

# Informe final publicable de proyecto

## Efectos subletales de acaricidas no convencionales en la producción de feromonas y la polinización por *Apis mellifera*

Código de proyecto ANII: FSA\_1\_2018\_1\_152862

Fecha de cierre de proyecto: 20/07/2024

**ROSSINI CARIDAD, Carmen** (Responsable Técnico - Científico)

**AMORÓS MARTÍNEZ, María Eugenia** (Investigador)

**BERTONI NAGUILA, Ana Paula** (Investigador)

**BRAGUNDE MARTINEZ, Guillermo Nicolás** (Investigador)

**BURGUEÑO CARLEO, Anna Paula** (Investigador)

**GONZÁLEZ RITZEL, Andrés** (Investigador)

**OCAMPO LAZO, Valentina** (Investigador)

**RODRIGO CASTRO, Federico** (Investigador)

**SANTOS, Estela** (Investigador)

**SOSA LABADIE, Andrea Carolina** (Investigador)

**UMPIÉRREZ PEÑA, María Laura** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\  
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

## Resumen del proyecto

La abeja *Apis mellifera* es un recurso ecológico y económico muy valioso proveyendo productos de la colmena y cumpliendo un rol fundamental en la polinización de cultivos. La disminución de los polinizadores y el fenómeno del colapso de colonias son hoy una gran preocupación. La pérdida de abejas provendría de la interacción de factores tales como la incidencia del ácaro *Varroa destructor*, y el incremento del uso de pesticidas agrícolas y en sanidad apícola.

Los pesticidas a dosis subletales también pueden alterar procesos de comunicación intra-colmena (afectando su homeostasis), así como la capacidad de aprendizaje y respuesta a estímulos odoríferos de las abejas (afectando la eficacia en la polinización). Los plaguicidas botánicos, esto es, productos naturales derivados de plantas que sean inocuos para las abejas y amigables con el medio ambiente, se presenta como alternativa prometedora y necesaria en la producción agropecuaria. En este proyecto se propuso investigar los efectos subletales de aceites esenciales (AE) con propiedades plaguicidas sobre la abeja melífera. Para ello, se determinó que la aplicación de AE no afectó a las feromonas, como los hidrocarburos cuticulares y el oleato de etilo de las abejas. Asimismo, esta aplicación de AE no afectó la capacidad de aprendizaje y retención de aprendizajes (memoria olfativa). Estos resultados se obtuvieron gracias a la implementación de 2 técnicas novedosas de estudios de efectos subletales en abejas para nuestro país: la cromatografía de gases acoplada a electroantenografía (GCEAD) y el reflejo de extensión de probóscide (PER). Estas técnicas están ahora disponibles para todos los investigadores nacionales. Asimismo como producto del proyecto, se cuenta con material de divulgación sobre el tema en formato historieta que será entregado sin costo, en actividades de divulgación y extensión, a escuelas y bibliotecas públicas, organizaciones educativas sin fines de lucro y sociedades/agrupaciones de apicultores.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Otros Tópicos Biológicos / Ecología Química**

**Palabras clave: plaguicidas botánicos / volátiles de flores / polinización /**

**Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

Importancia de los polinizadores y los riesgos a los que están expuestos

La mayoría de las plantas con flores son polinizadas por insectos y otros animales, mientras que una minoría depende de otros factores abióticos como el viento para su polinización. La polinización entomófila es considerada como una de las interacciones planta-insecto más importantes tanto económica como ecológicamente [1]. La abeja doméstica, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) representa más del 80% de los insectos polinizadores de los principales cultivos del mundo [2] y se estima que la ausencia de su servicio de polinización provocaría una disminución de los rendimientos mayor al 90% en muchas especies de interés agrícola [2].

Recientemente se ha reportado un descenso en la abundancia y diversidad de polinizadores silvestres y domesticados, lo que podría ocasionar una disminución en las especies de plantas dependientes de ellos [3]. Desde 2006 se vienen reportando altos porcentajes de pérdidas de colonias en el mundo [4]. Este fenómeno, caracterizado por una condición patológica en la que diversos factores pueden conducir a una desaparición abrupta de abejas, se denomina trastorno de colapso de colonias (CCD por su sigla inglesa).

Así, la investigación para comprender y mitigar la pérdida de polinizadores aumentó notablemente durante las últimas décadas. Los cambios en el uso de la tierra incluyendo la deforestación, la fragmentación del hábitat, la contaminación ambiental y la propagación de plagas y patógenos están incluidos entre los factores potencialmente responsables del CCD [4]. Entre éstos, la incidencia del ácaro ectoparásito *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae), y la exposición a pesticidas sintéticos se han señalado como los factores más importantes que determinan el proceso de debilitación de la colmena [5].

Los insecticidas sintéticos son una importante herramienta para aumentar la productividad de cultivos (incluyendo cereales, soja, maíz y cultivos frutihortícolas). Asimismo, muchos de estos cultivos dependen de los servicios de polinización de insectos como *A. mellifera* [6]. Esta polinización depende de la capacidad de los insectos de detectar a

distancia claves volátiles atrayentes emitidas por las plantas [7]. Sin embargo, los polinizadores pueden ser afectados por residuos de pesticidas persistentes tanto en el cultivo como en el medioambiente [8]. Paralelamente, el manejo sanitario de la colmena se ha basado principalmente en el control del ácaro *V. destructor* mediante el uso de plaguicidas (acaricidas) sintéticos como piretroides (tau-fuvalinato y flumethrina), amidinas (amitraz), y organofosforados (cumafós). Estos plaguicidas producen resistencia en los ácaros y además contaminan la miel y la cera [9].

Además de su acción tóxica (aguda) sobre insectos benéficos, se ha estudiado el efecto subletal (por exposición crónica) de muchos pesticidas sintéticos sobre diferentes funciones que aseguran el buen funcionamiento de la colmena. Las abejas pueden considerarse indicadores biológicos que recogen sustancias químicas y otros contaminantes de su entorno. Para recolectar recursos esenciales, las abejas exhiben un complejo conjunto de comportamientos que dependen en gran medida del aprendizaje y de la memoria. Estos comportamientos incluyen la navegación en un entorno complejo para encontrar el alimento y regresar a la colmena para proveerla. Así, las abejas aprenden a reconocer las señales (olor, color, textura) que son predictores de una buena recompensa floral, entre los múltiples estímulos que perciben del entorno [10]. Entonces, la detección, el aprendizaje y la memoria son funciones cruciales que permiten a las abejas localizar y extraer con eficacia recompensas florales para abastecer a la colmena. A su vez este abastecimiento es regulado por la correcta división de tareas entre los individuos de la colonia. Dicha división es ajustada por una variedad de señales entre las cuales se encuentran señales químicas (semioquímicos) como las feromonas [10].

Distintos estudios han probado que la exposición crónica a agroquímicos puede causar cambios sutiles, pero ecológicamente importantes, en las funciones cognitivas de las abejas [11-17] y en el nivel de feromonas [18,19]. Los pesticidas más estudiados en este sentido han sido los neonicotinoides (imidacloprid, acetamiprid, tiametoxán, etc.), dado que desde su introducción en la década del 90 su uso ha crecido [6,20]. Se ha demostrado que la exposición al imidacloprid por sí mismo [16] y en combinación con el acaricida cumafós, [13], y la exposición a tiametoxán [21], afectan el comportamiento, y dañan el proceso de aprendizaje y memoria olfativa de las abejas. Abejas pecoreadoras expuestas a estos pesticidas presentan menor respuesta al reflejo de extensión de probóscide (PER por su sigla del inglés) [16], lo que indica una mayor dificultad para aprender cuáles son las señales que predicen una recompensa floral a través de un aroma. Además, la exposición a y el consumo oral de acetamiprid [13,22] tienen un efecto negativo en la memoria de las abejas, impidiéndoles reconocer aromas que antes asociaban con recompensas. Asimismo, el imidacloprid tienen otros efectos subletales en indicadores de performance como la reproducción y el desarrollo de las larvas en abejas melíferas [14,23]. En el caso del herbicida glifosato también se ha estudiado su capacidad de afectar el forrajeo al afectar la capacidad de retornar a su colmenas [12].

