica, África, o Australia (Neumann y Carreck, 2010).

En 2017 se registró un posible caso de SDC en el que 170 colmenas pertenecientes al partido de General Alvear, provincia de Buenos Aires, nucleadas en 3 colmenares, habían sufrido la pérdida masiva de sus abejas. El objetivo del presente trabajo fue determinar las

posibles causas de dicho episodio a partir del estudio de presencia de patógenos en esas colmenas.

MATERIALES Y MÉTODOS

De cada colmenar se escogieron aleatoriamente tres/cuatro colmenas y de éstas se extrajeron ca. 100 individuos vivos que fueron conservados congelados a -32°C . Cada colmena escogida se consideró una muestra, totalizando diez. Los patógenos a determinar fueron virus, hongos, bacterias y ácaros que producen las enfermedades más prevalentes entre las poblaciones de abejas en la República Argentina. Para ello, diferentes técnicas fueron utilizadas, empleando, en caso de presentarse recomendación, aquellas validadas por la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA).

La prospección de virus se realizó a partir de la homogeneización de 10 individuos por muestra en stomacher con 2ml de PBS estéril (libre de nucleasas), seguida por la extracción y purificación del ARN viral con TriZol. Posteriormente se realizó la transcripción reversa del ARN, utilizando transcriptasa reversa (enzima MML-V) y random primers, con el fin de sintetizar el DNA complementario. Luego, se realizó una reacción de PCR múltiple utilizando primers específicos para los virus ABPV (Virus de la parálisis aguda de las abejas), BQCV (Virus de las celdas reales negras), CBPV (Virus de la parálisis crónica de las abejas), DWV (Virus de las alas deformadas de las abejas), KBV (Virus de Cachemira), SBV (Virus de la cría ensacada) e IAPV (Virus israelí de la parálisis aguda de las abejas) (Sguazza et al., 2013). Los resultados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

Para determinar la presencia del ácaro *Varroa* spp. se realizó la técnica validada por la OMSA para su detección y cuantificación. Se utilizaron 300 abejas por colmena que fueron tratadas con agentes tensioactivos para permitir la separación entre los ácaros y las abejas. Luego se utilizó un doble tamiz, el superior retuvo a las abejas y el inferior a los ácaros, posteriormente se realizó el conteo de ácaros y luego se estimó el porcentaje de infección multiplicando por 100 la cantidad de ácaros por abeja (número de ácaros/número de abejas) en cada muestra.

La detección de las bacterias *Melissococcus plutonius* (loque europea) y *Paenibacillus larvae* (loque americana) fue realizada a partir de la homogeneización y posterior extracción de ADN de 10 individuos por muestra, a partir de la utilización de DNAzol. Posteriormente se realizó una amplificación por PCR (Garrido-Bailón et al., 2013). La

presencia del hongo *Ascosphaera apis* (cría yesificada) se realizó conjuntamente con la detección de bacterias en una PCR múltiple (Garrido-Bailón et al., 2013).

Para el caso del hongo *Nosema* spp., se estimó la prevalencia mediante homogenización individual en agua bidestilada y observación de una gota del homogenato resultante en microscopio de contraste de fases (x400; x1000). Se prospectaron 100 individuos por muestra (Plischuk, 2010). Para cada muestra positiva, se separaron y homogeneizaron 35 intestinos que luego se colocaron en un mortero con PBS. A continuación, se maceró la muestra hasta obtener una mezcla homogénea y se realizó una dilución de 1 en 10 del macerado obtenido. Se colocó una gota del macerado en una cámara de Neubauer y se realizó el recuento de esporas bajo el microscopio (Cornejo y Rossi, 1975), con modificaciones. Una vez estimada la cantidad de esporas por mililitro, se utilizó la escala propuesta por Cornejo y Rossi (1975) para determinar el grado de infección.

Para la determinación genética de linajes maternos, el ADN total fue extraído a partir del tórax de un individuo por muestra empleando DNAzol. Posteriormente, se realizó la técnica de PCR-RFLP que permitió discriminar presencia de introgresión de genes africanos en las muestras (Pinto et al. 2003, con modificaciones) y, se analizó la variación de los patrones de restricción obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

RESULTADOS

Se procesaron las 10 colmenas para cada una de las enfermedades propuestas y se realizó la determinación genética de linajes maternos (Tabla 1). Las muestras exhibieron presencia de virus en 3 de las 10 colmenas estudiadas, 5 colmenas presentaron porcentajes variables de ácaros, y 3 colmenas (una de cada colmenar) presentaron niveles despreciables de infección por *Nosema* spp., mientras que ninguna colmena exhibió presencia de bacterias o de cría yesificada. Todos los individuos analizados pertenecieron a linajes maternos europeos sin introgresión de genes africanos.

