



INSTITUTO
NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN
AGROPECUARIA

URUGUAY



IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DEL MAL DEL RÍO EN LAS ABEJAS MELÍFERAS

Febrero, 2020

SERIE
FPTA-INIA

84

IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DEL MAL DEL RÍO EN LAS ABEJAS MELÍFERAS

Proyecto FPTA-322 Identificación de los agentes causales del Mal del Río en las abejas melíferas

Responsable del proyecto: **Ciro Invernizzi**¹

Equipo de investigación: Enrique Nogueira²
Pablo Juri²
Estela Santos¹
Daniela Arredondo³
Belén Branchiccela³
Karina Antúnez³
Carmen Rossini⁴

Institución Ejecutora: Facultad de Ciencias, Universidad de la República (Uruguay)

¹Sección Etología, Facultad de Ciencias. cirobee@gmail.com

²Instituto de Producción Animal, Facultad de Veterinaria.

³Laboratorio de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

⁴Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química.

Título: IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DEL MAL DEL RÍO EN LAS ABEJAS MELÍFERAS

Responsable del proyecto: Ciro Invernizzi

ISBN: 978-9974-38-440-8

Depósito Legal: 373885/2020

Serie: FPTA N° 84

© 2020, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA
Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

D.M.T.V., PhD. José Luis Repetto - Presidente

Ing. Agr., Mag. Mariana Hill - Vicepresidenta



Ing. Agr. Rafael Secco



Ing. Agr. Alberto Bozzo

Ing. Agr. Alejandro Henry



FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

CONTENIDO

Página

IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DEL MAL DEL RÍO EN LAS ABEJAS

MELÍFERAS	9
INTRODUCCIÓN	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Mortandad de embriones y larvas	10
Origen botánico de néctar y polen	12
Rol del néctar y el polen en la mortandad de larvas	12
Abejas colectando las secreciones de <i>Epormenis cestri</i> en <i>Sebastiania schottiana</i>	13
Ingreso de colonias sanas en apiarios afectados por el Mal del Río	14
Experiencias con larvas criadas en laboratorio	14
Análisis estadístico	14
RESULTADOS	15
Origen botánico de néctar y polen	15
Mortandad de embriones y larvas	15
Rol del néctar y el polen en la mortandad de las larvas	17
Abejas colectando las secreciones de <i>Epormenis cestri</i> en <i>Sebastiania schottiana</i>	17
Ingreso de colonias sanas en apiarios afectados por el Mal del Río	18
Experiencias con larvas criadas en laboratorio	18
DISCUSIÓN	18
PRODUCCIÓN DE MIEL DE MIELATOS EN COLONIAS AFECTADAS POR EL MAL DEL RÍO	21
INTRODUCCIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Preparación de colmenas	21
Manejo de las colmenas	22
Cuantificación de la muerte de larvas	22
Análisis fisicoquímico de los mielatos	23
Evaluación de las colonias al final del Mal del Río	23
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
Tamaño de las colonias al inicio del estudio	24
Supervivencia de las larvas	24
Producción de miel de mielatos	25
Análisis fisicoquímico de las mieles de mielatos	25
Tamaño de las colonias al final del estudio	25
DISCUSIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA	27

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Vista aérea de la zona donde se presentó el Mal del Río ubicada entre el río Yi (arriba) y el arroyo Maciel (abajo)	11
Figura 2. Dispositivo utilizado para fotografiar los marcos con huevos y cría	11
Figura 3. Carpas conteniendo núcleos de abejas.	12
Figura 4. Ejemplares de <i>Epormenis cestri</i> en árboles <i>Sebastiania schottiana</i> . Una ninfa (arriba izquierda), cuatro individuos adultos y una ninfa (arriba derecha) y ejemplares sobre una rama donde se observa una hoja con las secreciones (abajo).	13
Figura 5. Desarrollo de una larva criada artificialmente en laboratorio.	14
Figura 6. Curvas de sobrevivencia de larvas originadas de huevos de tres días (H3) y larvas de 1 a 5 días (L1 a L5) tomadas de colonias sanas y colocadas en tres colonias con Mal del Río durante cinco días. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las sobrevivencia de las larvas para el test de Holm Sidak.	15
Figura 7. Fibras encontradas en las muestras de néctar de colonias con Mal del Río (izquierda) y en el agua de lavado de ninfas de <i>Epormenis cestri</i> (derecha).	16
Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia de la cría en colonias emplazadas en carpas y alimentadas con diferentes combinaciones de néctar y polen obtenido de colonias sanas y con Mal del Río. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) para el test de Mann Whitney	16
Figura 9. Proporción de ninfas y adultos de <i>E. cestri</i> en 100 ejemplares observados en los árboles <i>S. schottiana</i>	17
Figura 10. Número total de abejas observadas mientras colectaban secreciones de <i>E. cestri</i> en los árboles <i>S. schottiana</i> . Los registros se realizaron en tres árboles en tres horarios del día (9.00, 12.00 y 16.00 hs). El día 30/12 llovió por lo que no se observaron abejas	17
Figura 11. Curvas de sobrevivencia de larvas criadas en laboratorio y alimentadas con diferentes dietas. Control 1: larvas alimentadas con 1/3 jarabe y 2/3 de jalea real; Control 2: larvas alimentadas con 1/3 jarabe y 2/3 de jalea real; Néctar sano: larvas alimentadas con 1/6 de néctar procedente de colonias sanas y 4/6 de jalea real; Néctar MDR: larvas alimentadas con 1/6 jarabe, 1/6 de néctar procedente de colonias con Mal del Río y 4/6 de jalea real; Secreciones <i>Epormenis cestri</i> : larvas alimentadas con 1/9 jarabe, 1/9 néctar procedente de colonias sanas, 1/9 secreciones de <i>E. cestri</i> y 6/9 de jalea real. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en las sobrevivencia de las larvas para el test de Holm Sidak.	18
Figura 12. Grilla superpuesta a la imagen del panal con celdas que contuvieran huevos y luego pupas que permitía determinar el número de huevos que daban lugar a cría viable	22
Figura 13. Población de las colonias tres días antes de trasladarlas al apiario de Durazno afectado por Mal del Río. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)	23
Figura 14. Área de cría de las colonias tres días antes de trasladarlas al apiario de Durazno afectado por Mal del Río. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)	24
Figura 15. Producción de miel de mielatos de las colonias. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)	24
Figura 16. Población de las colonias al finalizar el período de Mal del Río. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)	25
Tabla 1. Porcentaje de supervivencia larval de las colonias durante el período que colectaban mielatos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)	24
Tabla 2. Indicadores fisicoquímicos de muestras de miel de mielatos obtenidos en diferentes momentos del período que las colonias estuvieron afectadas por el Mal del Río	25

Ciro Invernizzi¹, Enrique Nogueira², Pablo Juri², Estela Santos¹, Daniela Arredondo³, Belén Branchiccela³, Karina Antúnez³, Carmen Rossini⁴

¹Sección Etología, Facultad de Ciencias.
cirobee@gmail.com

²Instituto de Producción Animal, Facultad de Veterinaria.

³Laboratorio de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

⁴Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química.

Identificación de los agentes causales del Mal del Río en las abejas melíferas

Proyecto FPTA 322

Período de Ejecución: 06/2014 - 12/2017

INTRODUCCIÓN

En Uruguay los apicultores denominan Mal del Río a la mortandad masiva de larvas que ocurre al final de primavera y comienzos del verano en colonias que se encuentran próximas a cursos de aguas con abundante vegetación ribereña. El principal síntoma de las colonias afectadas por este problema es la muerte de las larvas al poco tiempo de eclosionar del huevo. Al comienzo se observa cría salteada pero en los cuadros agudos la enfermedad avanza rápidamente hasta la pérdida total de larvas, por lo que en pocos días no se encuentra cría en las colonias, salvo huevos. Estas colonias suelen tener una gran cantidad de reservas de miel y de polen (seguramente por no ser utilizado). A medida que pasa el tiempo las colonias comienzan a despoblarse al no haber reemplazo de las abejas viejas que mueren. Si el cuadro no se revierte pueden ocurrir pérdidas importantes de colonias al final del verano y en otoño (Harriet, 2012; Mendoza et al., 2012).

Pese a que el Mal del Río fue mencionado por primera vez en el año 1951 en un periódico en colonias emplazadas en las riberas del Río Santa Lucía (sur del país), la enfermedad fue prácticamente desconocida por los apicultores en las décadas siguientes. Sin embargo, en los últimos años la ocurrencia del Mal del Río ha sido reportada frecuentemente en colonias que se encuentran próximas a los ríos y arroyos de las cuencas de los ríos Uruguay, Negro y Cuareim en el litoral oeste del país. Las pérdidas económicas que ocasiona esta enfermedad son cuantiosas, tanto por la disminución drástica en la producción de miel como por la alta mortandad de colonias (Mendoza et al., 2012).

El Mal del Río no se presenta todos los años en una zona aunque puede hacerlo durante varios

años seguidos. No se han encontrado medidas prácticas para enfrentar esta enfermedad por lo que los apicultores optan por retirar sus colmenas de las zonas afectadas cuando comienzan a morir las larvas. Algunos apicultores han intentado reducir la pérdida de larvas suministrando jarabe de azúcar, pero no han obtenido resultados satisfactorios.

El agente causal del Mal del Río aún no ha sido identificado aunque diferentes experimentos realizados en la década de 1970 por técnicos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca indican que tiene un origen ambiental (Harriet, 2012). Primeramente se encontró que las colonias con Mal del Río conseguían recuperarse muy lentamente sin necesidad de tratamientos, luego, que cuando se colocaban las abejas adultas de una colonia enferma junto con cría y alimento de una colonia sana la colonia evolucionaba sin problemas, pero que cuando se colocaban las abejas adultas de una colonia sana junto con cría y alimento de una colonia enferma la sobrevivencia de las larvas era muy baja. También se corroboró que un panal con huevos tomado de una colonia con Mal del Río y puesto en una colonia sana daba lugar a larvas sanas (Harriet, 2012). Estos resultados han sido verificados en términos generales por los apicultores que encuentran que al emplazar las colonias afectadas por el Mal del Río en un nuevo sitio la mortandad de larvas comienza a disminuir y las colonias se recuperan.

Las abejas melíferas están expuestas a una gran variedad de sustancias tóxicas en el entorno en el cual obtienen sus recursos, desde las utilizadas por el hombre en la agricultura, hasta las producidas en forma natural por plantas (Johnson, 2015). Hay insectos que son especialistas y han desarrollado mecanismos específicos para contrarrestar los efectos de sustancias tóxicas

presentes en determinados néctares y/o pólenes (Després et al., 2007). Sin embargo, una especie generalista como *Apis mellifera* puede ser afectada por algunas de las sustancias que las plantas utilizan para defenderse de depredadores (Detzel y Wink, 1993; Adler, 2000).