Entre las señales químicas afectadas por plaguicidas (y niveles de infección) se encuentran los hidrocarburos cuticulares (HCC) y el oleato de etilo (OE). Los HCC están involucrados en el reconocimiento social de los miembros de la colonia, constituyéndose en firmas químicas que permiten el reconocimiento entre individuos de los miembros de la colonia y por ello mantienen la cohesión de la misma y median la remoción de intrusas [24-26]. El OE regula la maduración comportamental de las obreras, en cuanto al cambio de tareas de las abejas dentro de la colmena (nurses) a las tareas externas llevadas a cabo por las pecoreadoras. Este control provee un mecanismo de respuesta que se adecua a los cambios de estructura de la colonia conservando el correcto equilibrio de todas las tareas y manteniendo así la homeostasis de la colmena [27].

#### Alternativas a los plaguicidas convencionales

Dados estos antecedentes, es preciso fomentar la implementación de programas de investigación que contemplen la identificación, caracterización y efectos sobre el agroecosistema de productos naturales alternativos a los plaguicidas convencionales y que no tengan sobre los polinizadores los efectos detrimentales reseñados. Específicamente para el manejo de plagas apícolas se están investigando técnicas de control basadas en enemigos naturales, productos como ácidos orgánicos (ácido fórmico y ácido oxálico), probióticos [28] y biopesticidas vegetales (extractos de plantas y aceites esenciales -AE-) [29-32]. Los AE son los productos naturales más estudiados para este propósito, ya que exhiben un amplio espectro de propiedades contra insectos y ácaros [33]. Se ha demostrado en ensayos previos in vitro y en colmenas, en algunos casos, que algunos AE obtenidos de plantas aromáticas poseen actividad no solo contra *Varroa destructor* [32-40], sino también antimicrobiana contra el agente causante de Loque americana [34,41-43] y el

de la nosemosis [44,45]. No obstante, actualmente existen muy pocas formulaciones comerciales. La utilización de sustancias naturales como estrategia terapéutica alternativa no contaminante redundaría a favor de la producción de miel sin residuos tóxicos, mejoraría el estado sanitario de las colmenas y minimizaría el desarrollo de cepas resistentes, priorizando la calidad e inocuidad del producto obtenido. Sin embargo, poco se sabe sobre los efectos subletales de los AE y otros insecticidas naturales sobre las propias abejas.

Los efectos subletales de productos utilizados en sistemas agroecológicos no fueron tradicionalmente considerados en el desarrollo de nuevos productos, sin embargo, actualmente su evaluación se hace cada vez más importante. Existen reportes (revisado en [6,20]) de efectos subletales sobre polinizadores tanto sobre los organismos (en células y órganos así como en la performance cognitiva, funciones motoras, reproducción, desarrollo y longevidad), como sobre las colonias. Los efectos sobre los individuos que afectan la percepción de estímulos olfativos y la capacidad asociativa entre esos estímulos y posibles recompensas florales han sido estudiados (ver arriba) empleando el PER [16]. Una técnica menos usada en este tipo de estudios, pero de gran potencial es la detección por electroantenografía (EAG, ver abajo).

La técnica PER es un método comúnmente utilizado para evaluar el aprendizaje asociativo en abejas desarrollado por Kimihisa Takeda [46] que fue rápidamente introducido en muchos trabajos científicos desde entonces. Este método se basa en una respuesta innata de la abeja que es parte del comportamiento de recolección que le permite obtener néctar de las flores: cuando la abeja contacta sus antenas con una solución azucarada, se produce la extensión refleja de su probóscide [47]. En condiciones controladas de laboratorio, es posible condicionar esta respuesta innata a un olor. La facilidad con que las abejas desarrollan esta respuesta condicionada (aprendizaje) y la repiten al cabo de un tiempo determinado (memoria olfativa), es afectada por sus experiencias previas. En nuestro trabajo, estas experiencias serán la exposición previa a distintos productos sanitarios del tipo AE, habiéndose realizado el condicionamiento con azúcar y azúcar adicionado claves químicas de flores de manzano (por ej. con volátiles florales). Se ha elegido este cultivo porque existen reportes en literatura acerca de la importancia de las abejas en la polinización y cuajado de las frutas (revisado en [48,49]). Los volátiles florales son mezclas complejas emitidas por las flores que los insectos pueden detectar a distancia y seguir a contraviento como forma de localizar a las flores y en ellas fuente de alimento, proveyendo en el proceso el servicio de polinización [1,50]. El efecto de AE utilizados en control de plaga en los comportamientos de abejas relacionados con la polinización han sido estudiado solo en casos puntuales [51], por ejemplo en el caso del AE de hinojo y pecan la respuesta del PER no es afectada por la aplicación de estos AE cuando ya está la probóscide extendida [51].

Asimismo, el proceso de olfacción en insectos comienza por la detección periférica de compuestos volátiles mediante receptores olfativos presentes en las antenas (donde también existen otros receptores). Este proceso puede medirse experimentalmente mediante la técnica de EAG, la cual implica la medida de cambios en la diferencia de potencial entre la base y la punta de la antena de un insecto. Estos cambios responden a impulsos nerviosos aferentes provenientes de las neuronas olfativas, y suelen aplicarse a estudios de feromonas en insectos, particularmente en lepidópteros (ver por ej. [52,53]). La técnica puede emplearse en otros órdenes de insectos como los himenópteros [7,50,54-57], y puede asimismo acoplarse a una metodología de separación cromatográfica de compuestos volátiles (GCEAD), de modo de analizar en forma precisa a cuáles compuestos dentro de una mezcla el insecto está respondiendo [57], ya que los volátiles -de flores por ejemplo- son mezclas muy complejas en las cuales solo algunos compuestos pueden tener actividad electrofisiológica, esto es, ser detectados. EL GCEAD al separar previamente a la llegada a la antena la mezcla en sus compuestos tiene entonces la potencialidad de discriminar cuáles son los compuestos con actividad eléctrica en la antena. Como parte de su estrategia de forrajeo, entre las múltiples señales que las abejas utilizan para localizar fuentes de comida adecuadas se encuentran los volátiles florales [7,57]. La EAG ha sido utilizada en el caso de las abejas para el estudio de la detección de compuestos biológicamente activos provenientes de flores de diferentes cultivos, incluido coles [55], alfalfa [54], girasol [56], kiwi [50], entre otros (Asimismo, se han hecho algunos estudios combinados de la detección por EAG con estudios del PER [58,59]). Así, el proceso periférico de percepción que se estudia por EAG complementa el estudio de aprendizaje y memoria antes descrito, y si bien existen antecedentes de estudios del efecto de pesticidas en la recepción periférica en otros órdenes de insectos [60], no se han realizado aún en *A. mellifera* por EAG.

Esta propuesta surge entonces del aumento de la demanda por productos naturales alternativos para el control sostenible de plagas y en la necesidad de evaluar, además de su eficacia, sus efectos secundarios y subletales sobre los principales polinizadores. Nos centraremos en productos alternativos para sanidad apícola, aunque las técnicas a desarrollarse podrán utilizarse para otros productos fitosanitarios o ambientales, como un aporte hacia la comprensión y mitigación del CCD y su afecto detrimental en la polinización de flora silvestre y cultivos.

## **Metodología/Diseño del estudio**

Nota: Todas las figuras y tablas se encuentran en el apéndice

### **1 Aceites esenciales**

Se obtuvieron aceites esenciales (AE) de *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae), *Schinus molle* (Anacardiaceae), *Humulus lupulus* (Cannabaceae) -lúpulo- mediante destilación por arrastre por vapor, se secaron con Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, almacenándose a -5°C y oscuridad.

