

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**INFLUENCIA DEL POLEN NATIVO EN EL SISTEMA INMUNE DE LAS ABEJAS
(*APIS MELLIFERA* L.) Y LA RESPUESTA FRENTE A LA INFECCION DEL
VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS**

POR

Melany Verónica González Vásquez

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE
2023**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**INFLUENCIA DEL POLEN NATIVO EN EL SISTEMA INMUNE DE LAS ABEJAS
(*APIS MELLIFERA* L.) Y LA RESPUESTA FRENTE A LA INFECCION DEL
VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS**

POR

Melany Verónica González Vásquez

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN-CHILE
2023**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Marisol Vargas C.
Ing. Agrónomo, Dr.

Guía

Profesor Asociado, María López B.
Dr. Química, Mg.

Asesor

Profesor Asociado, Nelson Zapata S. M.
Ing. Agrónomo, Dr.

Asesor

Profesor, Nolberto Arismendi S. .
Ing. Agrónomo, Mg. Cs. Dr. Cs. Agr.

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells
Moncada.
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

Decano

RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el proyecto Fondecyt Regular N° 1171781 titulado “Chilean Deformed Wing Virus (DWV) population diversity related to the management of *Varroa destructor* and studies how the native pollen interferes with viral transmission in honey bee”.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	2
Materiales y Métodos.....	5
Resultados y Discusión.....	9
Conclusiones.....	17
Referencias.....	18
Anexos.....	25

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Sobrevivencia de abejas sanas e inoculadas con DWV en condiciones controladas. Cada curva representa abejas expuestas a los tratamientos.....	10
Figura 2 Consumo promedio de polen en abeja (en base peso seco).	11
Figura 3 Carga viral en las abejas melíferas infectadas con DWV y alimentadas con pólenes nativos y no nativos, medidos a 0, 5, 10, 15 y 20 días después.....	13
Figura 4 Expresión relativa del gen codificante para el péptido antimicrobiano defensina evaluado a las 0, 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación en abejas.....	14
Figura 5 Expresión relativa del gen codificante para el péptido antimicrobiano abaecina evaluado a las 0, 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación en abejas sanas.....	15
Figura 6 Expresión relativa del gen codificante para el péptido antimicrobiano himenoptaecina evaluado a las 0, 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación en: abejas.....	16
Tabla 1 Lista de partidores específicos utilizados en el análisis de qPCR.	8

INFLUENCIA DEL POLEN NATIVO EN EL SISTEMA INMUNE DE LAS ABEJAS (*APIS MELLIFERA* L.) Y LA RESPUESTA FRENTE A LA INFECCION DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV)

INFLUENCE OF NATIVE POLLEN ON THE IMMUNE SYSTEM OF BEES (*APIS MELLIFERA* L.) AND THE RESPONSE TO DEFORMED WINGS VIRUS INFECTION (DWV)

Palabras índice adicionales: abaecina, defensina, hymenoptaecina, polen monofloral nativo, abejas melíferas.

RESUMEN

La abeja melífera (*Apis mellifera* L.) es un polinizador vital para todo el ecosistema, por lo que es de suma importancia su cuidado. Los parásitos y agentes patógenos de la abeja de la miel son factores claves que subyacen en la pérdida de colonias y ponen en riesgo la industria de la apicultura y la agricultura en su conjunto. Para controlar la propagación y desarrollo de enfermedades dentro de la colonia, las abejas poseen un sistema inmune innato que incluye barreras físicas, respuestas celulares y humorales. Pero también, utilizan resinas de las plantas con actividad antimicrobiana que pueden controlar enfermedades dentro de la colonia. La conexión entre nutrición e inmunidad se ha demostrado en numerosos organismos, donde la función inmune se ve afectada por la restricción calórica. Para observar la influencia del polen en la salud de las abejas, se inocularon abejas con el virus de las alas deformadas y fueron expuestas a diferentes pólenes nativos chilenos y no nativos, suministrados a las abejas como dieta. El polen nativo de maitén y el polen polifloral, incrementaron la sobrevivencia, además, de aumentar la expresión de péptidos antimicrobianos (defensina, abaecina y hymenoptaecina), en comparación con el polen no nativo (eucaliptus), el cual disminuyó la sobrevivencia y la expresión de los péptidos antimicrobianos.