Las sustancias que matan a las larvas en colonias con Mal del Río podrían ingresar a la colmena con los productos que colectan las pecoreadoras: néctar, mielatos, polen, agua y propóleos. El agua y el propóleos difícilmente pueden ser la vía de entrada de sustancias tóxicas. Las abejas colectan agua de lugares tan diferentes como una gota de rocío o en el hueco de un árbol por lo que ésta no aparece como una vía probable de ingreso de un tóxico. El propóleos tampoco parece estar involucrado en la muerte de las larvas debido a su composición, función y la cantidad que ingresa a las colmenas (Simone-Finstrom y Spivak, 2010). Además, si el agua o el propóleos fuesen responsables de la muerte de las larvas su efecto no debería estar restringido a un período relativamente corto del año. Así, las vías factibles de ingreso de las sustancias que matan a las larvas estarían reducidas al néctar, mielatos y polen. Respecto a los mielatos, las abejas normalmente colectan las secreciones dulces de los insectos cuando son abundantes (Tworek, 1994). En Uruguay, el flátido nativo *Epormenis cestri* es frecuentemente observado en algunas especies de árboles en la vegetación ribereña con secreciones muy visibles (Bentancourt et al., 2009).

En la mayoría de las regiones donde se practica apicultura existen reportes de colonias intoxicadas por néctares y pólenes de una gran cantidad de especies botánicas, que pueden afectar a las larvas y/o a las abejas adultas (Barker, 1990; Cintra et al., 2005). El caso más parecido al Mal del Río ocurre en California (EEUU) con el Castaño de Indias (*Aesculus californica*) cuyo néctar y polen es tóxico para las larvas y las abejas adultas. En las colonias que pecorean en *A. californica* se encuentra que los huevos no eclosionan o que las larvas se mueren dentro de los tres días siguientes a la eclosión, siendo rápidamente removidas por las abejas adultas (Barker, 1990; Atkins, 1997). Sin embargo, en las colonias con Mal del Río las abejas adultas no se ven afectadas.

Los objetivos de este estudio fueron determinar la viabilidad de embriones y larvas en colonias afectadas por el Mal del Río e identificar el agente causal del problema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las diferentes actividades de este estudio fueron realizadas en dos temporadas. En enero de 2015 fue reportada de forma tardía la ocurrencia del Mal del Río en varios apiarios ubicados entre el río Yi y el arroyo Maciel en el departamento de Durazno (centro del país) (Figura 1). En esta temporada se tomaron muestras de néctar y polen de colonias con Mal del Río y se realizaron experimentos para analizar en primer lugar, cómo el problema afectaba a embriones y larvas, y en segundo lugar, determinar el rol del néctar y el polen en la muerte de las larvas.

En la temporada siguiente los trabajos se iniciaron inmediatamente después del comienzo de la muerte masiva de larvas (principio de diciembre) en los mismos apiarios utilizados en la temporada anterior. Nuevamente se tomaron muestras de néctar y polen de las colonias. En la vegetación ribereña del río Yi y el arroyo Maciel se observó una gran cantidad de abejas colectando las secreciones de *E. cestri* (Berg, 1879) en los árboles *Sebastiania schottiana* (Müll. Arg.) Müll. Arg. Desde mediados de diciembre hasta el final de febrero se registró la presencia de ninfas y adultos de *E. cestri* y de abejas colectando las secreciones. Al terminar la temporada se realizó un experimento con larvas criadas en laboratorio para determinar si las secreciones de *E. cestri* en los árboles *S. schottiana* eran el agente causal de la muerte de las larvas.

Mortandad de embriones y larvas

Para determinar si el Mal del Río afecta la sobrevivencia de los embriones se sacaron 6 panales con huevos de colonias enfermas que no presentaban larvas ni pupas y se colocaron en dos colonias sanas de un apiario no afectado. Previo a la introducción en las colmenas y a los 9 días los panales fueron fotografiados con una cámara reflex Nikon 5200 con lente de 50 mm empleando un dispositivo especialmente diseñado para sostener la cámara y el cuadro (Figura 2). La calidad de las fotos obtenidas permitía ver

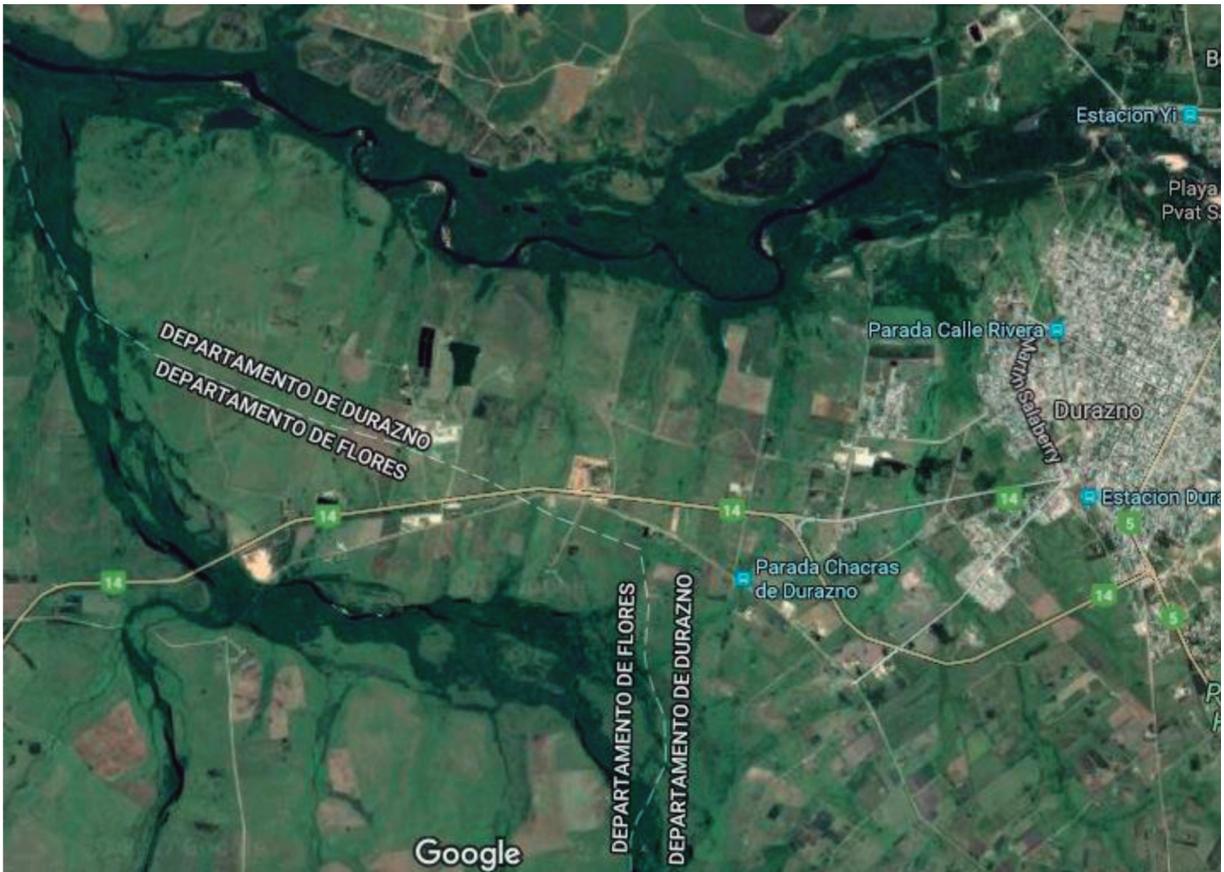


Figura 1. Vista aérea de la zona donde se presentó el Mal del Río ubicada entre el río Yi (arriba) y el arroyo Maciel (abajo).

claramente el contenido de las celdas en una computadora. El porcentaje de sobrevivencia de huevos fue determinado mediante el análisis de las fotografías tomadas en los dos momentos observando 1000 celdas totales en cada una de las colmenas.

Para conocer cómo el Mal del Río afecta la sobrevivencia de las larvas de diferentes edades a tres colonias enfermas que no presentaban ninguna forma de cría salvo huevos se le agregaron dos panales conteniendo huevos y larvas de todas las edades. Previo a introducirlos en las colmenas y



Figura 2. Dispositivo utilizado para fotografiar los marcos con huevos y cría.

durante los siguientes 5 días los panales fueron fotografiados. La mortandad diaria de las larvas provenientes de huevos de tres días y la de las larvas de 1 a 5 días de edad (estimada visualmente) al momento de introducirlos a la colmena, se determinó analizando la secuencia de fotografías.

Origen botánico de néctar y polen

En dos apiarios (Apiarios 1 y 2) se colectaron muestras de néctar y polen (extraído de la superficie de las celdas) de colonias con Mal del Río que presentaban una pérdida total de larvas. Las muestras del Apiario 1 (9 colonias) fueron tomadas en enero de 2015 cuando las colonias llevaban enfermas no menos de 20 días y las del Apiario 2 (9 colonias) en diciembre de 2016 a menos de 10 días de haber comenzado la pérdida de larvas.

El origen botánico de las muestras de néctar y de polen se determinó observando 600 granos de polen al microscopio (400X) e identificándolos por comparación con una colección de referencia (Louveax et al., 1978). En las muestras de néctar también se identificaron los grupos de hongos y conidios presentes utilizando imágenes de referencia (Chomnunti et al., 2014; Vargas et al., 2015).

Para determinar si las secreciones de *E. cestri* dejaban alguna señal que permitiera identificarlas

en las muestras de néctar se observó microscópicamente el material blanco algodonoso que recubre las ninfas. Para ello se lavaron 12 ninfas de *E. cestri* con agua destilada en un tubo eppendorf y una gota del líquido se observó a 400X.

Rol del néctar y el polen en la mortandad de las larvas

En el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - La Estanzuela (departamento de Colonia) se instalaron 3 carpas de 5 x 5 m y se colocaron en cada una 4 núcleos de 6000-8000 abejas sin reservas de polen y néctar (un panal con cría, dos panales vacíos y un alimentador interno) (Figura 3). Los núcleos fueron alimentados *at libitum* con polen (tortas) y néctar (utilizando un alimentador interno) extraído de colmenas sanas y afectadas por Mal del Río (del Apiario 1) según las siguientes combinaciones: polen y néctar de colonias sanas, polen de colonias enfermas y néctar de colonias sanas, polen de colonias sanas y néctar de colonias enfermas, y polen y néctar de colonias enfermas. Se asignaron tres núcleos a cada combinación. A los tres días de instalados se retiró el panal con cría y se colocó un panal con huevos procedente de otra colonia (o del mismo núcleo si la reina había puesto huevos en los panales vacíos). A los 9 días se extrajo el



Figura 3. Carpas conteniendo núcleos de abejas.

panal conteniendo pupas. El porcentaje de cría viable se determinó mediante análisis de imágenes fotográficas de los panales tomados antes de introducirlos en los nucerlos y al retirarlos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Abejas colectando las secreciones de *Epormenis cestri* en *Sebastiania schottiana*

El 10 de diciembre de 2016 se verificó la ausencia total de larvas en 9 colonias en el Apiario 2. Estas colonias habían sido inspeccionadas 10 días antes sin detectar pérdidas de larvas. La

presencia de larvas en celdas recién operculadas indicaba que la mortandad de larvas había comenzado repentinamente en torno al 4 de diciembre.