### **2 Caracterización química de AE**

Los AE fueron tipificados por cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS, Shimadzu GC-2010/QP2010 Plus), como se describió previamente en nuestro laboratorio [61]. El análisis multivariado presentado se realizó en la plataforma libre Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

### **3 Construcción del sistema automático de liberación de estímulos volátiles**

Con el Taller de Instrumentos y el Taller de Vidrio de Facultad de Química se construyó un liberador de estímulos automatizado para la aplicación de la técnica PER (Fig.1). Este sistema es utilizado para evaluar la capacidad de las abejas para asociar un olor (estímulo volátil) con una recompensa (solución de sacarosa 50% m/m). Se utiliza 1-hexanol como estímulo volátil. Las abejas se colocan en el dispositivo bajo un flujo de aire constante de 150mL/min. El sistema de liberación de estímulos es controlado mediante una placa Arduino que controla una serie de válvulas solenoides y motores que regulan la salida de los volátiles. Una prueba completa consta de la exposición de la abeja a aire limpio durante 16s, al estímulo volátil durante 6s, 17s de aire limpio nuevamente y luego 20s sin estímulos para permitir que la abeja procese la información adquirida. Luego de 3s del comienzo de la salida del estímulo volátil, una señal indica que se toque la antena de la abeja con la solución de sacarosa (recompensa), permitiéndose su alimentación. Una respuesta positiva al estímulo volátil se obtiene cuando la abeja extiende totalmente su probóscide durante los primeros 3s de exposición al estímulo volátil.

### **4 Colecta de abejas para trabajo en laboratorio y mantenimiento en condiciones controladas**

El material vivo siempre se obtuvo de colmenas de dos apiarios de Canelones (Sauce y Santa Rosa) según disponibilidad. Se colectaron cuadros con cría operculada, trasladándose al laboratorio, manteniéndolos a 30°C, 65% humedad relativa y oscuridad. Los cuadros se revisaron diariamente y las abejas emergidas se colocaron en cajas (acrílico, 11 x 8 x 9.5cm) en grupos (120-200 abejas) con polen y sacarosa 30% m/m. Diariamente se registró consumo de alimento y mortalidad, retirando las abejas muertas.

### **5 Toxicidad de aceites esenciales**

#### **5.1 Humulus lupulus**

De cuadros con cría operculada trasladados al laboratorio se extrajeron abejas y ácaros. Se evaluaron por exposición completa los AE de Cascade y Nugget a 1.4, 2.8, 5.6 y 11.2 µL/mL (hexano) de acuerdo a protocolos previos[32] con 6 varroas y 10 abejas. Se calculó las dosis letales 50 a 24, 48 y 72h (LD50, Probit, Minitab\_v.20.4). Al terminar, las abejas sobrevivientes fueron guardadas (-5oC) para análisis de feromonas.

#### **5.2 Schinus molle**

Se estudió la toxicidad del AE de *S. molle* por exposición completa como en 5.1, calculando las LD50 a 24 y 48h como se mencionó previamente.

### **6 Exposición de abejas en laboratorio a tratamientos**

## 6.1 Para evaluación de efecto en olfacción periférica (EAG)

### 6.1.1 Exposición temporal

Se aplicaron 3 tratamientos: control (vehículo: emulsión agua - aceite de Ricino 5 % m/m), timol y AE de *E. buniifolium*. Se embebieron tiras de cartón (3 x 8 x 0.15cm) con 2.2mL de la emulsión correspondiente, para aplicar 25mg de principio activo (PA) por cartón. Luego de reposar (18h) a temperatura ambiente se armaron los sistemas de exposición a vapores[62]. En el compartimento superior del sistema se colocaron 15 abejas y caramelo sólido, y en el inferior una tira de tratamiento.

### 6.1.2 Exposición crónica

El experimento se realizó por exposición completa en las cajas mencionadas, aplicando los tratamientos: AE de *E. buniifolium*, timol o control, embebidos en tiras de cartón. En cada caja se colocaron dos tiras de 7x3x0.15cm embebidas con 1.5mL de emulsión. Así, en cada caja (volumen 836cm<sup>3</sup>) se logró una concentración de 0.08 y 0.07mg/cm<sup>3</sup> para AE y timol respectivamente. La primera aplicación se realizó cuando las abejas tenían 3/4 días de edad, reemplazándose las tiras a los 8/9 y 13/14 días.

## 6.2 Exposición oral para evaluación de efecto en sensibilidad a la sacarosa, aprendizaje y memoria y feromonas

Se individualizaron abejas en viales que se anestesiaron (baño agua-hielo) para ser restringidas en tips de pipetas, dejando libres aparato bucal y antenas (necesarios para registrar el PER). Los tratamientos orales se realizaron con soluciones (DMSO) de imidacloprid y aceite esencial. Las abejas encepadas se mantuvieron 135min en incubadora, en seis grupos. Cada abeja fue alimentada con 3µL de una solución 16% m/m de sacarosa. Un grupo recibió solo sacarosa (Control Total), otro grupo recibió sacarosa con DMSO (Control), otros dos grupos recibieron sacarosa agregada de imidacloprid (0.25ng (IMI1) o 0.50ng (IMI2)) y los dos restantes recibieron sacarosa agregada de AE (0.25ng (AE-Eb1) o 0.50ng (AE-Eb2)). En la evaluación de aprendizaje, el experimento comenzó 90 min después de la exposición a los tratamientos. Al culminar se guardaron abejas para la evaluación de feromonas.

## 6.3 Exposición crónica para evaluación de efectos sobre aprendizaje y memoria y feromonas

Los tratamientos fueron aplicados en tiras de cartón (4.65 x 3.30 x 0.15cm) dentro de las cajas desde su armado, embebidas en una emulsión del tratamiento. Los tratamientos fueron Control (solo emulsificantes: aceite de soja y etanol), AE de *E. buniifolium* y timol. En todos, se embebieron 30 tiras de cartón, utilizando 10.32g de aceite de soja y 3.76g de etanol, mientras que para los principios activos se utilizaron 13.46g de AE y 3.36g de timol, administrando de esta forma 420mg de AE de *E. buniifolium* y 106mg de timol por caja.

## 7 Efecto de la exposición de abejas en laboratorio a aceites esenciales y otros tratamientos

### 7.1 Olfacción periférica (EAG)

#### 7.1.1 Exposición temporal en laboratorio

Se escindió una porción del último flagelómero de antena (abejas anestesiadas de 9/10 y 14/15 días de edad, expuestas a vapores de tratamientos durante 24h previo al registro EAG), colocándose entre dos electrodos con gel de electrocardiograma[63,64]. Se suministró una corriente continua de aire (450mL/min) humidificado[64]. Como estímulo se utilizó un estándar de linalool (?99.5%), monoterpeno ubicuo en flores[65,66], con actividad electroantenográfica en abejas [67-71]. Se testaron 10?L de soluciones (0.1, 1, 5, 10 y 100 ?g/?L, hexano), realizándose curvas dosis-respuesta EAG. Se utilizó el software GC-EAD\_2014 (Syntech). El efecto del tratamiento sobre las señales electroantenográficas se estudió utilizando ANOVA Split-plot (SPSS Statistics IBM-v.27.0).

#### 7.1.2 Exposición crónica en laboratorio

Cuando las abejas alcanzaron 9/10 y 14/15 días de edad se estudió la respuesta EAG a 3 dosis de linalool: 10, 100 y 1000?g en orden creciente, con igual procedimiento que 7.1.1 (solvente: etanol). Tanto los controles como los estímulos se aplicaron en ciclos de 3 pulsos de 0.5s separados por 60s, con 75s intraciclo.