SUMMARY

The honey bee (*Apis mellifera* L.) is a vital pollinator for the entire ecosystem, so its care is of the utmost importance. The parasites and pathogens of the honey bee are key factors underlying the loss of colonies and put the beekeeping industry and agriculture as a whole at risk. To control the spread and development of diseases within the colony, bees possess an innate immune system that includes physical barriers, cellular and humoral responses. But they also use plant resins with antimicrobial activity that can control diseases within the colony. The connection between nutrition and immunity has been demonstrated in numerous organisms, where immune function is affected by caloric restriction. To observe the influence of pollen on the health of bees, bees were inoculated with the deformed wing virus and were exposed to different native Chilean and non-native pollens, supplied to the bees as a diet. Where favorable results were obtained with some treatments, such as native maitén pollen and polyfloral pollen, which increased survival, in addition to increasing the expression of antimicrobial peptides (defensin, Abaecin and hymenoptaecin), compared to non-native pollen, the which decreased survival and expression of these.

INTRODUCCIÓN

Las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) son integrantes claves para la polinización de los cultivos y plantas silvestres en todo el mundo (Gallai *et al.*, 2009), desempeñando un papel fundamental para la conservación de la diversidad y la agricultura sustentable (Klein *et al.*, 2007). Estos insectos son considerados el principal agente polinizador (Aizen y Harder, 2009; Garibaldi *et al.*, 2013; Breeze *et al.*, 2014) De hecho, más del 70 % de los cultivos en el mundo utilizan a los polinizadores para aumentar la cantidad y calidad de frutos (Potts *et al.*, 2016), mejorar el tamaño, la vida útil y el valor comercial (intensidad de color y uniformidad) (Klatt *et al.*, 2014).

En Chile, el desarrollo de la actividad apícola se extiende por todo el país, excepto en las regiones más australes (Velis *et al.*, 2009). La apicultura se ha convertido en una actividad de gran relevancia, ya que las abejas entregan servicios de producción de miel, cera y otros productos naturales (Delaplane y Mayer, 2004).

Según la información extraída del SIPEC apícola, al 7 de Mayo de 2022, el número de apicultores a nivel nacional corresponde a un total de 9.598, concentrados en las regiones del Maule (1.628), Araucanía (1668), O'Higgins (1.111) y Biobío (1137). Respecto a las principales actividades del rubro apícola, la producción de miel es la más importante, alcanzando un 97,98 % de apicultores que se dedican a esta actividad, seguidos por la polinización con un 25,73 % y venta de material vivo con un 16,27 % (SAG, 2022).

La salud de las abejas ha recibido recientemente una atención considerable, debido a que en los últimos años se ha informado sobre una creciente disminución de polinizadores, principalmente de *A. mellifera* (Verde, 2011). En Estados Unidos, el 30 % de las colmenas de abejas se pierden cada invierno y casi el 50 % de las colmenas se sustituyen cada año, lo que ha causado intensas presiones económicas sobre los apicultores y agricultores (Steinhauer *et al.*, 2014). Una fracción de estas pérdidas se atribuyen al desorden del colapso de las colonias (CCD) (VanEngelsdorp *et al.*, 2009; VanEngelsdorp *et al.*, 2012; Spleen *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*, 2014.), el cual implica la migración y el despoblamiento de las abejas en una colmena (Higes *et al.*, 2009). Se señalan múltiples causas de la pérdida de las abejas, las que incluyen pesticidas, agentes patógenos, y los cambios de uso del suelo que reducen la calidad del forraje (vanEngelsdorp *et al.*, 2009).