Tabla 1. Resultados de la detección de virus, ácaros, bacterias, hongos y linaje materno para las muestras de despoblamiento. Los resultados se expresan como (+) para aquellos patógenos presentes en la muestra y (–) para los que no exhibieron presencia. Los valores de *Varroa* spp. son estimaciones realizadas a partir de la utilización de la técnica propuesta por la OMSA. Los valores de *Nosema* spp. son cuantificaciones estimadas de esporas/ml donde (+) hasta 10.000 esp/ml nivel DESPRECIABLE; (1) e/10.000 - 100.000 esp/ml nivel MUY LEVE; (2) e/ 100.000 - 600.00 esp/ml nivel LEVE; (3) e/600.00 - 800.00

		Virus								Ácaros	Bacterias		Hongos		Linaje materno	
Colmenar	Colmena	A	B	C				I	Varroa spp.	<i>M. plutonius</i>	<i>P. larvae</i>	<i>A. apis</i>	Nosema spp.	Europeo	Africano	
		B	Q	B	D	K	S	A								
		P	C	P	W	B	B	P								
		V	V	V	V	V	V	V								
Heraldo	I	-	+	-	-	-	-	-	0%	-	-	-	(+) 10000	X	-	
	II	-	-	-	-	-	-	-	1,5%	-	-	-	(-)	X	-	
	III	-	-	-	-	-	-	-	0%	-	-	-	(-)	X	-	
	IV	-	-	-	-	-	-	-	0%	-	-	-	(-)	X	-	

esp/ml nivel MEDIO; (4) e/ 800.000 - 1.000.000 esp/ml nivel GRAVE; (5) > de 1.000.000 esp/ml nivel MUY GRAVE. Para la determinación de linajes maternos se indica con (x) el resultado de los estudios genéticos.

Casale	I	-	-	-	-	-	-	-	0%	-	-	-	(-)	X	-
	II	-	-	-	-	-	+	-	2%	-	-	-	(+)	X	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	1%	-	-	-	(-)	X	-
Houtre	I	-	-	-	-	-	+	+	0,3%	-	-	-	(-)	X	-
	II	-	-	-	-	-	-	-	0%	-	-	-	(+)	X	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	1,3%	-	-	-	(-)	X	-

CONCLUSIONES

El SDC es un fenómeno aún poco comprendido (Williams et al., 2010) en torno al cual existe poco consenso sobre sus causas (Stockstad, 2007), y para cuya etiología se han postulado diversos escenarios. Aunque la explicación para el despoblamiento aún esté en debate, pareciera haber consenso en la idea de los patógenos como principal causante del síndrome (Ratnieks y Carreck, 2010).

Para este estudio de caso, siete de las diez colmenas resultaron positivas para diagnóstico de alguna de las enfermedades, tres de las cuales presentaron coinfecciones. Las enfermedades presentes variaron entre las colmenas y las coinfecciones no se presentaron entre los mismos patógenos. Estos resultados sugieren que la presencia de los patógenos estudiados no podría explicar por sí misma el colapso puesto que las enfermedades e interacciones no se repiten entre las colmenas, no hay predominio de algún patógeno entre ellas y, hay colmenas que presentan resultados negativos para todos los patógenos.

Por otra parte, estos colmenares se encontraban a 20-30km de distancia de la ciudad y no estaban relacionados a ningún cultivo extensivo en la zona, lo que hace poco probable la intoxicación o debilitamiento por agroquímicos.

Aunque algunos trabajos respaldan la hipótesis de afecciones por patógenos (CoxFoster et al. 2007; Paxton, 2009; Meana et al. 2017; Richardson, 2017) y agroquímicos utilizados en cultivos cercanos a colmenas, estas hipótesis parecen no ser explicativas para este caso o para aquellos trabajos en los que no se hallan diferencias significativas entre los valores de infecciones y presencias de patógenos entre colmenas que presentaron CCD y aquellas que no presentaron colapso (Dainat et al., 2012).