### 7.2 Sensibilidad a la sacarosa

Se evaluó el efecto del consumo de AE de *E. buniifolium* en la sensibilidad a sacarosa usando como control positivo imidacloprid (que afecta la sensibilidad a sacarosa de abejas jóvenes[72]) sobre abejas de tres edades: 2/3, 5/6 y 9/10 días. Se siguió el protocolo de Mengoni-Gonalons, Farina[72], obteniéndose un índice de respuesta gustativa (IRG) por abeja.

### 7.3 Aprendizaje y memoria olfativa (condicionamiento PER)

#### 7.3.1 Exposición oral en laboratorio

La evaluación de aprendizaje y memoria en abejas expuestas oralmente a AE de *E. buniifolium* e imidacloprid se

realizó en abejas de 2/3 y 9/10 días de edad. La fase de entrenamiento (aprendizaje) se realizó en bloques de 12 abejas, 90min después de la exposición a los tratamientos, y constó de pruebas separadas por 15 minutos. Se siguió el protocolo de Mengoni-Gonalons, Farina[72].

### 7.3.2 Exposición crónica en laboratorio

Se evaluó la capacidad de aprendizaje asociativo en abejas expuestas crónicamente a los AE y timol, utilizando estímulos condicionantes (EC) y solución de sacarosa 50% m/m como estímulo no condicionante. Se utilizó como EC al volátil floral 1-hexanol en abejas de 5/6 y 12/13 días expuestas de forma crónica a timol o AE de *E. buniifolium*, mediante la técnica de condicionamiento de la respuesta de extensión de probóscide (PER). Para abejas de 9/10 días, se utilizó como EC al volátil floral linalool. La exposición a estímulos y evaluación se realizó como en 7.3.1. El análisis estadístico de las respuestas en PER se realizó usando GLMM binomial con comparación posterior por Tukey o mediante ANOVA para medidas repetidas, en memoria, mediante prueba exacta de Fisher (SPSS Statistics-IBM-v.27.0).

### 7.4 Extracción y análisis de feromonas

#### 7.4.1 Hidrocarburos cuticulares (HCC)

Se usaron los protocolos anteriormente desarrollados en nuestro laboratorio [61,73].

#### 7.4.2 Etil Oleato (EO)

Se usaron los protocolos anteriormente desarrollados en nuestro laboratorio [61,73].

## 8 Exposición de abejas en colmenas a aceites esenciales y timol

### 8.1 Formulación con el PA

La formulación se aplica mediante tiras de cartón embebidas en emulsión de PA (en aceite de soja/etanol, 3.6:3:1). El formulado se prepara mezclando 120g del PA correspondiente (AE de *E. buniifolium* o *S. molle*, o timol) con 100mL de aceite de soja, agitando (75°C, 15 minutos). Se agrega 42mL de etanol, agitando (30min). A esa mezcla se le agregan 30 tiras de cartón que se dejan 24h embebiendo. El control se realiza igual pero solo con aceite de soja/etanol.

### 8.2 Exposición de abejas en colmenas

Se utilizaron ocho colmenas Langstroth del apiario experimental de INIA-La Estanzuela, aplicando cuatro tratamientos: AE de *E. buniifolium*, AE de *Schinus molle*, timol y control de vehículo de la emulsión. Abejas recientemente emergidas (0/1 día de edad) se marcaron utilizando marcadores POSCA. En el día 1 del ensayo, se introdujeron 250 abejas marcadas por colmena ( $n=2/\text{tratamiento}$ ) y, sobre los cabezales de los cuadros de la cámara, se colocaron cuatro tiras de 20x3.3x0.15cm. En el día 12 se repusieron las tiras.

### 8.3 Recuperación de abejas expuestas a los tratamientos

Se recuperaron abejas nodrizas marcadas el día 12 de exposición, colocándose en grupos de 120 en cajas con caramelo sólido, manteniéndose a 32°C, 65% humedad relativa, oscuridad y alimentándose ad libitum. Se realizaron ensayos EAG y PER en los días 13 a 16. En el día 40 se colectaron abejas marcadas saliendo o retornando del forrajeo, y, en el 46 se recuperaron abejas pintadas dentro de las colmenas.

## 9 Efecto de la exposición a varroacidas en colmenas sobre las respuestas en EAG y PER

La respuesta EAG se estudió en abejas nodrizas y en forrajeras, en los días siguientes a las recuperaciones, suministrando 10, 50, 100 y 1000µg de linalool, igual que en 7.1.1 y 7.1.2. La evaluación de aprendizaje y memoria en abejas nodrizas y forrajeras recuperadas de colmenas con exposición crónica a los tratamientos se realizó con el estímulo condicionado 1-hexanol y el estímulo no condicionado sacarosa 50% m/m, igual que en 7.1.2.

## 10 Análisis de volátiles florales con actividad electrofisiológica

### 10.1 Colectas in vivo y caracterización química

Se realizaron colectas in vivo de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de flores de *Malus domestica* var. *Granny-Smith* y *Gala* (34.39oS, 56.17oO) y de *Red Chief* (34.45oS, 56.18oO). Además, se cultivó *Cucurbita maxima* var. *zapallito* redondo *Clarissimo* (CAPS) en una quinta familiar (34.32oS, 55.57oO). El muestreo de manzano se realizó colocando una inflorescencia (4-8 flores) en una bolsa inerte; el de las flores de zapallito con 1 flor/bolsa. Los VOCs se adsorbieron (8h) en *HaySep-Q\_80/100mesh* mediante arrastre por aire (1L/min, bomba Apex2, Casella). Se realizaron blancos. Los VOCs se eluyeron del adsorbente con hexano (1 mL, HPLC), concentrándose a 100µL con nitrógeno. La caracterización química de los VOCs se realizó por GC-MS con iguales columnas y condiciones que para los AE.

## 10.2 Análisis por GC-EAD

Se realizaron análisis de cromatografía gaseosa acoplada a detector de electroantenografía (GC-EAD. GC HP 5890 Series-II, con columna OPTIMA-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm; Macherey-Nagel) y detector de ionización de llama) con los VOCs, utilizando antenas de abejas obreras de edad desconocida sin exposición a varroacidas, colectadas al retornar del pecoreo en un apiario comercial (34.32 o S, 55.57 oO). Para cada análisis se inyectó splitless 2µL del extracto concentrado. Programa de temperatura: inicio en 40 oC (1 min), incrementándose (5oC/min) a 220oC; temperatura de interfase al EAG: 220 oC, y del inyector y detector: 250oC. Gas portador: hidrógeno; gas suplementario nitrógeno. El análisis se realizó como en 7.1.1.

### Resultados, análisis y discusión

Nota: Las figuras y tablas se presentan en el Anexo 1, adjunto.

#### Obtención y caracterización de aceites esenciales

Los AE de *H. lupulus* se produjeron de material peleado comercial. El rendimiento de extracción [(masa AE/masa material vegetal) x 100] se presentan en Tabla 1. La composición química de los AE utilizados se anexa (Tablas 2-8) y fue detallada en informes intermedios. Se agrega aquí el análisis multivariado realizado para el AE de *E. buniifolium* por época y año de cosecha (Fig.1). Este análisis en función del tiempo muestra (Fig.22) una clara variación en el perfil químico global, en función de la estación y del año de cosecha del material vegetal, en el AE de *E. buniifolium*. Esta variación en los perfiles globales fue producida (Fig.22B) por hidrocarburos sesquiterpénicos (germacrene-D (34), ?-calacorene (47), dos sesquiterpeno no identificados (SNI-50 y SIN 87) y germacreno-B (49)) y al monoterpeno iso-3-thujanol (6) (Fig.22C). La variación en la actividad de productos naturales está ampliamente documentada, en particular la variación de este AE, preponderantemente en sesquiterpenos, podría estar explicando su actividad contra varroa, como se ha reportado[32]. Se continúa trabajando en el análisis de estos datos.