Apis mellifera es comúnmente afectada por múltiples virus, quienes han sido reconocidos como posibles responsables de la pérdida de las colmenas (Chen *et al.*, 2006; Higes *et al.*, 2007; Maori *et al.*, 2007; Tantillo *et al.*, 2015; Carrillo-Trip *et al.*, 2016). Se han identificado unos 24 virus en todo el mundo (De Miranda *et al.*, 2013). Entre los más comunes e importantes se encuentra el Virus de las alas deformadas (DWV) (De Miranda y Genersch 2010), el cual pertenece al género iflavirus y puede provocar síntomas tales como deformidades de las alas, hinchazón abdominal, parálisis y una rápida mortalidad de abejas adultas emergentes (Lanzi *et al.*, 2006). Este virus se transmite horizontalmente de abeja a abeja, o verticalmente, ya que el virus infecta los tejidos ováricos de la reina y se diseminan en los huevos en desarrollo antes de la ovoposición (Chen *et al.*, 2006). La virulencia del virus se ve incrementada tanto por la presencia del ácaro *Varroa destructor*

como *Tropilaelaps*, quienes son los vectores más conocidos (Yue y Genersch, 2005; Dainat *et al.*, 2009; De Miranda y Genersch, 2010; Khongphinitbunjong *et al.*, 2015).

Sin embargo, también existen pérdidas de colonias asociadas a la nutrición. Para las abejas melíferas encontrar recursos para satisfacer las necesidades nutricionales estacionales es crucial para su salud y supervivencia (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2018). La dieta de estas (y la mayoría de las especies de abejas) consiste en néctar y polen; gracias a su composición rica en azúcar, el néctar es la principal fuente de energía (Vaudo *et al.*, 2015), mientras que el polen suministra aminoácidos esenciales (arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano y valina), vitaminas, lípidos y micronutrientes (De Groot, 1953). Además de estos macro y micronutrientes, el néctar y polen son ricos en diversos fitoquímicos que incluyen alcaloides, compuestos fenólicos, y terpenoides (Dobson, 1988, Adler, 2001, Heil, 2011, Negri *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos son responsables de la actividad biológica del polen, cuya composición cuantitativa y cualitativa está fuertemente relacionada con el origen botánico (Kaš Konien *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018).

Existen especies de plantas nativas chilenas que han sido utilizadas por su actividad antimicrobiana contra patógenos humanos (Shene *et al.*, 2009; Rubilar *et al.*, 2010; Romanucci *et al.*, 2016) y son ampliamente utilizadas en la agricultura y la silvicultura chilena. Ejemplos de ellos son el Maitén (*Maytenus boaria*), Quillay (*Quillaja saponaria*) y Peumo (*Cryptocarya alba*). El maitén, es usado en infusiones para bajar la fiebre, tratar el resfrío y el dolor de estómago. Al mismo tiempo, es una importante especie forestal y forrajera; de gran interés agronómico por su uso potencial en insecticidas naturales (Minsal, 2009). El Peumo, también tiene diversos usos, uno de ellos es el consumo de sus frutos porque presentan principios antioxidantes. Sus hojas se utilizan como infusión en enfermedades hepáticas (Montes, 1987), en hemorragias y reumatismos (Vogel *et al.*, 2008). Las propiedades medicinales de esta planta se pueden manifestar por la presencia de tanino, que posee cualidades astringentes, y por el aceite esencial que contienen (Chung *et al.*, 2017).

El sistema inmune, es importante para la supervivencia de *A. mellifera* al igual

que para todos los animales; las abejas poseen un sistema inmune innato que incluye barreras físicas, respuestas celulares y humorales. Entre las defensas físicas se incluyen la cutícula y capas epiteliales que en muchos casos impiden que los microbios se adhieran o entren en el cuerpo, defensas fisiológicas que pueden producir cambios en el pH y otras condiciones químicas del intestino de las abejas para combatir la invasión microbiana (Crailsheim y Riessberger-Galle, 2001). De esta manera las barreras físicas, sumado a los mecanismos de defensa humoral y diferentes procesos celulares, constituyen en conjunto y en forma coordinada, una poderosa herramienta que permite eliminar parásitos, agentes patógenos y xenobióticos. Por otra parte, uno de los principales componentes de la respuesta inmune humoral desarrollada por los insectos para eliminar patógenos invasores, es la rápida y masiva producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) (Hoffmann *et al.*, 1999). Los AMPs son pequeñas proteínas altamente conservadas, generalmente de tipo catiónico y menores a 100 aminoácidos de longitud que a menudo son sintetizados en el tejido adiposo corporal. Una vez sintetizados, los AMPs son secretados en la hemolinfa desde donde pueden fácilmente difundirse para actuar a lo largo de todo el insecto (Bulet y Stöcklin, 2005). En *A. mellifera* se han descrito cuatro familias de AMPs: apidaecina, abaecina, himenoptaecina y defensinas (Yi *et al.*, 2014), los que muestran un amplio espectro de actividad contra microorganismos (Chaimanee *et al.*, 2012). Dado los antecedentes expuestos el objetivo de este estudio fue evaluar la influencia que tiene la ingesta de polen de especies nativas chilenas sobre la sobrevivencia, el sistema inmune de las abejas y la reducción de la carga del Virus de las alas deformadas (DWV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de polen y análisis palinológico.