Desde el 13 de diciembre hasta el 5 de enero se recorrió 6 veces un tramo de la vegetación ribereña del arroyo Maciel contando en 6 árboles marcados de *S. schottiana* 100 ejemplares de *E. cestri* por árbol discriminando entre ninfas y adultos (Figura 4). En los mismos árboles se registró 11 veces desde el 23 de diciembre hasta el 18 de febrero la presencia de abejas en tres horarios del día (9.00, 12.00 y 16.00 hs). Para ello se recorrían los árboles caminando a paso constante (20 segundos/árbol aproximadamente) contando las abejas.



Figura 4. Ejemplares de *Epormenis cestri* en árboles *Sebastiania schottiana*. Una ninfa (arriba izquierda), cuatro individuos adultos y una ninfa (arriba derecha) y ejemplares sobre una rama donde se observa una hoja con las secreciones (abajo).

Por último se tomaron muestras de secreciones de *E. cestri* presentes en las hojas de *S. schottiana* y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización en las experiencias de cría de larvas en el laboratorio.

Ingreso de colonias sanas en apiarios afectados por el Mal del Río

Para determinar el momento en que ya no ingresaba el alimento con el agente causal de la muerte de las larvas se llevaron al Apiario 1 colonias sanas los días 30 de diciembre (10 colonias), 18 de enero (10 colonias), 30 de enero (4 colonias) y 16 de febrero (6 colonias). El 18 de febrero también se llevaron 4 colonias a un apiario próximo al Apiario 1 fuertemente afectado por el Mal del Río cuyas colonias habían sido retiradas dejando solo dos. Esta medida se tomó ante la posibilidad de que en el Apiario 1 las colonias nuevas contrajeran Mal del Río por robar miel de colonias enfermas y muy despobladas del apiario.

Experiencias con larvas criadas en laboratorio

Las larvas de 1 día de edad provenientes de una colonia sana fueron extraídas de las celdas y puestas en cúpulas de plástico. Las larvas continuaron su desarrollo en el laboratorio en las condiciones descritas por Evans (2004) (Figura 5). Se utilizaron 5 grupos de 24 larvas cada uno que se alimentaron con diferentes dietas artificiales. El grupo 1 fue alimentado con 1/6 jarabe, 1/6 de néctar procedente de colonias sanas y 4/6 de jalea real; el grupo 2 fue alimentado con 1/6 jarabe, 1/6 de néctar procedente de colonias con Mal del Río y 4/6 de jalea real; el grupo 3 fue alimentado con 1/9 jarabe, 1/9 néctar procedente de colonias sanas, 1/9 secreciones de *E. cestri* y 6/9 de jalea real; el grupo 4 (control 1) fue alimen-

tado solo con 1/3 jarabe y 2/3 de jalea real; el grupo 5 (control 2) fue alimentado solo con 1/3 jarabe y 2/3 de jalea real. Las larvas del grupo 4 (control 1) estaban en la misma placa que las larvas del grupo 1 mientras que las larvas del grupo 5 (control 2) estaban en la misma placa que las larvas de los grupos 2 and 3. Estos dos grupos control permitían descartar que la mortandad de larvas se debiera a sustancias volátiles. Después de las primeras 48 horas se sacaron las larvas de la incubadora y se examinaron diariamente durante cinco días. Las larvas sobrevivientes se transfirieron a nuevos platos llenos de alimentos artificiales frescos de cada tratamiento. La experiencia se realizó por triplicado.

Análisis estadísticos

Las curvas de sobrevivencia de las larvas de diferentes edades sacadas de colonias sanas y colocadas en colonias con Mal del Río fueron construidas con el método de Kaplan-Meier y las diferencias estadísticas entre las curvas de sobrevivencia se determinaron con el test Log-Rank seguido de Holm-Sidak.

La mortandad de larvas en los núcleos confinados en carpas alimentados con diferentes combinaciones de néctar y polen provenientes de colonias sanas y con Mal del Río se analizó empleando el test de Kruskal-Wallis y posteriormente se utilizó el test de Mann-Whitney para comparar las muestras pareadas.

La presencia de abejas colectando las secreciones de *E. cestri* en los árboles *S. schottiana* en diferentes horarios se analizó con el test de Chi cuadrado con los datos de los dos primeros registros.

Para evaluar la toxicidad sobre las larvas del néctar proveniente de colonias con Mal del Río y las secreciones de *E. cestri*, el análisis de sobre-

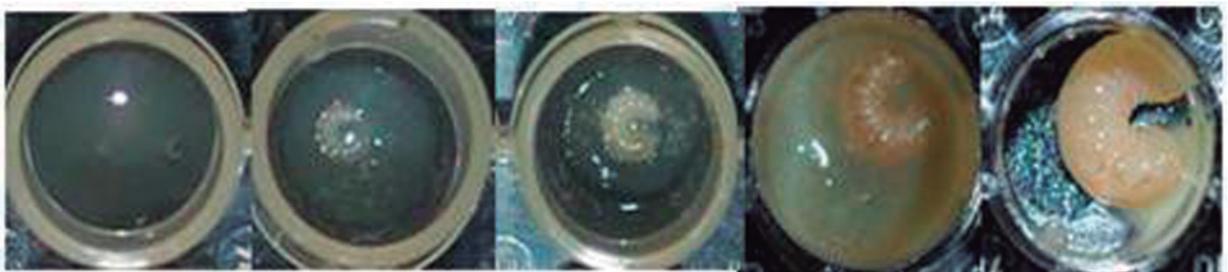


Figura 5. Desarrollo de una larva criada artificialmente en laboratorio.

vivencia de las larvas de diferentes grupos fueron analizadas utilizando el método de Kaplan-Meier y las diferencias estadísticas entre las curvas de supervivencia se determinaron con el test Log-Rank seguido de Holm-Sidak.

Valores de P debajo de 0,05 fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

Mortandad de embriones y larvas

De los huevos provenientes de colonias con Mal del Río y colocados en dos colonias sanas solo 6,2% y 4,4% de los mismos no llegaron a la etapa de prepupa. Este resultado descarta de forma contundente que la enfermedad afecte el desarrollo embrionario.

El análisis de las fotografías tomadas durante 5 días a panales conteniendo huevos y larvas de todas las edades en tres colonias con Mal del Río permitió determinar cuáles son las más afectadas por esta enfermedad. El número de celdas observadas en las tres colonias fue de 456, 709 y 623 estando presente en cada colmena huevos y larvas de todos los estadios. En las tres colonias se encontraron diferencias significativas en las curvas de supervivencia de las larvas de los diferentes grupos de edades (Log-Rank test, Colonia 1: 160,12; $P < 0,001$; Colonia 2: 708,28; $P < 0,001$; Colonias 3: 257,14; $P < 0,001$) (Figura 6). Considerando las tres colonias conjuntamente las larvas surgidas a partir de los huevos fueron las que presentaron globalmente mayor mortandad (64,6%), especialmente en la colonia N°2. Le siguen en orden de mortandad las larvas de 2 días (28,5%) y de 1 día de edad (21,79%), aunque la mortandad de las larvas de 2 días se explica por la mortandad anormalmente elevada de las larvas en la colonia N°1 (60%). Los grupos de larvas de 3, 4 y 5 días prácticamente no sufrieron pérdidas (Figura 6).

Origen botánico de néctar y polen

El análisis palinológico de las muestras de néctar y polen obtenidas de los dos apiarios mostró que las abejas colectaron ambos alimentos de especies botánicas comúnmente visitadas por las abejas.

Los pólenes comunes a todas las muestras de néctar del Apiario 1 correspondieron en orden de frecuencia a *Lotus* spp., *Trifolium repens*, *Medicago sativa* y *Glycine max*, mientras que en el Apiario 2 correspondieron a Mirtáceas nativas, *Echium plantagineum*, *Eucalyptus* spp. y *Trifolium repens*. Estos pólenes representaron en

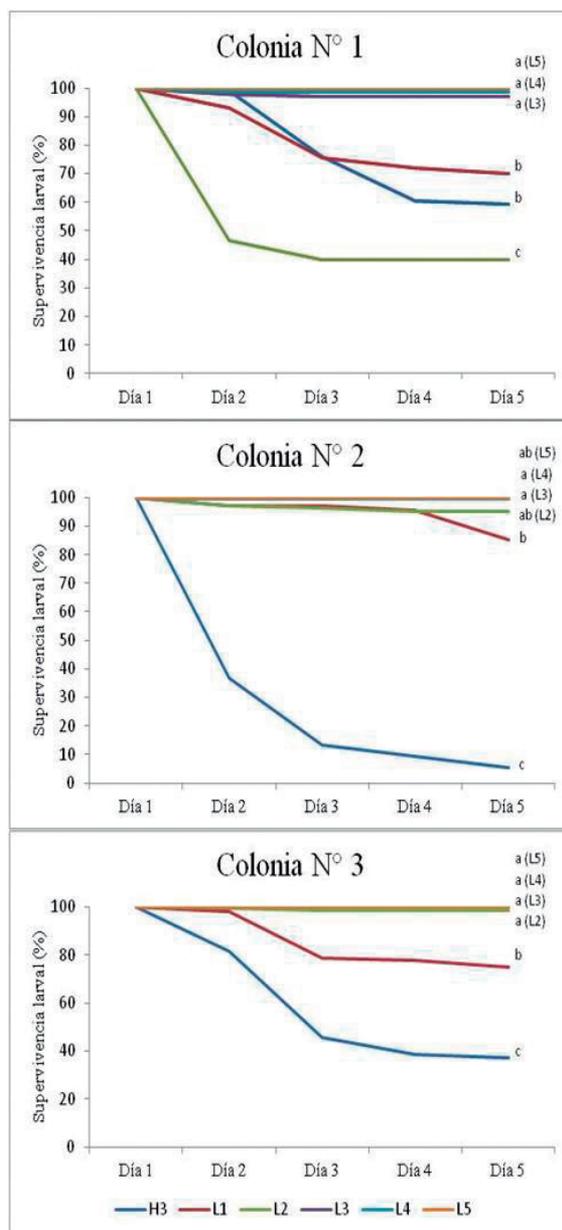


Figura 6. Curvas de supervivencia de larvas originadas de huevos de tres días (H3) y larvas de 1 a 5 días (L1 a L5) tomadas de colonias sanas y colocadas en tres colonias con Mal del Río durante cinco días. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en la supervivencia de las larvas para el test de Holm Sidak.

promedio más del 85% de los tipos polínicos encontrados en las muestras de cada apiario. Los pólenes procedentes de otras especies botánicas se encontraban en muy baja frecuencia y no estaban presentes en todas las muestras.