#### Construcción del sistema automático de liberación de estímulos volátiles

El sistema de liberación automática de estímulos volátiles construido y detallado en Figs.1-3), demostró tener una alta reproducibilidad. Se ha enviado un manuscrito con su diseño.

#### Toxicidad de aceites esenciales

*Humulus lupulus*: La toxicidad sobre varroas fue similar en las dos variedades de lúpulo ensayadas (Fig.4; ej.: a 24h, toxicidad Cascade: DL50 1.6µL/cm<sup>3</sup> (IC95%: 1.2 – 2.1µL/cm<sup>3</sup>) vs. toxicidad Nugget: DL50 1.9µL/cm<sup>3</sup> (IC95%: 1.3 – 2.4µL/cm<sup>3</sup>)). Sin embargo, la toxicidad sobre abejas fue menor para Cascade (FFig.4, ej.: a las 24 h, toxicidad Cascade: DL50 6.1µL/cm<sup>3</sup> (IC95%: 5.2 – 7.2µL/cm<sup>3</sup>) vs. toxicidad Nugget: DL50 3.5µL/cm<sup>3</sup> (IC95%: 2.8 – 4.2µL/cm<sup>3</sup>)). La inocuidad de los AE frente a las abejas se puede evaluar utilizando el índice de seguridad, IS = DL50 *A. mellifera* /DL50 *V. destructor*. Así, la variedad Cascade (3.6 – 3.8) tiene mayores índices de seguridad que la Nugget (1.8 – 2.3).

*Schinus molle*: Para *V. destructor* las DL50 fueron 41 ?g/cm<sup>3</sup> (IC95%: 26-57 ?g/cm<sup>3</sup>) y 21?g/cm<sup>3</sup> (IC95%: 5-37 ?g/cm<sup>3</sup>) para 24 y 48h respectivamente (Fig.-6). Para *A. mellifera*, no se detectó variación en la mortalidad según la dosis de AE, con excepción del aumento de mortalidad a la mayor dosis de AE estudiada (Fig.5). Dado que no murieron >50% de las abejas para ninguna dosis no se pudo calcular la DL50 para abejas. Los IS fueron entonces mayores a 2.5 y 5 para 24 y 48h de exposición, respectivamente[37].

#### Exposición de abejas en laboratorio a aceites esenciales y otros tratamientos

##### Efecto de la exposición a varroacidas en olfacción periférica (EAG)

##### Exposición temporal

Como era esperado, la respuesta EAG aumentó con la dosis de estímulo brindada[67,69,74] y alcanzó una meseta en las dosis mayores[67] (Fig.7).

El análisis ANOVA-Split-plot (datos transformados logarítmicamente, eliminando valores atípicos para cumplir normalidad) mostró un efecto en la respuesta a linalool en abejas de 9/10días (p=0.003); la diferencia fue entre antenas control y expuestas a AE de *E. buniifolium* (post-hoc Games-Howell: p=0.046). Este p-valor, cercano al de significancia, y la gran dispersión de respuestas de antenas control (Fig.7A) hacen suponer que la diferencia no es biológicamente

relevante. La exposición a los vapores de timol no tuvo efecto en la respuesta EAG (Games-Howell:  $p=0.055$ ). Para abejas de 14/15 días el tratamiento no mostró un efecto en la respuesta (ANOVA-Split-plot:  $p=0.367$ ; Fig.7B). Se concluye entonces no afectación por los tratamientos temporales sobre las respuestas EAG.

#### Exposición crónica en laboratorio

En este caso también la respuesta EAG de antenas de abejas expuestas crónicamente a los tratamientos aumentó con la dosis de linalool (Fig.8).

Para abejas de 9/10 días la exposición crónica -completa- a los varroacidas no provocó una diferencia en la respuesta a linalool (ANOVA-Split-plot:  $p=0.598$ , Fig.8A).

En abejas de 14/15 días de edad, el análisis indicó diferencia estadística entre al menos dos tratamientos (ANOVA-Split-plot:  $p=0.041$ , Fig.8B). Sin embargo, el análisis post-hoc no arrojó diferencias significativas entre tratamientos (Bonferroni,  $p>0.05$ ). En cambio, el análisis sobre los datos sin valores atípicos mostró una disminución significativa en la respuesta media a linalool en abejas tratadas con timol en relación con el grupo control interno (ANOVA-Split-plot:  $p=0.009$ ; post-hoc Games-Howell:  $p$ -valor = 0.04). Esta diferencia solo se considera tentativa debido al bajo número de réplicas de timol.

#### Sensibilidad a la sacarosa

Los datos obtenidos (Fig.9) fueron analizados comparando los controles y el imidacloprid para evaluar el diseño de nuestro ensayo, comparando con resultados ya reportados (ANOVA-1 vía,) y por otro lado se compararon mediante ANOVA-1 vía los controles con los tratamientos de AE. Para el caso del aceite esencial no se observaron diferencias significativas con los controles en ninguna de las edades ( $p=0.53$ ,  $p=0.99$  y  $p=0.65$  para cada una de las edades, respectivamente). Para los controles y el imidacloprid se obtuvo diferencias significativas en la edad de 5/6 días y 9/10 días ( $p=0.16$ ,  $p=0.03$ ,  $p=0.04$ , para cada edad, respectivamente). Posteriormente se realizó el análisis de comparaciones en las edades con diferencias significativas mediante LSD (Fisher) obteniendo diferencias significativas entre el control y los dos tratamientos con imidacloprid en abejas de 5/6 días de edad y diferencias significativas entre el DMSO Control y el tratamiento con mayor cantidad de imidacloprid (IMI2) en abejas de 9/10 días de edad. Estos resultados se alinean con reportes previos[72].

#### Efecto de exposición a varroacidas sobre aprendizaje y memoria

##### Efecto en abejas expuestas oralmente a imidacloprid y a AE de *E. buniifolium*

Se evaluó el aprendizaje asociativo de abejas de 2/3 (Fig.10A) y 9/10 (Fig.10B) días expuestas oralmente a dos dosis de imidacloprid y de AE de *E. buniifolium*. Las curvas de aprendizaje fueron comparadas con modelos lineales generalizados mixtos (efectos fijos: tratamiento y prueba, e individuo como efecto aleatorio (5 pruebas realizadas/individuo). No se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos para las edades evaluadas (Tukey post-hoc,  $p>0.05$ ). La capacidad de retener la asociación durante 24h (Fig.11) no se fue afectada significativamente entre tratamientos .

##### Efecto de exposición crónica a timol o AE de *E. buniifolium*

En ninguna de las edades evaluadas (5/6 y 12/13 días (Fig.12) se obtuvieron diferencias significativas entre las curvas de aprendizaje asociativo (Tukey\_post-hoc,  $p>0.05$ ). La capacidad de retener la asociación durante 24h (Fig.13) no se vio afectada entre tratamientos. Similarmente, la exposición crónica completa en laboratorio a AE de *E. buniifolium* y timol no afectó el aprendizaje asociativo de linalool en abejas de 9/10 días (ANOVA medidas repetidas,  $p=0.10$ ; Fig.15A) ni tampoco su memoria (Test exacto-Fisher:  $p=0.13$ ; Fig.15B).

A destacar, cuando las abejas son expuestas crónicamente a AE de *E. buniifolium* su sobrevivencia no fue diferente de las expuestas al control (Mantel-Cox:  $p=0.11$ ; Fig.14), indicando que la dosis ensayada en laboratorio sería (extrapolándola a las dimensiones de colmenas) segura para su uso en colmenas. En cambio, en abejas expuestas crónicamente a timol, la supervivencia acumulada fue menor que en las expuestas al control (Mantel-Cox:  $p<0.0001$ ; Fig.14).