El polen fue recolectado en época de floración con trampas de polen dispuestas en la entrada de la colmena. Un primer grupo de colectores fue ubicado en el huerto orgánico de arándanos de la estación experimental el nogal, Universidad de Concepción, Chillán (36°35'48.0"S 72°05'10.5"W). Un segundo grupo de colectores se instaló en el sector el Carmen pre cordillera de Ñuble, (36°53'51.58"

S72°01'30.46" O) aledaña a bosques nativos, donde predomina el avellano chileno (*Gevuina avellana*) y maitén (*Maytenus boaria*). El material fue retirado de las trampas, se conservó a 4 °C hasta su uso para los ensayos biológicos. Al mismo tiempo se tomó una muestra de cada polen, las que fueron enviadas al laboratorio de la Universidad Austral de Chile para la realización de un análisis palinológico.

Ensayo en condiciones controladas

Previo a realizar el ensayo, todas las colonias fueron analizadas para determinar el estado sanitario.

Preparación del inóculo

Para los tratamientos en cuyo caso fue necesario inocular con DWV, el aislado del virus se obtuvo de colonias sintomáticas. Se escogieron 10 abejas al azar y fueron trituradas y homogenizadas en una bolsa Stomacher con 10 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X) durante 120 s a alta velocidad en un Stomacher 80 Lab Blender (Seward, Londres, Reino Unido). Las muestras fueron centrifugadas dos veces a 1500 g durante 10 min, seguido de 10.000 g durante 10 min, ambos a 4 ° C. del sobrenadante se usaron 200 µL para la cuantificación del título viral y el resto fue semi purificado para luego inocular oralmente a las abejas.

Influencia de la ingesta de polen nativo en abejas infectadas con DWV.

Para evaluar la influencia de la ingesta de polen nativo sobre la sobrevivencia, carga viral e inmunidad en abejas inoculadas con el virus de las alas deformadas, se retiraron marcos con crías de abejas obreras de colonias sanas ubicadas en el campo experimental El Nogal, Universidad de Concepción, Chillán. Los marcos con crías fueron mantenidos en condiciones controladas (30 °C con 50-60 % de HR), y de estos, posteriormente se colectaron las abejas recién emergidas (1-2 días de edad) para realizar los bioensayos. El inóculo del virus fue mezclado con jarabe de sacarosa al 60 % (Arismendi *et al.*, 2018). En el tratamiento control, las abejas fueron alimentadas con jarabe, aquellas abejas que no consumieron la totalidad de la solución fueron descartadas del ensayo. Finalmente, las abejas inoculadas con el virus y las no inoculadas fueron depositadas en jaulas plásticas (1000 cc), cada jaula contenía 70 abejas/tratamiento, correspondiendo a la unidad experimental. En cada unidad experimental se colocaron 6 gramos de polen de acuerdo a los

siguientes tratamientos: (1) Monofloral nativo, (2) Monofloral no nativo, (3) polifloral, (4) Polen sustituto, (5) Monofloral nativo+ DWV, (6) Monofloral no nativo+DWV, (7) polifloral+DWV y (8) Polen sustituto+DWV con 4 repeticiones por tratamiento. La composición del polen y del polen sustituto se describe en el Anexo. Las abejas muertas de cada jaula fueron retiradas y contadas periódicamente, lo cual permitió establecer la sobrevivencia hasta los 20 días. Al mismo tiempo, se retiraron 5 abejas luego de 2 horas (tiempo 0) y a los 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación para evaluar la expresión de los péptidos antimicrobianos del sistema inmune de las abejas, defensina, abaecina, apidaecina, himenoptaecina. El consumo promedio de polen, se midió pesando el polen al inicio del experimento y al término de este.