A raíz de la ausencia de estudios conclusivos a escala global o regional respecto a este fenómeno, han surgido nuevas corrientes tendientes a enfatizar el papel central de la

apicultura en la limitación de la selección natural y a comprometer la salud de las colonias mediante el mantenimiento ajustado y la cría de abejas locales (Neumann y Blacquiére, 2016). Será necesario llevar a cabo una estandarización de este tipo de estudios, la cual permita comparar casos puntuales entre sí a fin de determinar tanto los posibles factores causantes, así como de discriminar entre los distintos tipos de mortalidad de colonias que ocurren mundialmente (Williams, 2010).

BIBLIOGRAFÍA

- Cornejo L., Rossi C. (1975). Enfermedades de las abejas: su profilaxis y prevención. 2a.ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 238p
- Cox-Foster DL et al. (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* 318, 283. DOI: 10.1126/science.1146498.
- Crailsheim K. et al. (2009). The COLOSS puzzle: filling in the gaps. In: Proceedings of the 4th COLOSS Conference, Zagreb, Croacia, 46-47.
- Dainat B. et al. (2012). Colony Collapse disorder in Europe. *Environmental Microbiology Reports* 4(1), 123-125. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x
- Ellis JD. et al. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49:1, 134-136. DOI:10.3896/IBRA.1.49.1.30
- Francis RM. et al. (2014). Effect of genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary – a case study. *Journal of Apicultural Research*, 53:2, 230-232. DOI: 10.3896/IBRA.1.53.2.14
- Garrido-Bailón E. et al. (2013). The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial biotechnology* 6(6), 731-739. Doi: 10.1111/1751-7915.12070
- Gutierrez D. (2009). Honey bee collapse strikes Japan, up to fifty percent of honey bees gone. *Natural News*. www.naturalnews.com/026151_Japan_honeybees_honey.html
- Haddad N. et. al. (2009). Status of colony losses in the Middle East. In: Proceedings of the 41st Apimondia Congress, Mointpellier, Francia. p.36
- Meana A. et. al. (2017). Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Volume 15, Issue 1, e0501. DOI:10.5424/sjar/2017151-9652

Neumann P., Blacquière T. (2016). The Darwin cure for apiculture? Natural selection and managed honeybee health. *Evolutionary Applications*. DOI: 10.1111/eva.12448

Neumann P., Carreck NL. (2010). Honey bee colony losses, *Journal of Apicultural Research*, 49:1, 1-6, DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.01

Oldroyd BP. (2007). What's Killing American Honey Bees?. *PLoS Biol* 5(6): e168. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050168

Paxton RJ. (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)?. *Journal of Apicultural Research*, 49:1, 80-84. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.11

Pinto Alice M. et al. (2003). Identification of Africanized Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Mitochondrial DNA: Validation of a Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *Annals Entomol. Soc.* 679-684.

Plischuk, S. (2013). Protistas entomopatógenos asociados a apoideos (Hymenoptera: Apoidea) polinizadores de la región Pampeana. *Ecosistemas* 22(1), 89-91. DOI.: 10.7818/ECOS.2013.22-1.20

Ratnieks FLW., Carreck NL. (2010). Clarity on Honey Bee Collapse?. *Science* 327, 152. DOI: 10.1126/science.1185563

Richardson LA (2017). A Swarm of Bee Research. *PLoS Biol* 15(1): e2001736. doi:10.1371/journal.pbio.2001736

Sguazza GH. et al. (2013). Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods* 194(1-2). DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.08.003

Simon-Delso N. et al. (2014). Honeybee Colony Disorder in Crop Areas: The role of Pesticides and Viruses. *PLoS ONE* 9(7): e103073.

Soroker V. et al. (2009). Colony losses in Israel: incidence of viral infection and beehive populations. In: *Proceedings of the 41st Apimondia Congress, Mointpellier, Francia.* p.38

Stockstad E. (2007). The Case of the Empty Hives. *Science* 316 (5827), 970-972. DOI: 10.1126/science.316.5827.970

vanEngelsdorp D. et al. (2009). Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* 4(8): e6481. DOI: 10.1371/journal.pone.0006481

van Engelsdorp, D., Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S80–S95.

vanEngelsdorp D. et al. (2017). Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. PLoS ONE 12(7): e0179535. DOI: 10.1371/journal.pone.0179535

Williams GR. et al. (2010). Colony Collapse Disorder in context. Bioessays 32: 845-846. DOI: 10.1002/bies.201000075