En todas las muestras de néctar de ambos apiarios se encontró poca cantidad de polen y abundantes elementos de mielato. Las esporas de hongos y conidios presentes correspondieron en su mayoría a los tipos *Gonadobotrium*, *Trichomerium foliicola*, *Tetracladium*, *Bipolaris*, *Drechslera*, *Alternaria* y *Cladosporium*. Además, en todas las muestras de néctar del Apiario 2 se encontraron hongos del tipo *Spegazzinia*, *Gonoderma* y *Metacapnodium spongiosum*.

En el análisis microscópico de las muestras de néctar también se identificaron unas fibras no rígidas poco comunes que resultaron idénticas a las observadas en el agua con la que se lavaron

las ninfas de *E. cestri* (Figura 7). Estas fibras tienen su origen en el material algodonoso que recubre las ninfas.

Los pólenes comunes a todas las muestras de polen del Apiario 1 correspondieron en orden de frecuencia a *Lotus spp.*, *Medicago sativa* y *Trifolium repens*. Estos pólenes representaron en promedio a más del 70% de los tipos polínicos encontrados en las muestras. Otras especies cuyos pólenes aparecieron en baja frecuencia (<2%) en todas las muestras de polen del Apiario 1 son *Cynara cardunculus*, *Baccharis trímera*, *Ludwigia peploides* (planta acuática) y una especie sin identificar. Los pólenes comunes a todas las muestras de polen del Apiario 2 correspondieron en orden de frecuencia a *Echium plantagineum*, Mirtaceas nativas, *Eucalyptus spp.* y *Trifolium repens*. Estos pólenes representaron en promedio a más del 85% de los tipos polínicos encontrados en el Apiario 2.

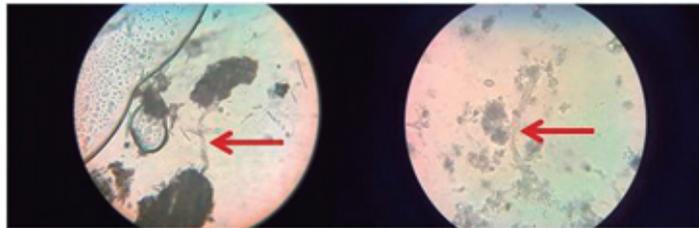


Figura 7. Fibras encontradas en las muestras de néctar de colonias con Mal del Río (izquierda) y en el agua de lavado de ninfas de *Epormenis cestri* (derecha).

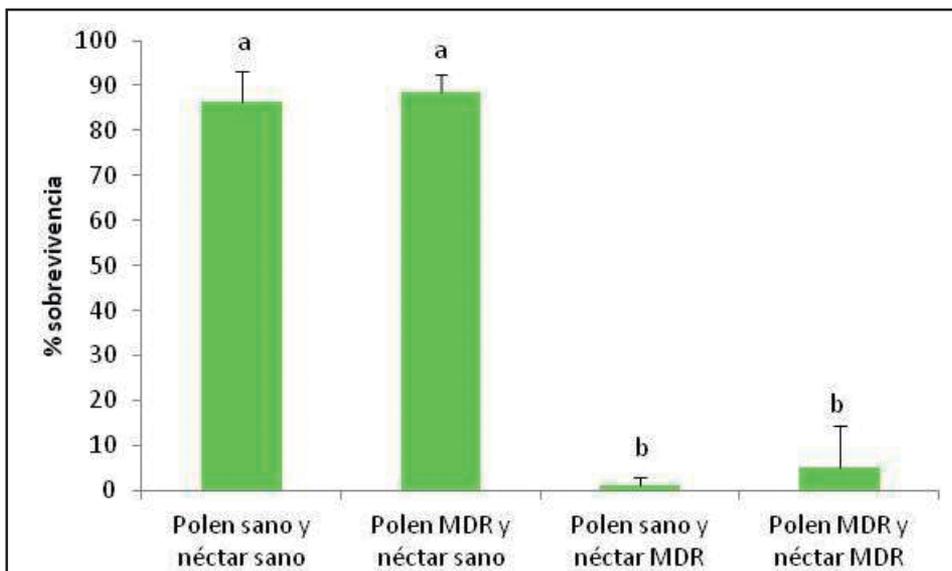


Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia de la cría en colonias emplazadas en carpas y alimentadas con diferentes combinaciones de néctar y polen obtenido de colonias sanas y con Mal del Río. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) para el test de Mann Whitney.

Rol del néctar y el polen en la mortandad de las larvas

La mortandad de larvas en los cuatro grupos de colonias formados según recibieran néctar y polen obtenidos de colonias sanas y con Mal del Río fue diferente. Las colonias de los dos grupos que recibieron néctar de colonias con Mal del Río sufrieron la pérdida casi total de larvas, mientras que en las restantes colonias la pérdida de larvas no superó el 15% (H: 8,33; P = 0,04) (Figura 8).

Abejas colectando las secreciones de *Epormenis cestri* en *Sebastiania schottiana*

La proporción de ninfas y adultos de *E. cestri* en *S. schottiana* fue registrada 6 veces entre el 13 de diciembre y el 5 de enero. En el primer releva-

miento solo se encontraron ninfas pero estas fueron disminuyendo a medida que mudaban incrementando el número de adultos. En el último registro solo se detectaron adultos (Figura 9). El número total de *E. cestri* fue disminuyendo gradualmente desde el último registro y el 12 de febrero ya casi no se observaron ejemplares ni sus secreciones sobre las hojas de *S. Schottiana*.

La presencia de abejas se registró 11 veces desde el 23 de diciembre hasta el 18 de febrero a las 9.00, 12.00 y 16.00 hs. El número de abejas disminuyó 36% entre el primer registro y el segundo realizado cuatro días después, y luego cayó abruptamente a partir de enero (el 30 de diciembre no se observaron abejas debido a la lluvia). Para mediados de febrero no se registraron abejas sobre *S. schottiana* (Figura 10).

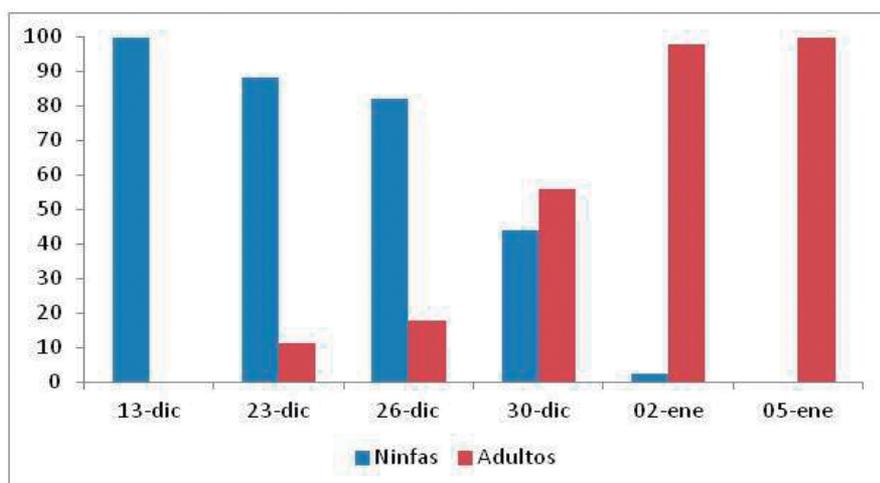


Figura 9. Proporción de ninfas y adultos de *E. cestri* en 100 ejemplares observados en los árboles *S. schottiana*.

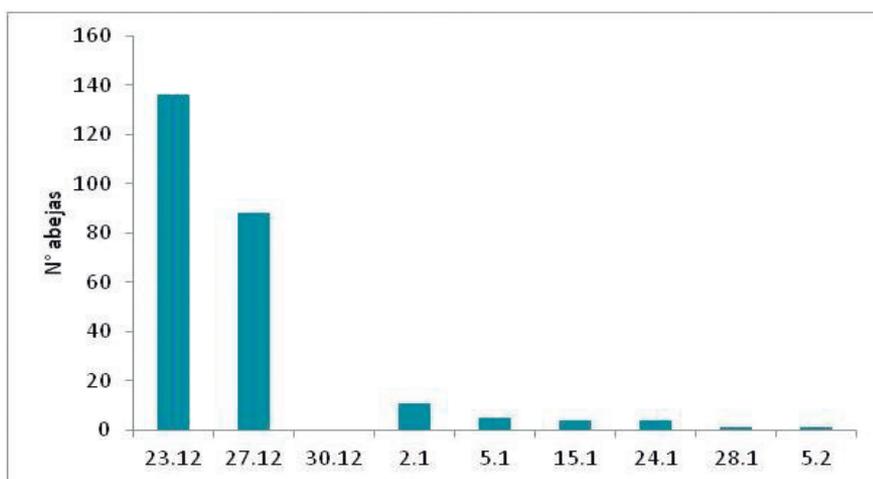


Figura 10. Número total de abejas observadas mientras colectaban secreciones de *E. cestri* en los árboles *S. schottiana*. Los registros se realizaron en tres árboles en tres horarios del día (9.00, 12.00 y 16.00 hs). El día 30/12 llovió por lo que no se observaron abejas.

Utilizando los dos primeros registros no se encontró diferencias en el número de abejas entre los tres momentos del día en que fueron observadas (23 de diciembre: $\text{Chi}^2 = 1,44$; $P = 0,49$; 27 de diciembre: $\text{Chi}^2 = 1,12$; $P = 0,57$).

Ingreso de colonias sanas en apiarios afectados por el Mal del Río

En las colonias sanas trasladadas al Apiario 1 los días 30 de diciembre (10 colonias), 18 de enero (10 colonias), 30 de enero (4 colonias) se verificó la pérdida total de larvas a menos de 10 días de instaladas. En cambio, 2 de las 6 colonias trasladadas al apiario el 16 de febrero no contrajeron Mal del Río. Las 4 colonias trasladadas el 18 de febrero a un apiario cercano al Apiario 1 (donde se habían retirado la mayoría de las colonias con Mal del Río) no tuvieron pérdida de larvas.

Experiencias con larvas criadas en laboratorio

La mortandad de las larvas a lo largo de 7 días varió según la alimentación recibida (Log-Rank test: 52,92; $P < 0,001$). Las larvas que fueron

alimentadas con néctar de colonias sanas (Grupo 1) o con jarabe (Grupos 4 y 5) presentaron al final del período una mortandad de 40%, 37% y 33%, respectivamente. En cambio las larvas que recibieron néctar de colonias con Mal del Río (Grupo 2) o secreciones de *E. cestri* (Grupo 3) presentaron al final del período una mortandad de 100% y 96%, respectivamente (Figura 11).