Aislamiento de ácidos nucleicos, síntesis de cDNA y carga viral.

Para determinar la carga del virus de las alas deformadas en abejas inoculadas y no inoculadas, tratadas con polen nativo y no nativo, y la expresión de genes asociados al sistema inmune, se utilizó las abejas extraídas por jaula (cinco abejas por muestra), para luego ser trituradas y homogenizadas en un mortero esterilizado con 5 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X). Se realizó la extracción de ARN de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el Kit I de ARN total de EZNA (Omega Bio-Tek, Norcross, Georgia, EE. UU.). El ARN extraído se utilizó para la síntesis cDNA de mediante la enzima transcriptasa inversa M-MLV de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.). Las muestras de cADN se mantuvieron a -20 °C hasta que se llevó a cabo el análisis por qPCR.

PCR en tiempo real

La cuantificación de la carga viral y la expresión de genes asociados al sistema inmune se realizó por PCR en tiempo real en un termociclador Agilent Technologies, Mx 3000P EE. UU. Para la detección del virus, se utilizaron partidores específicos (Tabla 1). En los tubos de PCR se preparó una mezcla que contenía 2 µL de cDNA, 5 µL de agua libre de RNAsas, 0,5 µL de cada partidor y 7 µL de SBYR Green master mix (Gene X-Press, EE.UU.). Posterior a ello, para la normalización de los resultados, se utilizaron los partidores para el gen endógeno β -Actina-F 5'-ATG CCA ACA CTG TCC TTT CTG G-3' y β -Actina-R 5'-GAC CCA CCA ATC CAT ACG

GA-3', los cuales amplifican un fragmento de 148 pb (Yang y Cox-Foster, 2005). El programa de ciclos de la PCR se llevó a cabo en los siguientes tiempos: 95 °C durante 15 min; luego se realizaron 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 15 seg. y 72 °C por 15 seg. (Luong *et al.*, 2015; Simeunović *et al.*, 2014)

Tabla. 1: Lista de partidores específicos utilizados en el análisis de qPCR

Primer	Primers (5' → 3')	Referencia
DWV-F	CTGTATGTGGTGTGCCTGGT	Kukielka <i>et al.</i> , 2008
DWV-R	TTCAACAATCCGTGAATSTAGTGT	
Abaecin-F	CAGCATTCGCATACGTACCA	Evans, 2006
Abaecin-R	GACCAGGAAACGTTGGAAAC	
Defensin-F	TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	Yang y Cox-Foster, 2005
Defensin-R	TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	
B-actin-F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	Yang y Cox-Foster, 2005
B-actin-R	GACCCACCAATCCATACGGA	