#### Feromonas

Se evaluó el impacto del AE de lúpulo sobre el perfil de HCC y EO en abejas. Para HCC

Se identificaron 52 HCC, incluyendo HCC lineales, metilados y con insaturaciones, y cuantificaron en abejas nodrizas expuestas (3 días) a AE de lúpulo. Este es un resultado novedoso respecto a nuestro reporte anterior[61] porque se realizó en abejas de diferente edad y utilizando una vía de exposición diferente. Para los grupos de compuestos no se

observaron diferencias entre abejas expuestas a diferentes tratamientos (Fig.16, ANOVA,  $p>0.05$ ). Al evaluar los compuestos individualmente, se observaron diferencias n-nonadecano, n-heneicosano, 7-nonacoseno, n-nonacosano, n-hentriacontano (Fig.17, ANOVA,  $p<0.05$ , Dunnet,  $p<0.05$  comparado con control).

Para la cuantificación de EO se obtuvo una curva de calibración con buen ajuste lineal ( $R=0.9977$ ), por lo que se realizó la cuantificación mediante este método en el rango evaluado, obteniendo la siguiente relación lineal:  $y=0.017x$ . Al comparar los niveles de EO en abejas expuestas a los diferentes tratamientos, no hubo diferencias significativas (ANOVA,  $p>0.05$ , Fig.18).

Efecto de exposición a varroacidas en colmenas sobre EAG y PER

#### EAG

El tratamiento crónico con timol, AE de *E. buniifolium* y AE de *S. molle* no tuvo efecto significativo sobre la detección periférica a linalool en abejas nodrizas o pecoreadoras (ANOVA-Split-plot: nodrizas:  $p=0.81$  y  $0.32$  para datos con y sin valores atípicos, respectivamente; pecoreadoras:  $0.73$  y  $0.67$ , con y sin valores atípicos, respectivamente; Fig.19).

#### Aprendizaje asociativo

No se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos en ninguna de las dos edades evaluadas sobre el aprendizaje asociativo de abejas nodrizas (Fig.20A) y pecoreadoras (Fig.20B) expuestas crónicamente a Timol, AE de *E. buniifolium* y AE de *S. molle* en colmenas (GLMM, Tukey post-hoc,  $p>0.05$  para todos). A pesar de no haberse obtenido diferencias significativas, entre curvas de aprendizaje obtenidas a partir de los dos tipos de abejas se observa que las abejas pecoreadoras, necesitan más repeticiones de asociación estímulo volátil-recompensa para llegar a la meseta de aprendizaje que es de alrededor de 80%. En la evaluación de la capacidad de retener la asociación durante 24h (Fig.21) no se observaron diferencias entre tratamientos.

Volátiles florales y actividad electrofisiológica

#### Colectas in vivo y caracterización química

El alcohol bencílico fue el compuesto mayoritario en los volátiles florales de las tres variedades de *M. domestica* (Tablas 9-11). El segundo compuesto mayoritario en las variedades Red Chief y Granny Smith fue linalool (8 y 9% respectivamente), encontrado también en (2%). En las flores de la variedad Gala otros compuestos mayoritarios fueron salicilato de metilo y hex-3-en-1-ol.

Los componentes mayoritarios de los VOCs de flores hembra de *C. maxima* fueron 1,4-dimetoxibenceno (32.8%), alcohol bencílico (11.3%) y 1,2,4-trimetoxibenceno (5.3%) (Tabla 12). En los VOCs de flores macho, el componente principal fue un hidrocarburo lineal no identificado (24%), otros componentes mayoritarios incluyeron alcohol bencílico (18.8%) y 1,4-dimetoxibenceno (16.4%). La diferencia encontrada en la composición de los VOCs de flores macho y hembra de zapallito de tronco (Tabla 12) es típica del dimorfismo sexual de flores de plantas monoicas[75].

#### Análisis por GC-EAD

Con la información aportada por esta técnica y la caracterización química de los volátiles florales de manzano Red Chief se identificó al alcohol bencílico y al linalool como los compuestos activos que generaron respuesta EAG en antenas de abejas (Fig.22), con una respuesta EAG promedio de  $0.13\pm 0.02$  y  $0.06\pm 0.01$  mV, respectivamente. Para los volátiles florales de Granny Smith y Gala no se obtuvo respuesta electrofisiológica. Aquí se utilizaron abejas pecoreadoras de edad desconocida, colectadas en diferentes meses y colmenas, por lo que esta falta de respuesta a compuestos para los cuales se registró respuesta EAG en los VOCs florales de Red Chief, en particular a alcohol bencílico (compuestos mayoritarios de todas las variedades) y linalool podría deberse a las condiciones biológicas de los individuos[58,76], así como a su experiencia olfativa[58,76,77], ya que podrían haber estado explotando recursos florales que posean los mismos compuestos que los presentes en los VOCs estudiados. La experiencia olfativa (asociación y recuerdo de odorantes florales con la recompensa) provoca una disminución de la expresión de los receptores olfativos que detectan esos compuestos[77], pudiendo estar estos niveles debajo del umbral para generar una respuesta EAG medible[64].

En los volátiles de flores hembra de *C. maxima* se identificaron ocho compuestos que generaron respuesta EAD (Fig.23A) y en los volátiles de flores macho, seis (Fig.23B). Además, para ambos VOCs se registró respuesta EAD a un pico que eluyó entre el 1,4-dimetoxibenceno y el alcohol hidrocinámico, y a otro que eluyó entre el alcohol

hidrocinámico y el indol. Estas dos respuestas EAD se adjudican a dos grupos de compuestos que no se resuelven en las condiciones cromatográficas utilizadas. El primer grupo estuvo conformado por tres compuestos no identificados, y el segundo por el (Z)-alcohol cinámico y dos co-eluyentes no identificados. En la tabla 13 se detallan los compuestos con actividad electrofisiológica y la amplitud de la respuesta EAD promedio.

#### Generación de material para divulgación

Se generó una historieta de la serie “Meli” (de nuestro laboratorio) para público general. El material generado cuenta, guiados por un reportaje de Meli, los conceptos estudiados en la propuesta del proyecto. El fascículo se titula “Meli y las abejas perdidas”. El material generado será utilizado en diversas actividades de divulgación (ver material en Apéndice 3).

#### Conclusiones y recomendaciones

En este proyecto de ensayaron diferentes productos acaricidas suministrados por diferentes vías en ensayos tanto de laboratorio como en colmenas en cuanto a su capacidad de generar respuestas subletales a nivel de la comunicación química entre abejas adultas (hidrocarburos cuticulares y el oleato de etilo) y a nivel de la capacidad de aprendizaje y retención de aprendizajes. Las acaricidas ensayados incluyeron aceites esenciales producidos en el curso de las actividades y productos ya utilizados en apicultura, incluidos a modo de comparación.

En este sentido, en cuanto a los productos nuevos que se han ensayado, cabe señalar que, según lo reportado por otros autores, los AE con propiedades varroacidas más prometedoras son aquellos con índice de seguridad  $> 3$ , por lo que el AE de *Humulus lupulus* Var. Cascade, cuyo índice fue de 3.6 – 3.8 sería una opción viable para continuar investigando. Asimismo, el aceite esencial de *Schinus molle* presento un índice de 5, haciéndolo también prometedor (aunque ya existen reportes de intentos de desarrollos con este producto).

En cuanto a los aceites esenciales seleccionados para estudiar los efectos subletales, se determinó que la aplicación de ellos no afectó a las feromonas, como los hidrocarburos cuticulares y el oleato de etilo de las abejas. Asimismo, esta aplicación de AE no afectó la capacidad de aprendizaje y retención de aprendizajes (memoria olfativa).

En cuanto a recomendaciones sobre uso de los productos ensayados, cabe señalar que, si bien han resultado de inocuidad para las abejas en cuanto a los efectos testados, no parecen tener una ventaja comparativa con el timol, producto ya utilizado ampliamente en apicultura, y cuyo costo es bajo. Además, hay que señalar que los aceites esenciales aquí ensayados tienen un costo oneroso.