DISCUSIÓN

El Mal del Río es una enfermedad de las abejas melíferas que pese a ser reportada por primera vez hace más de 60 años y tener efectos devastadores en las zonas donde se presenta, no había sido completamente caracterizada ni identificado el agente causal. Algunas experiencias puntuales y observaciones de apicultores indicaban que se trataba de un problema de origen ambiental (Harriet, 2012; Mendoza et al., 2012). El conjunto de análisis y experimentos realizados en este estudio permitieron describir mejor el cuadro clínico del Mal del Río e identificar el agente causal.

La introducción de panales con huevos de colonias con Mal del Río en colonias sanas

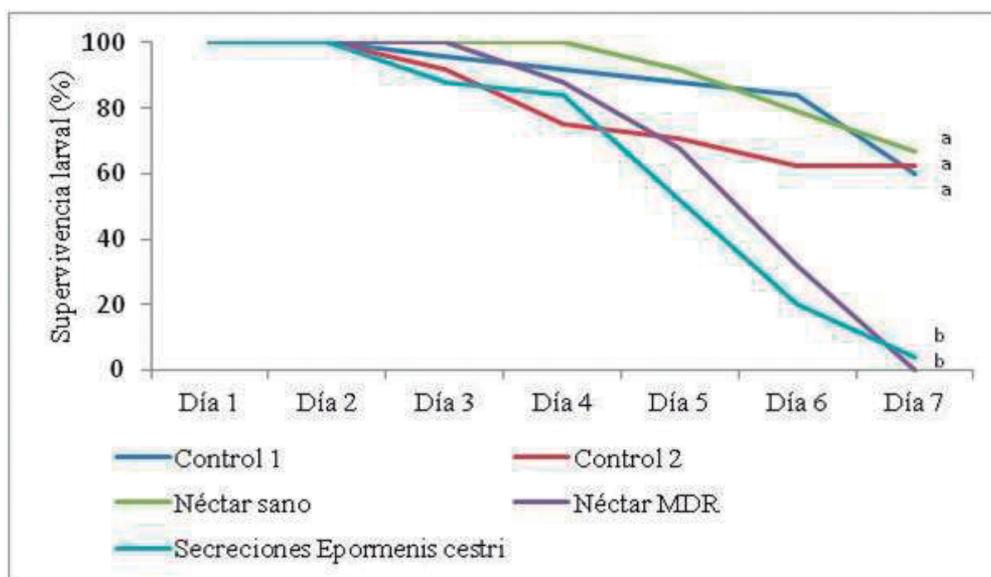


Figura 11. Curvas de supervivencia de larvas criadas en laboratorio y alimentadas con diferentes dietas. Control 1: larvas alimentadas con 1/3 jarabe y 2/3 de jalea real; Control 2: larvas alimentadas con 1/3 jarabe y 2/3 de jalea real; Néctar sano: larvas alimentadas con 1/6 de néctar procedente de colonias sanas y 4/6 de jalea real; Néctar MDR: larvas alimentadas con 1/6 jarabe, 1/6 de néctar procedente de colonias con Mal del Río y 4/6 de jalea real; Secreciones *Epormenis cestri*: larvas alimentadas con 1/9 jarabe, 1/9 néctar procedente de colonias sanas, 1/9 secreciones de *E. cestri* y 6/9 de jalea real. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las sobrevivencias de las larvas para el test de Holm Sidak.

mostró que el desarrollo embrionario de las abejas no se ve afectado. En torno al 95% de los huevos dieron lugar a prepupas, un valor que se encuentra dentro de lo normal para colonias sanas (Garófalo, 1977). Este resultado concuerda con lo hallado durante las primeras descripciones de la enfermedad (Harriet, 2012).

El seguimiento diario de larvas de todas las edades provenientes de colonias sanas colocadas en colonias con Mal del Río mostró que las larvas de menos de 24 horas (provenientes de los huevos de 3 días presentes en los panales) eran las más afectadas con un 65% de pérdidas, seguida por las larvas de 1 y 2 días con menos de la mitad de pérdidas. La muerte de las larvas más jóvenes ya había sido observada anteriormente en colonias enfermas (Harriet, 2012; Mendoza et al., 2012). La razón por la que las pérdidas de larvas de 1-2 días no fue mayor (en las colonias residente no habían larvas sobrevivientes) puede deberse a que las larvas ya habían sido alimentadas por las nodrizas de su colonia sana al momento de introducirlas en las colonias con Mal del Río. Esto no ocurrió con las larvas surgidas de los huevos, que fueron alimentadas exclusivamente por las nodrizas de las colonias enfermas. De todos modos, la pérdida de estas larvas no fue total como cabría esperar. Las larvas de 3, 4 y 5 días prácticamente no sufrieron pérdidas indicando que a esa edad las larvas no se ven afectadas por el agente causal del Mal del Río.

El análisis palinológico de las muestras de néctar y polen mostró que las abejas colectaron ambos alimentos de especies botánicas ampliamente utilizadas por las abejas en Uruguay (Danners y Tellería, 1998; Santos et al., 2009). Este resultado indicaría que la muerte de las larvas no puede ser atribuida al néctar o polen proveniente de alguna especie botánica. Sin embargo, en el néctar se encontró poca cantidad de polen y una gran cantidad de hongos y conidios de diferentes grupos, lo que indicaría la presencia de mielatos (Chomnunti et al., 2014; Vargas et al. 2015).

Al comienzo de este estudio, el polen fue considerado como una causa probable de la muerte de las larvas porque en algunas plantas posee sustancias tóxicas (Després et al., 2007). También se ha reportado muerte de larvas causada por polen de *Aesculus californica* en EEUU y *Stryphondendron polyphyllum* en Brasil (Carvalho y Message, 2002). Sin embargo, la experiencia

con núcleos de abejas confinados en carpas resultó determinante para identificar al néctar (con mielatos) como el único alimento que causa mortandad de larvas, descartando de plano al polen.

La observación de gran cantidad de abejas libando las abundantes secreciones de *E. cestri* en las hojas de *S. schottiana* explicarían los abundantes elementos asociados a mielatos encontrados en el néctar. El hecho de que se observaran fibras en el agua con la que se lavaron las ninfas de los flátidos iguales a las encontradas en el néctar confirma el origen del mielato colectado por las colonias con Mal del Río. De este modo, las secreciones de *E. cestri* fueron consideradas como posible causante de la muerte de las larvas.

Las ninfas de *E. cestri* fueron encontradas después de verificar la pérdida abrupta de larvas en las colonias del Apiario 2 y fueron mudando a adultos en los siguientes 20 días a partir de los cuales la población comienza a disminuir. Tanto las ninfas como los adultos se encontraron concentrados en las ramas de *S. schottiana* secretando abundante cantidad de líquidos azucarados que caen sobre las hojas. El número de abejas colectando las secreciones decayó rápidamente pese a las abundantes secreciones visibles en las hojas de *S. schottiana*, hallando muy pocas abejas 30 días después de que comenzara la muerte de las larvas en la zona. Este descenso podría deberse a dos causas. En primer lugar las colonias pudieron reemplazar las abejas muertas durante algo más de 20 días luego del inicio de la muerte de las larvas, a partir de los cuales comenzaron a despoblarse disminuyendo el número de pecoreadoras. Por otro lado, la falta de cría pudo reducir el estímulo de las abejas para colectar alimento (Sagili et al., 2015; Dreller et al., 1999; Amdam et al., 2009). Esta disminución en la actividad de pecoreo fue claramente observada cuando se comparaba la actividad en las piqueras de las colonias enfermas (incluyendo las colonias bien pobladas) con las colonias que ingresaban al apiario en diferentes momentos. La disminución de abejas colectando las secreciones de *E. cestri* a partir de enero difícilmente pueda deberse a la oferta de otros recursos, ya que las colonias que se instalaron en el apiario en tres momentos diferentes durante enero contrajeron rápidamente el Mal del Río indicando que colectaban los mielatos.

Las colonias introducidas al apiario en cuatro oportunidades entre el 30 de diciembre y el 16 de febrero contrajeron Mal del Río en pocos días, excepto las del último grupo donde dos de las seis colonias no presentaban evidencia de larvas muertas. Es muy probable que en las otras cuatro colonias la muerte de las larvas se deba al robo de miel de las colonias vecinas debilitadas o muertas. Prueba de ello es que cuando dos días después se llevaron cuatro colonias a un apiario cercano donde había solo una colonia sana y otra con Mal del Río, ninguna presentó pérdida de larvas. Teniendo en cuenta que el 12 de febrero quedaban muy pocos ejemplares de *E. cestri* y no se veían secreciones, estos resultados implican fuertemente a las secreciones en la mortandad de las larvas.

Las experiencias realizadas con larvas criadas en el laboratorio mostraron que prácticamente todas las larvas cuya alimentación incluía néctar proveniente de colonias con Mal del Río o secreciones de *E. cestri* (solo 11% del total de alimento recibido) murieron a lo largo de 7 días, mientras que menos del 40% de las larvas alimentadas con fructuosa o néctar proveniente de colonias sanas murieron. Esta experiencia, si bien indica que las secreciones de *E. cestri* son responsables de la muerte diferencial de las larvas, no reproduce las mismas condiciones en que mueren las larvas en una colonia afectada por el Mal del Río. En el laboratorio la mayoría de las larvas se mueren a partir del quinto día, mientras que en una colonia enferma las larvas mueren casi todas dentro de las primeras 24 horas (es extremadamente difícil encontrar una larva en colonias muy enfermas). Esta diferencia notoria puede explicarse si la cantidad de secreciones de *E. cestri* suministrada a las larvas directamente o como parte del néctar estaba en menor proporción que la que reciben las larvas en la colonia. Hay que tener en cuenta que las larvas en las primeras horas reciben una alimentación en forma masal (en exceso) y recién se hace progresiva (solo cuando la larva necesita alimento) a partir del segundo día (Collison, 2016). Estas diferencias en la alimentación de las larvas podría explicar por qué en las colonias las larvas mueren en las primeras horas. Otra posibilidad es que en las colonias enfermas las nodrizas detecten un problema en el desarrollo de las larvas en las primeras horas de vida y las eliminen. En este sentido, durante la cría en laboratorio se observó que las larvas alimentadas con néctar provenientes de colonias con Mal del

Río o secreciones de *E. cestri* crecían más lentamente y presentaban menor movilidad que las larvas de los otros grupos

Las abejas melíferas son capaces de evitar la colecta de néctares de las plantas que contienen sustancias tóxicas (Despres et al., 2007). Esta capacidad se debe a un proceso de aprendizaje en el cual las abejas asocian un néctar particular con su efecto tóxico (Wright et al., 2010). Sin embargo, las abejas no evitan colectar las secreciones tóxicas de *E. cestri* en los sarandíes colorados. Una posible explicación es que las sustancias tóxicas no afectan a las abejas adultas, por lo que no establecen una asociación. Es muy improbable que las abejas, que obtienen alimento de diferentes plantas, sean capaces de asociar una fuente de carbohidratos con la intoxicación de las larvas. Otra posibilidad es que las abejas no puedan detectar las sustancias tóxicas. Las especies de abejas generalistas pueden tener una limitada capacidad para la detección de toxinas en el néctar porque tienen pocos receptores gustativos que puedan detectar estos compuestos (Robertson y Wanner, 2006). Los árboles del género *Sebastiania* tienen algunas sustancias que pueden ser tóxicas para varios organismos, entre los que la xantoxilina y sus derivados tienen actividad antiespasmódica contra la contracción inducida por la acetilcolina (Calixto et al., 1990; Filho et al., 1995).

En suma, hay tres razones que nos llevan a concluir que las secreciones de *E. cestri* en los árboles *S. schottiana* son las responsables de la muerte de las larvas: la verificación de que las abejas colectan las secreciones, que el período en el que se observa mortandad masiva de larvas coincide con la presencia de *E. cestri* y sus secreciones, y la muerte anormal de larvas criadas en laboratorio cuando reciben néctar de colonias con Mal del Río o las secreciones del flátido. Las abejas frecuentemente colectan las secreciones azucaradas de insectos sin sufrir ningún daño (Eickworth y Ginsberg, 1980). Este es el primer caso de mielatos que causan mortandad masiva de larvas en las abejas melíferas.

Futuros estudios deberán enfocarse en identificar las sustancias que contiene la savia de los árboles, o que incorpora *E. cestri* a sus secreciones, y llegan a las larvas con el alimento causándole la muerte, así como encontrar manejos de las colonias que disminuyan el impacto negativo del Mal del Río.

Ciro Invernizzi¹, Enrique Nogueira²,
Pablo Juri², Estela Santos¹

¹Sección Etología, Facultad de Ciencias.
cirobee@gmail.com

²Instituto de Producción Animal, Facultad de Veterinaria.

Producción de miel de mielatos en colonias afectadas por el Mal del Río

INTRODUCCIÓN

En el estudio anterior se encontraron suficientes evidencias para afirmar que la muerte de las larvas en la enfermedad de Mal del Río son causadas por las secreciones del flátido *Epormenis cestri* cuando se encuentra en los árboles Sarandí Colorado (*Sebastiania schottiana*). De este modo, las abejas colectan lo que se denominan mielatos, soluciones azucaradas de origen extrafloral especialmente provenientes de secreciones de insectos (Douglas, 2009).

Durante la inspección de colonias afectadas por Mal del Río es normal apreciar un abundante ingreso de mielatos, pese a que las colonias están sin cría. A partir de estas observaciones se planteó si era posible producir miel de mielatos sin comprometer la sobrevivencia de las colonias. De conseguir una pauta de manejo de las colmenas ajustada a este fin, los apicultores encontrarían en las zonas donde aparece Mal del Río una oportunidad productiva, cuando históricamente se les recomendaba retirar los apiarios afectados. Además, contarían con la posibilidad de obtener un producto diferenciado de mayor valor, ya que la miel de mielatos suele tener mejor precio que la miel en los mercados compradores, especialmente en Europa (Katia et al., 2019; Seijo et al., 2019).

Para establecer los manejos productivos de las colmenas en zonas afectadas por el Mal del Río hay que tener en cuenta que la mortandad masiva de las larvas lleva irremediablemente al despoblamiento de las colonias. Para evitar el rápido despoblamiento se deben encontrar manejos que permitan reducir la mortandad de las larvas y/o aportar abejas a las colonias. Así, un manejo posible es el de cosechar cada pocos días todos los mielatos colectados esperando que la disminución de las sustancias

tóxicas dentro de las colmenas permita una mayor sobrevivencia de la cría. Ante la posibilidad de que esta medida no sea suficiente se puede considerar también hacer un aporte de jarabe de azúcar en muy baja concentración para diluir el efecto tóxico de los mielatos que ingresan a la colmena. En una experiencia previa se encontró que el aporte de jarabe de azúcar al inicio del Mal del Río permitía sobrevivir hasta un 64% de las larvas, aunque el efecto de agregar jarabe disminuye a medida que avanza el período en que están disponibles las secreciones de *E. cestri* (Ciro Invernizzi, datos no publicados). Por último, una manera de evitar el impacto productivo del despoblamiento de las colonias es trasladando colmenas preparadas con abundante cría e introduciendo abejas regularmente durante los aproximadamente 40-60 días que dura el ingreso de los mielatos, siendo la forma más accesible el agregado de cuadros con cría.

El objetivo de este trabajo es evaluar los manejos que permitan producir miel de mielatos sin afectar la viabilidad de las colonias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las colmenas

El día 17 de diciembre en la localidad de Sarandí Grande, departamento de Florida, se evaluó la población de abejas y el área de cría de 48 colonias con reinas nuevas que se encontraban en cámara de cría con 9 cuadros. La población se estimó como número de cuadros cubiertos por abejas y el área de cría se estimó visualmente como porcentaje del panal ocupado por cría (Delaplane et al., 2013). La cría de todas las colonias fue nivelada en 7 cuadros

casi completos y en los extremos se colocaron cuadros con láminas de cera. Al finalizar la evaluación se les agregó una media alza con panales vacíos. Dos días después (19 de diciembre) las colonias fueron trasladadas a un apiario ubicado entre el río Yi y el arroyo Maciel en el departamento de Durazno (Figura 1). En este apiario, con antecedentes de Mal del Río en los dos años previos, había colonias centinelas que mostraban pérdidas totales de larvas desde el 2 de diciembre.

Manejos de las colmenas

Las colonias fueron divididas en cinco grupos de acuerdo a los siguientes manejos: Grupo 1: cosecha de mielatos, agregado de cría y aporte de jarabe de azúcar (10 colonias); Grupo 2: cosechas de mielatos, y aporte de jarabe de azúcar (10 colonias); Grupo 3: cosecha de mielatos y agregado de cría (10 colonias); Grupo 4: cosecha de mielatos (10 colonias); Grupo 5: cosecha de mielatos al finalizar el ingreso de los mismos (control) (8 colonias).

El 23 de diciembre se suministró jarabe de azúcar a las colmenas asignadas para este manejo. La cosecha de mielatos se realizó en cinco oportunidades cada 10-13 días aproximadamente (2, 12 y 23 de enero, y 2 y 15 de febrero). En cada cosecha se retiraban todos los panales que contuvieran mielatos, independientemente del volumen, marcando en cada cuadro el número de la colmena. Luego se pesaban los cuadros de cada colmena

antes y después de la extracción de los mielatos. Después de la primera cosecha se retiraron las medias alzas y solo se siguieron cosechando cuadros de la cámara de cría. El 15 de febrero se realizó la única cosecha a las colmenas del grupo 5. El agregado de cría (un cuadro ocupado con al menos 80% de cría operculada) y el aporte de jarabe de azúcar (2 litros de jarabe de azúcar 1:4 peso:volumen mediante un alimentador Boardman) se realizó en cuatro oportunidades (2, 12 y 23 de enero, y 2 de febrero).

Cuantificación de la muerte de larvas

Para determinar el porcentaje de larvas que morían intoxicadas por los mielatos se sacó de cada colmena una foto a un panal con huevos y se lo volvió a fotografiar al menos 10 días después empleando para ello un dispositivo especialmente diseñado para este fin (Figura 2). Se utilizó una cámara de fotos réflex digital Nikon modelo D5300 con lente de 50 mm. La primera fotografía de los panales con huevos se tomó el día 23 de diciembre y en las siguientes visitas (2, 12 y 23 de enero, y 2 de febrero) se fotografió el panal fotografiado en la visita anterior y uno nuevo con huevos. De este modo se evaluó la mortandad larval en 5 ocasiones a lo largo del período de estudio.

En la computadora se seleccionó un sector de panal con huevos y se le superpuso una grilla de 195 hexágonos para facilitar la identificación individual de las celdas (Figura 12). En la fotografía del mismo

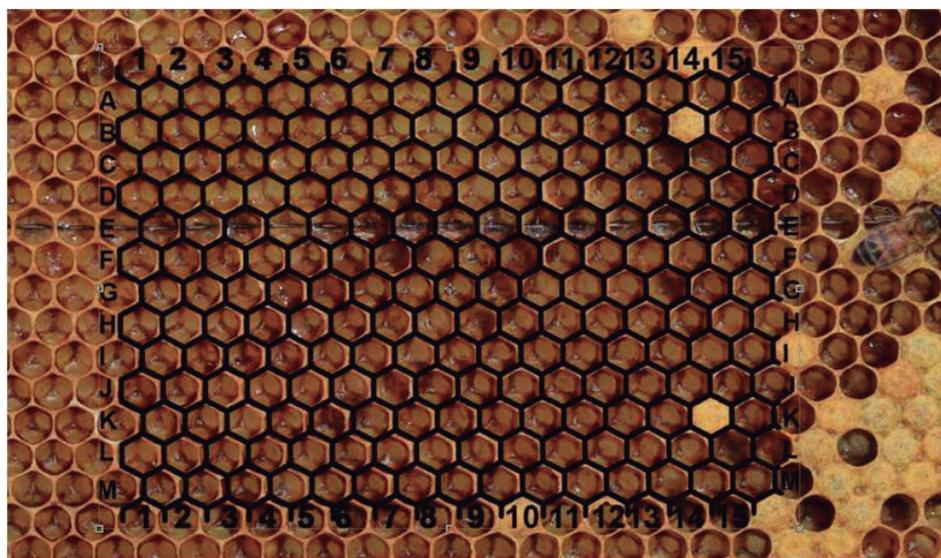


Figura 12. Grilla superpuesta a la imagen del panal con celdas que contuvieran huevos y luego pupas que permitía determinar el número de huevos que daban lugar a cría viable.

panal tomada 10 días después se superponía la grilla sobre las mismas celdas previamente inspeccionadas. A partir del número de huevos iniciales y del número de pupas se determinó el porcentaje de sobrevivencia de las larvas.

Análisis fisicoquímico de los mielatos

En cada una de las cinco cosechas se tomaron muestras colectivas de miel de mielatos de las colmenas que no recibieron jarabe de azúcar y se mandaron a analizar al laboratorio Quality Services International (Alemania) para determinar los siguientes parámetros: humedad, concentración de hidroximetilfurfural, diastasa, acidez, conductividad eléctrica, relación glucosa/fructuosa y color.

Evaluación de las colonias al final del Mal del Río

El día 10 de febrero no se observaron ejemplares de *E. cestri* en los sarandíes colorados y se encontró en las colmenas un mayor número de larvas sobrevivientes por lo que se consideró que ya no ingresaban más secreciones del insecto. El 15 de febrero se estimó la población adulta de las colmenas.