Los resultados relacionados a la detección periférica de estímulos y a la capacidad de aprendizaje y generación de memoria se obtuvieron gracias a la implementación de 2 técnicas novedosas de estudios de efectos subletales en abejas para nuestro país: la cromatografía de gases acoplada a electroantenografía (GCEAD) y el reflejo de extensión de probóscide (PER). Estas técnicas quedan ahora disponibles para todos los investigadores nacionales.

El sistema GC-EAD ya estaba operativo en nuestro laboratorio, pero no había sido puesto a punto para la abeja melífera. Generamos entonces en el curso de las actividades del proyecto mediante nuestros estudios un protocolo de uso específicamente para abejas. En cuanto al sistema de liberación automática de estímulos volátiles construido, cuenta con una bomba de pecera que impulsa el aire a través del sistema, un regulador de flujo que controla la velocidad del mismo y una serie de válvulas solenoides que controlan el sentido por donde circula el aire que cuando se setea en determinada configuración, arrastra el estímulo volátil exponiendo a la abeja a la que se le evalúa el aprendizaje asociativo. Estas válvulas y motores están controlados por una placa de Arduino (esquema en Fig.2). El sistema está configurado de manera que la exposición de la abeja al estímulo volátil sea precisa y en una cantidad definida, además de indicar el momento preciso de uso de estímulos (la Fig.3 presenta un esquema de los tiempos de exposición). Todo este ensamblaje es de fácil implementación y sus costos son mucho menores que el sistema previamente reportado en literatura y ampliamente utilizado como referencia.

Como resultado de las actividades realizadas se han generado varias presentaciones en congresos y encuentros con productores, se ha completado una tesis de maestría y se finalizará una de doctorado en 2025 (ver anexo 2 adjunto). Asimismo se encuentran en preparación 3 manuscritos.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	ARDUINO-BASED VOLATILE DELIVERY SYSTEM FOR EVALUATING HONEYBEE LEARNING AND MEMORY	Guillermo Bragunde, Gabriel González, Carmen Rossini.			En proceso
Material didáctico	Meli y las abejas perdidas	Nicolas Peruzzo Alejandro Rodríguez Juele Christian Larrama Carmen Rossini Andres Gonzalez Carolina Sosa Fedrico rodrigo Guillermo Bragunde		<a href="https://hdl.handle.net/20.500.12381/3633">https://hdl.handle.net/20.500.12381/3633</a>	Finalizado
Resumen de conferencia publicado	Xenobiotics sublethal effects on chemical communication and associative learning and peripheral olfaction of honeybees	Carmen Rossini, Guillermo Bragunde, Carolina Sosa, Andrés González		<a href="https://hdl.handle.net/20.500.12381/3634">https://hdl.handle.net/20.500.12381/3634</a>	Finalizado
Tesis de	Efecto de	Carolina	POS_FSA_2019_2_1009135	<a href="https://hdl.handle.net/20.500.12381/3632">https://hdl.handle.net/20.500.12381/3632</a>	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
maestría	productos api-sanitarios en la fisiología olfativa de <i>Apis mellifera</i>	Sosa			

## Referencias bibliográficas

- Ollerton, J., R. Winfree, S. Tarrant, How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 2011. 120(3):p.321-326.
- Klein, A.M., et al., Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society*, 2007. 274:p.303–313.
- Potts, S.G., et al., Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol*, 2010. 25(6):p.345-353.
- van Engelsdorp, D., et al., Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One*, 2009. 4(8):p.1-17.
- Le Conte, Y., M. Ellis, W. Ritter, *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 2010. 41(3):p.353-363.
- Blacquière, T., et al., Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 2012. 21(4):p.973-992.
- Chittka, L., N.E. Raine, Recognition of flowers by pollinators. *Curr Opin Plant Biol*, 2006. 9(4):p.428-35.
- Mullin, C.A., et al., High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS One*, 2010. 5(3).
- Elzen, P.J., D. Westervelt, Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida. *Am Bee J*, 2002. 142(4):p.291-292.
- Bortolotti, L., C. Costa, Chemical Communication in the Honey Bee Society, in *Neurobiology of Chemical Communication*, C. Mucignat-Caretta, Editor. 2014, CRC Press: Boca Raton (FL).
- Desneux, N., A. Decourtye, J. Delpuech, The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol*, 2007. 52:p.81-106.
- Balbuena, M.S., et al., Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J Exp Biol*, 2015. 218(17):p.2799-2805.
- Williamson, S.M., G.A. Wright, Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *J Exp Biol*, 2013. 216(10):p.1799-1807.
- Blacquiere, T., et al., Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 2012. 21(4):p.973-992.
- Goñalons, C.M., W.M. Farina, Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *J Exp Biol*, 2018. 221(7):p.jeb176644.
- Mengoni Goñalons, C.M., W.M. Farina, Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS One*, 2015. 10(10).
- Herbert, L.T., et al., Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *J Exp Biol*, 2014. 217(19):p.3457-3464.
- Dussaubat, C., et al., *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *J Chem Ecol*, 2010. 36(5):p.522-525.
- McDonnell, C.M., et al., Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecol*, 2013. 13:p.25-40.
- Alkassab, A.T., W.H. Kirchner, Sublethal exposure to neonicotinoids and related side effects on insect pollinators: honeybees, bumblebees, and solitary bees. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2017. 124(1).
- Aliouane, Y., et al., Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior. *Environ*

Toxicol Chem, 2009. 28(1):p.113-122.

22. El Hassani, A.K., et al., Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). Arch Environ Contam Toxicol, 2008. 54(4):p.653-661.
23. Gregorc, A., J.D. Ellis, Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. Pestic Biochem Physiol, 2011. 99(2):p.200-207.
24. Page Jr., R.E., et al., Extractable hydrocarbons and kin recognition in honeybee (*Apis mellifera* L.). J Chem Ecol, 1991. 17(4):p.745-756.
25. Greene, M., Cuticular hydrocarbons cues in the formation and maintenance of insect social groups, in Insect Hydrocarbons: Biology Biochemistry and Chemical Ecology, G.J. Blomquist, Editor. 2010, Cambridge University Press: Cambridge. p. 244-253.
26. Kather, R., F.P. Drijfhout, S.J. Martin, Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. J Chem Ecol, 2011. 37(2):p.205-212.
27. Le Conte, Y., A. Hefetz, Primer Pheromones in Social Hymenoptera. Annu Rev Entomol, 2008. 53:p.523-42.
28. Arredondo, D., et al., Lactobacillus kunkeei strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus* larvae and *Nosema ceranae*. Beneficial microbes, 2018. 9(2):p.279-290.
29. Kanga, L.H.B., R.R. James, D.G. Boucias, *Hirsutiella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. J Invertebr Pathol, 2002. 81(3):p.175-184.
30. Rademacher, E., M. Harz, Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies - A review. Apidologie, 2006. 37(1):p.98-120.
31. Ziegelmann, B., P. Rosenkranz, Mating disruption of the honeybee mite *Varroa destructor* under laboratory and field conditions. Chemoecology, 2014. 24(4):p.137-144.
32. Umpiérrez, M.L., et al., Essential oil from *Eupatorium buniifolium* leaves as potential varroacide. Parasitol Res, 2013. 112(10):p.3389-400.
33. Umpiérrez, M.L., et al., Plant essential oils as potential control agents of varroosis. Phytochemistry Reviews, 2011. 10(2):p.227-244.
34. Fuselli, S.R., et al., In vitro antibacterial and antiparasitic effect of citrus fruit essential oils on the honey bee pathogen *Paenibacillus* larvae and the parasitic mite *Varroa destructor*. J Apic Res, 2009. 48(1):p.77-78.
35. Ruffinengo, S.R., et al., Laboratory evaluation of *Heterothalamus alienus* essential oil against different pests of *Apis mellifera*. J Essent Oil Res, 2006. 18(6):p.704-707.
36. Eguaras, M.J., et al., An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. J Essent Oil Res, 2005. 17(3):p.336-340.
37. Ruffinengo, S., et al., LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. J Econ Entomol, 2005. 98(3):p.651-655.
38. Gashout, H.A., E. Guzman-Novoa, Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). J Apic Res, 2009. 48(4):p.263-269.
39. Kutukoglu, F., A.O. Girisgin, L. Aydin, Varroacidal efficacies of essential oils extracted from *Lavandula officinalis*, *Foeniculum vulgare*, and *Laurus nobilis* in naturally infested honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 2012. 36(5):p.554-559.
40. Ghasemi, V., S. Moharramipour, G. Tahmasbi, Biological activity of some plant essential oils against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), an ectoparasitic mite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Exp Appl Acarol, 2011. 55(2):p.147-154.
41. Maggi, M., et al., Bioactivity of *Rosmarinus officinalis* essential oils against *Apis mellifera*, *Varroa destructor* and *Paenibacillus* larvae related to the drying treatment of the plant material. Nat Prod Res, 2011. 25(4):p.397-406.
42. Flesar, J., et al., In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. Vet Microbiol, 2010. 145(1-2):p.129-133.
43. Gende, L.B., et al., Advances in the apiary control of the honeybee American Foulbrood with Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil. Bull Insectology, 2009. 62(1):p.93-97.
44. Maistrello, L., et al., Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). Apidologie, 2008. 39(4):p.436-445.