Análisis estadísticos

A lo largo del estudio 10 colonias perdieron sus reinas (1 en el Grupo 1, 3 en el Grupo 2, 2 en el Grupo 3, 2 en el Grupo 4 y 2 en el Grupo 5). Estas

colonias fueron incluidas para el estudio de la viabilidad de la cría solo mientras tuvieron reina y ninguna fue incluida en el análisis de producción de miel.

Todas las evaluaciones estadísticas se realizaron con el Modelo Lineal General (GLM). Los análisis *pos hoc* se realizaron utilizando la prueba de diferencia menos significativa de Fisher (Fisher's LSD). Valores de P debajo de 0,05 fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

Tamaño de las colonias al inicio del estudio

Tres días antes de trasladar las colmenas al apiario afectado por el Mal del Río la población de las colonias osciló entre 7 y 8 cuadros cubiertos de abejas (15000 a 18000 abejas) sin encontrar diferencias entre los 5 grupos ($F = 0,5$, $P = 0,7$) (Figura 13). El área de cría de las colonias estuvo en torno a $0,950 \text{ m}^2$ (aproximadamente 40000 insectos en etapas inmaduras) sin encontrar diferencias entre los 5 grupos ($F = 2,04$, $P = 0,1$) (Figura 14).

Supervivencia de las larvas

La supervivencia de larvas fue estimada 5 veces a lo largo del período de estudio encontrando en general valores extremadamente bajos (Tabla I). En el primer registro las colonias de los grupos 1, 2 y 4 mostraron valores de superviven-

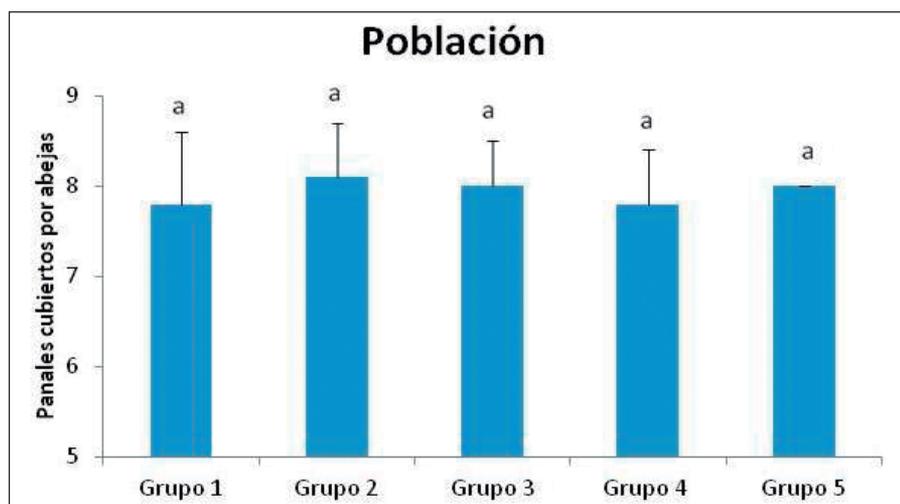


Figura 13. Población de las colonias tres días antes de trasladarlas al apiario de Durazno afectado por Mal del Río. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

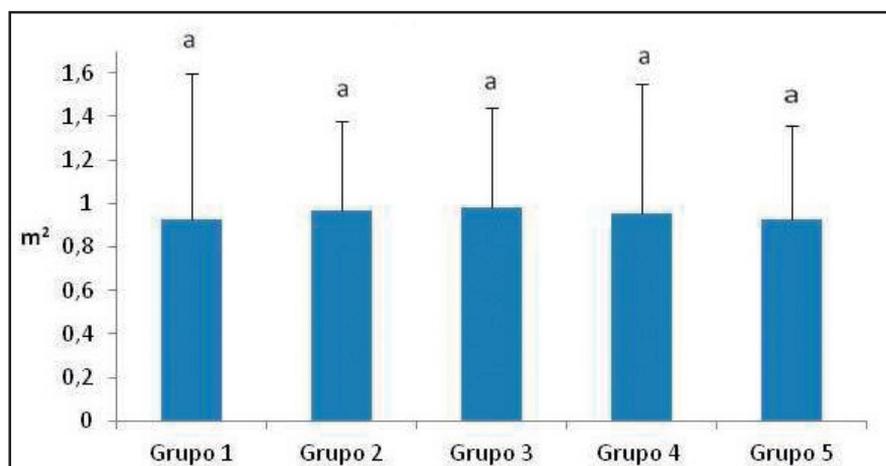


Figura 14. Área de cría de las colonias tres días antes de trasladarlas al apiario de Durazno afectado por Mal del Río. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

cia de las larvas mayores a los de los grupos 3 y 5 ($F = 2,63$; $P = 0,03$), aunque no superaron en promedio el 25%. En los siguientes tres registros la mortandad de las larvas fue casi total en todos los grupos ($F = 10,32$; $P < 0,0001$), aumentando levemente en el último registro en las colonias del grupo 1 que se diferenció de los restantes ($F = 2,90$; $P < 0,0001$) (Tabla 1).

Producción de miel de mielatos

La cantidad de mielatos colectados por las colonias de los grupos 1 y 3 fue mayor que la de los grupos 2, 4 y 5 ($F = 10,08$; $P < 0,0001$), siendo promedialmente de 32 y 28,6 kg, respectivamente. Las colonias del grupo 2 no se diferenciaron de la de los demás grupos (Figura 15).

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia larval de las colonias durante el período que colectaban mielatos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Grupo	Supervivencia larval (%)				
	23/12	2/1	12/1	23/1	2/2
1	20,7 (a)	1,0 (a)	0,5 (a)	2,6 (a)	13,1 (a)
2	24,2 (a)	4,7 (a)	0,8 (a)	0,9 (a)	4,1 (b)
3	2,7 (b)	0,0 (a)	0,0 (a)	0,0 (a)	0,3 (b)
4	14,8 (a)	0,0 (a)	0,1 (a)	0,1 (a)	0,1 (b)
5	7,5 (b)	0,0 (a)	0,0 (a)	0,0 (a)	0,0 (b)

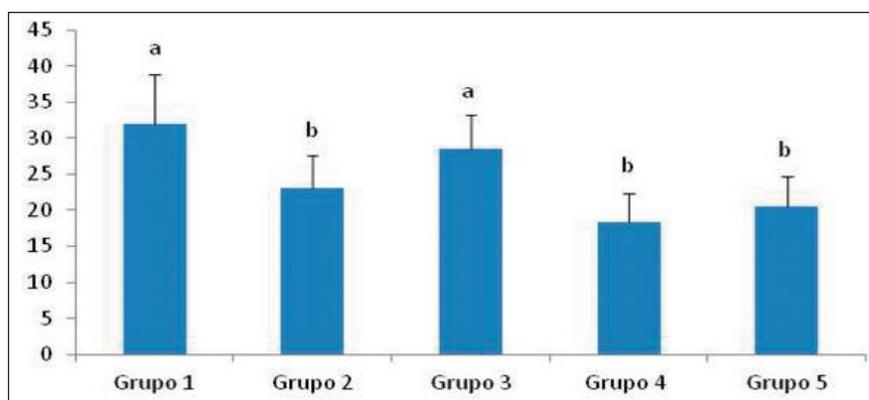


Figura 15. Producción de miel de mielatos de las colonias. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla 2. Indicadores fisicoquímicos de muestras de miel de mielatos obtenidos en diferentes momentos del período que las colonias estuvieron afectadas por el Mal del Río.

Parámetros	2 enero	12 enero	23 enero	2 febrero	14 febrero
Humedad (%)	18,4	19,3	17,9	20,7	20,8
HMF (mg/kg)	1,7	1,2	1,3	1,2	2,0
Diastasa (Schade)	>50%	>50%	>50%	>50%	>50%
PH	4,9	4,6	5,0	4,6	4,4
Conductividad (mS/cm)	1,13	0,98	1,14	1,08	0,98
Fructuosa/Glucosa	1,14	1,14	1,12	1,07	1,10
Color (mm Pfund)	71	71	71	75	83
Mesa/Industria	Mesa	Mesa	Mesa	Industria	Industria

Análisis fisicoquímico de las mieles de mielatos

En la Tabla 2 se resumen los principales indicadores fisicoquímicos de las mieles de mielatos cosechadas a lo largo del período de estudio y su calificación comercial como producto de mesa o industria.

Tamaño de las colonias al final del estudio

Las colonias de los diferentes grupos que no perdieron su reina presentaban una población similar ($F = 2,69$; $P = 0,05$) aunque se evidenció una tendencia ($P < 0,10$) en el Grupo 4 a estar más despoblado que los demás grupos (Figura 16).

DISCUSIÓN

Las medidas de manejo de las colmenas realizadas en este estudio con el propósito de reducir la

mortandad de larvas en colonias afectadas por el Mal del Río no tuvieron efecto. La extracción de todos los mielatos de las colmenas cada 10 días no impidió que la mortandad de las larvas fuese casi total. Ni siquiera cuando además se suministró jarabe de azúcar diluido se consiguió evitar la muerte de las larvas. Solo en los primeros días el jarabe de azúcar evitó la mortandad de algo más de 20% de las larvas, posiblemente debido a que las abejas recién habían descubierto las secreciones de *E. cestrí* y la cantidad que ingresó a las colmenas era muy baja, de forma que el jarabe actuó como diluyente. En el resto del período en que las abejas tenían mielatos disponibles no se evitó la pérdida casi total de cría. Es posible que el ingreso diario de mielatos fuese suficiente para intoxicar a prácticamente todas las larvas, aunque no quedasen casi reservas en los panales.

Pese a que los manejos realizados no atenuaron la mortandad de las larvas, si tuvieron efecto en la producción de miel de mielatos. Las colonias que

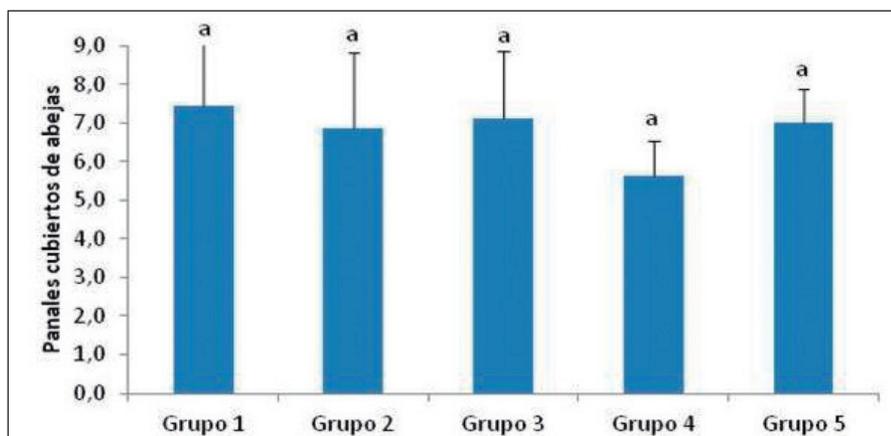


Figura 16. Población de las colonias al finalizar el período de Mal del Río. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

recibieron un cuadro con cría cada 10 días (Grupos 1 y 3) fueron las que produjeron más miel de mielatos alcanzando las colmenas de ambos grupos los 30 kg de promedio. El efecto de agregar abejas (emergieron en torno a 16000-20000 abejas a lo largo del período de estudio) seguramente derivó en un aumento del número de abejas pecoreadoras y por tanto de la capacidad de coleccionar los mielatos. Otro efecto positivo que pudo tener la presencia de un cuadro de cría viable en las colmenas con Mal del Río fue el de estimular el pecoreo (Dreller et al., 1999; Amdam et al., 2009), efecto que quizás no sea causado solo por la presencia de huevos. Cabe señalar que la producción de miel de mielatos pudo ser superior, ya que las colonias llegaron al apiario 17 días después de constatar la muerte masiva de larvas, por lo que solo aprovecharon 40 días aproximadamente.

El análisis químico de la miel de mielatos mostró características propias de este producto como son la elevada conductibilidad eléctrica y la alta actividad de la diastasa (Manzanares et al., 2011), por lo que cumple con el requisito de la Directiva de la Miel de la Comunidad Europea para denominarlo de esta forma. En el estudio anterior el análisis palinológico de la miel de mielatos había mostrado un bajo contenido de polen y una gran cantidad de hongos y conidios aspectos que también los caracteriza (Chomnunti et al., 2014; Vargas et al. 2015).

La humedad de la miel de mielatos de las últimas dos cosechas estuvo por encima del 20% lo que lleva a categorizarlo como un producto para uso industrial. La humedad de la miel de mielatos se puede reducir sensiblemente cosechando solo los cuadros bien llenos (con más de 2 kg) y dejando para la siguiente cosecha los cuadros menos cargados, seguramente con mayor contenido de humedad. Cabe señalar que en este estudio la extracción de todos los cuadros con mielatos se realizó con el objetivo de impedir la mortandad masiva de larvas.

Luego de que las colmenas permanecieran 59 días en un apiario afectado por el Mal del Río, la mayoría del tiempo prácticamente sin cría, la población mostró una reducción en torno al 15% respecto a la población con la que llegaron. Llamativamente, las colonias de los grupos 1 y 3 que recibieron un cuadro de cría en cuatro oportunidades, no presentaban mayor población que las restantes colonias. La merma de población registrada, menor a la esperada, puede estar subestimada ya que era perceptible en las colonias un importante grado de desorganización, ocupando las abejas buena parte

de los panales pero con menos individuos por superficie que la que presentan normalmente las colonias sanas. Esta tendencia de las abejas a expandirse en el nido ya había sido observada en otras oportunidades en colonias con Mal del Río. Por otro lado, las colonias llegaron al apiario con un área de cría establecida artificialmente que albergaba en torno a 40000 formas de cría, mayor a la que correspondía a su población adulta, e incluso mayor a la que normalmente mantienen colonias más grandes. Este número de abejas, que emergieron dentro de las tres semanas siguientes a la llegada de las colmenas, pudo atenuar la muerte de las abejas y la falta de reposición desde mediados de enero por no prosperar el desarrollo de los huevos puestos en el apiario afectado por Mal del Río.

Las colmenas al terminar el estudio fueron «paqueteadas» y las abejas colocadas en una cámara de cría sobre panales vacíos ya que se evidenciaba un fuerte ingreso de néctar. La cría se desarrolló desde entonces sin problemas y la mayoría de las colonias llegaron a marzo con casi toda la cámara de cría cubierta de abejas y abundantes reservas para iniciar la invernada (información no registrada). De esta forma, queda superado el riesgo a debilitamiento y/o pérdidas de colonias por despoblamiento que temen los apicultores.

Este estudio mostró que un manejo sencillo de las colmenas en base a cosechas y agregado de cría de forma continua permite obtener buenas cosechas de miel de mielatos generados a partir de las secreciones de *E. cestrí* en los sarandíes colorados. El manejo realizado en este estudio debe tomarse como una base para mejorarlo teniendo en cuenta las características del productor y la zona donde aparece el Mal del Río, de forma de optimizar la rentabilidad de esta producción. También hay que destacar que no en todos los lugares donde se presenta esta enfermedad la producción de miel de mielatos será similar, ya sea por el tamaño de la población de *E. cestrí* y/o la cantidad de sarandíes colorados presentes. Este estudio se realizó en una zona ubicada entre dos cursos de agua con abundante vegetación riveraña.

La miel de mielato obtenida a partir de las secreciones de *E. cestrí* cuando están sobre los sarandíes colorados causan la muerte de las larvas de un día pero no afectan a las larvas de más de dos días ni a las abejas adultas. Desde el punto de vista del consumo humano no implica ningún riesgo siendo consumido desde hace décadas en Uruguay sin problema alguno.

Bibliografía

- Adler L. (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 3: 409-420.
- Amdam GV, Rueppell O, Fondrk MK, Page R E, Nelson CM. (2009). The nurse's load: Early-life exposure to brood-rearing affects behavior and lifespan in honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Geront.* 44: 467-471.
- Atkins EL. (1997). Injury to honey bees by poisoning. En: Graham JE. The hive and the honey bee. Dadant & Sons Inc., Hamilton, Illinois.
- Barker RJ. (1990). Poisoning by plants. En: Morse RA, Nowogrodzki R. Honey bee pests, predators, and diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Bentancourt C, Scatoni I, Morelli E. (2009). Insectos del Uruguay. Facultad de Agronomía-Facultad de Ciencias.
- Calixto JB, Miguel OG, Rosendo A, Yunes RS, Rae GA. (1990). Action of 2-Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone isolated from *Sebastiania schottiana*. *Planta Med.* 56: 31-35.
- Carvalho PC, Message D. (2004). A scientific note on the toxic pollen of *Stryphondendron polyphyllum* (Mimosaceae) which causes sacbrood-like symptoms. *Apidologie* 35: 89-90.
- Chomnunti P, Hongsanan S, Hudson BA, Tian Q, Peršoh D, Dhami MK, Alias AS, Xu J, Liu X, Stadler M, Hyde KD. (2014). The sooty moulds. *Fungal Divers* 66: 1-36.
- Cintra P, Malaspina O, Bueno OC. (2005). Plantas tóxicas para abelhas: artigo de revisão. *Arq. Inst. Biológico* 72: 547-551.
- Collison CA. (2016) Closer look: nursing behavior: *Bee Culture*, January 26.
- Daners G, Tellería C. (1998). Native vs. introduced bee flora: a palynological survey of honeys from Uruguay. *J. Apicult. Res.* 37: 221-229.
- Delaplane KS, Van Der Steen J, Guzman-Novoa E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J. Api. Res.* 52: 1-12.
- Despres L, David JP, Gallet C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol. Evolut.* 22: 298-307.
- Detzel A, Wink M. (1993). Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecology* 4: 8-18.
- Douglas, A.E. (2009). Honeydew. En *Encyclopedia of Insects*; Elsevier Inc.: Amsterdam.
- Dreller C, Robert E. Page Jr. RE, Fondrk MK. (1999). Regulation of pollen foraging in honeybee colonies: effects of young brood, stored pollen, and empty space *Behav. Ecol. Sociobiol.* 45: 227-233.
- Eickworth G, Ginsberg H. (1980). Foraging and mating behaviour in Apoidea. *Ann. Rev. Entomol.* 25: 421-426.
- Evans JD. (2004). Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 105-111.
- Filho VC, Miguel OG, Nunes RJ, Calixto JB, Yunes RA. (1995). Antispasmodic activity of Xanthoxyline derivatives: structure-activity relationships. *J. Pharm. Sci.* 84: 473-475.
- Garofalo CA. (1977). Brood viability in normal colonies of *Apis mellifera*. *J. Apicul. Res.* 16: 3-13.
- Harriet J.(2012). Sendos aportes del Dr. Homero Toscano en los años setenta sobre el «Mal de Santa Lucía». *Actualidad Apícola* 95: 27-29.
- Johnson RM. (2015). Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60: 415-434.
- Katia S, Seraglio T, Silva B, Bergamo G, Brugnerotto P, Luciano Gonzaga V, Fett R, Oliveira Costa AC. (2019). An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey *Food Res. Inter.* 118: 44-66.
- Louveau J, Mauricio A, Vorwohl G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World* 59: 139-157.

- Manzanares AB, García ZH, Galdón BR, Rodríguez ER, Romero CD. (2011). Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chem.* 126: 664-672.
- Mendoza Y, Harriet J, Campá J, Roth F, Termezana D, Mancuello M. (2012). Mal del Río o Mal de Santa Lucía. *Actualidad Apícola* 94: 8-9.
- Robertson HM, Wanner KW. (2006). The chemoreceptor superfamily in the honeybee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Res.* 16: 1395-1403.
- Sagili RR, Breece CR, Martens BR, Simmons R, Borden JH. (2015). Potential of honey bee brood pheromone to enhance foraging and yield in hybrid carrot. *Seed. Hort. Technology* 25: 98-104.
- Santos E, Invernizzi C, García E, Cabrera C, Di Landro R, Saadoun A, Daners G (2009). Contenido de proteína cruda del polen de las principales especies botánicas utilizadas por las abejas melíferas en Uruguay. *Agrociencia* 13: 9-13.
- Seijo MC, Escuredo O, Rodríguez-Flores MS. (2019). Physicochemical properties and pollen profile of Oak honeydew and Evergreen Oak honeydew honeys from Spain: A comparative study. *Foods* E126.
- Simone-Finstrom M, Spivak M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41: 295-311.
- Tworek K. (1994). Honeydew and its utilization by the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 25: 504-505.
- Vargas N, Cárdenas M, Jiménez P, Noyd RK, Restrepo S. (2015). *Mycology guide: key terms and concepts*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Wright GA, Mustard JA, Simcock NK, Ross-Taylor AAE, McNicholas LD, Popescu A, Marion-Poll F. (2010). Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Curr. Biol.* 20: 2234-2240.

INIA Dirección Nacional
Andes 1365, P. 12
Montevideo
Tel.: 598 2902 0550
Fax: 598 2902 3633
iniadn@dn.inia.org.uy

INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km 11
Colonia
Tel.: 598 4574 8000
Fax: 598 4574 8012
iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas
Ruta 48, Km 10
Canelones
Tel.: 598 2367 7641
Fax: 598 2367 7609
inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande
Camino al Terrible
Salto
Tel.: 598 4733 5156
Fax: 598 4732 9624
inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó
Ruta 5, Km 386
Tacuarembó
Tel.: 598 4632 2407
Fax: 598 4632 3969
iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres
Ruta 8, Km 281
Treinta y Tres
Tel.: 598 4452 2023
Fax: 598 4452 5701
iniatt@tyt.inia.org.uy

www.inia.uy