45. Porrini, M.P., et al., In vivo evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Apidologie*, 2011. 42(6):p.700-707.
46. Takeda, K., Classical conditioned response in the honey bee. *J Insect Physiol*, 1961. 6(3):p.168-179.
47. Scheiner, R., et al., Standard methods for behavioural studies of *Apis mellifera*. *J Apic Res*, 2013. 52(4).
48. Díaz, P.C., et al., Honeybee cognitive ecology in a fluctuating agricultural setting of apple and pear trees. *Behav Ecol*, 2013. 24(5):p.1058-1067.
49. Santos, E., Relevamiento de polinizadores en tres cultivos de interés comercial, in *Ecología*, Facultad de Ciencias. 2014, Universidad de la República, Uruguay. doi:
50. Twidle, A.M., et al., Kiwifruit flower odor perception and recognition by honey bees, *Apis mellifera*. *J Agric Food Chem*, 2015. 63(23):p.5597-602.
51. Abramson, C.I., et al., The effect of essential oils of sweet fennel and pignut on mortality and learning in africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *Neotrop Entomol*, 2007. 36(6):p.828-835.
52. Rehermann, G., et al., Conspecific females promote calling behavior in the noctuid moth, *P seudaletia adultera*. *Entomol Exp Appl*, 2016. 159(3):p.362-369.
53. Sellanes, C., C. Rossini, A. González, Formate analogs as antagonists of the sex pheromone of the honeydew moth, *Cryptoblabes gnidiella*: electrophysiological, behavioral and field evidence. *J Chem Ecol*, 2010. 36(11):p.1234-1240.
54. Henning, J.A., L.R. Teuber, Combined Gas Chromatography-Electroantennogram Characterization of Alfalfa Floral Volatiles Recognized by Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol*, 1992. 85(1):p.226-232.
55. Kobayashi, K., et al., Variation in floral scent compounds recognized by honeybees in Brassicaceae crop species. *Breed Sci*, 2012. 62(4):p.293-302.
56. Thiery, D., et al., Sunflower aroma detection by the honeybee. *J Chem Ecol*, 1990. 16(3):p.701-711.
57. Torto, B., et al., Standard methods for chemical ecology research in *Apis mellifera*. *J Apic Res*, 2013. 52(4):p.1-34.
58. de Jong, R., M.H. Pham-Delègue, Electroantennogram responses related to olfactory conditioning in the honey bee (*Apis mellifera ligustica*). *J Insect Physiol*, 1991. 37(4):p.319-324.
59. Wadhams, L., et al., Discrimination of oilseed rape volatiles by honey bee: novel combined gas chromatographic-electrophysiological behavioral assay. *J Chem Ecol*, 1994. 20(12):p.3221-3231.
60. Tricoire-Leignel, H., et al., Pest insect olfaction in an insecticide-contaminated environment: info-disruption or hormesis effect. *Frontiers in physiology*, 2012. 3:p.58.
61. Rossini, C., et al., Sub-lethal effects of the consumption of *Eupatorium buniifolium* essential oil in honeybees. *PLoS One*, 2020. 15(11):p.e0241666.
62. Lindberg, C.M., A.P. Melathopoulos, M.L. Winston, Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *J Econ Entomol*, 2000. 93(2):p.189-98.
63. Olsson, S.B., B.S. Hansson, Electroantennogram and single sensillum recording in insect antennae. *Methods in Molecular Biology*, 2013. 1068:p.157-177.
64. Schiestl, F.P., E. Marion-Poll, Detection of physiologically active flower volatiles using gas chromatography coupled with electroantennography, in *Analysis of Taste and Aroma Molecular Methods of Plant Analysis*, J.F. Jackson and H.F. Linskens, Editors. 2002, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 173-198.
65. Knudsen, J.T., et al., Diversity and Distribution of Floral Scent. *The Botanical Review*, 2006. 72(1):p.1-120.
66. Reinhard, J., M.V. Srinivasan, The Role of Scents in Honey Bee Foraging and Recruitment, in *Food exploitation by Social Insects: An Ecological, Behavioral, and Theoretical Approach*, S. Jarau and M. Hrncir, Editors. 2009, CRC-Press Boca Raton. p. 165-182.
67. Anfora, G., et al., Behavioural and electrophysiological lateralization in a social (*Apis mellifera*) but not in a non-social (*Osmia cornuta*) species of bee. *Behavioural Brain Research*, 2010. 206(2):p.236-239.
68. Rachersberger, M., et al., Honeybee Pollinators Use Visual and Floral Scent Cues to Find Apple (*Malus domestica*) Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019. 67(48):p.13221-13227.
69. Mas, F., et al., Selection of key floral scent compounds from fruit and vegetable crops by honey bees depends on sensory capacity and experience. *Journal of Insect Physiology*, 2020. 121:p.104002.
70. Henning, J.A., L.R. Teuber, Combined Gas Chromatography-Electroantennogram alfalfa floral volatiles. *Entomological Society of America*, 1992. 85(1):p.226-232.
71. Lim, S., et al., Abdominal contact of fluvalinate induces olfactory deficit in *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020. 164:p.221-227.

72. Mengoni Gonalons, C., W.M. Farina, Effects of sublethal doses of Imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS One*, 2015. 10(10):p.e0140814.
73. Porrini, M.P., et al., Effects of synthetic acaricides and *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) on molecules associated with chemical communication and recognition in honey bees. *Veterinary Sciences*, 2020. 7(4):p.1-18.
74. Wadhams, L.J., et al., Discrimination of oilseed rape volatiles by honey bee: Novel combined gas chromatographic-electrophysiological behavioral assay. *Journal of Chemical Ecology*, 1994. 20(12):p.3221-31.
75. Mena Granero, A., et al., Analysis of biogenic volatile organic compounds in zucchini flowers: identification of scent sources. *Journal of Chemical Ecology*, 2005. 31(10):p.2309-2322.
76. Thiery, D., et al., Sunflower aroma detection by the honeybee : Study by coupling gas chromatography and electroantennography. *J Chem Ecol*, 1990. 16(3):p.701-711.
77. Claudianos, C., et al., Odor memories regulate olfactory receptor expression in the sensory periphery. *Eur J Neurosci*, 2014. 39(10):p.1642-1654.

#### **Licenciamiento**

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