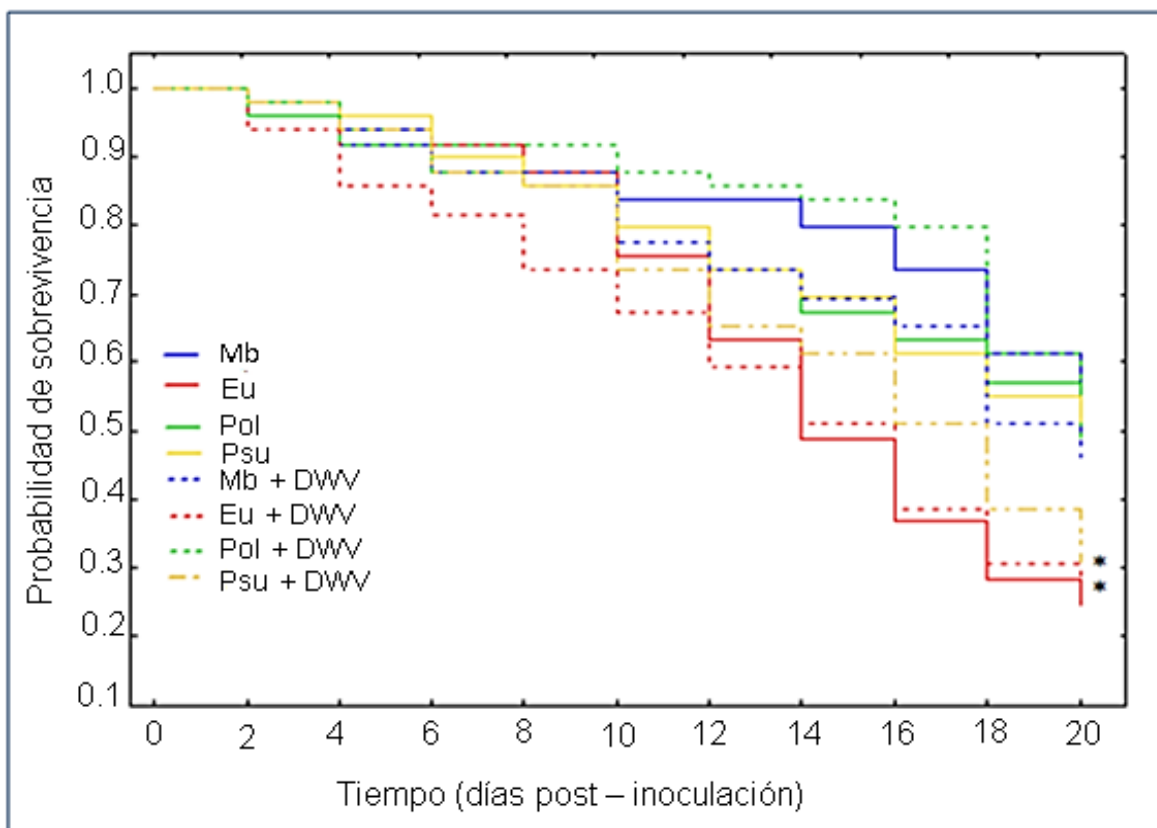
Análisis estadístico

La sobrevivencia en el tiempo de abejas infectadas y sanas fue analizada por un análisis de varianza (ANDEVA) de medidas repetitivas en el tiempo. La separación de medias *a posteriori* se realizó con un test de Dunnett ($p < 0,05$) para comparar abejas infectadas con respecto al tratamiento control (abejas sanas). Para determinar diferencias entre las cargas de *DWV* en abejas sanas e infectadas a las 2 horas y a los 5, 10 y 15 días post-inoculación, se realizó un análisis no paramétrico con test de Mann-Whitney ($p < 0,05$), considerando que estas variables de respuestas (carga parasitaria) no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianza. Además, para la curva de sobrevivencia se utilizó el estimador de Kaplan-Meier, considerando las abejas obreras vivas observadas al final del experimento como datos censurados. Las diferencias entre las curvas de supervivencia se estimaron utilizando log-rank pruebas ($\alpha = 0.05$) y los valores se corrigieron con el método de Holm-Bonferroni (Holm, 1979).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sobrevivencia de las abejas inoculadas con DWV y no inoculadas, expuestas a los tratamientos polen Monofloral nativo (Mb), polen Monofloral no nativo (Eu), polen polifloral (Pol), Polen sustituto (Psu), medida hasta los 20 días post-inoculación, presentó diferencias estadísticas significativas en función a los puntos de muestreo en el tiempo (ANDEVA) medidas repetidas, Tratamiento*Tiempo $F_{27/108} = 5,58$; $p < 0.001$). En este sentido, las abejas expuestas a los tratamientos Mb+DWV, Pol+DWV y Psu+DWV mostraron un mayor porcentaje de sobrevivencia a los 20 días post- inoculación (dpi), presentando un 50 %, 55 %, 45 % respectivamente. A diferencia, de aquellas abejas tratadas con polen Eu+DWV, en cuyo caso, la sobrevivencia a los 20 dpi no sobrepasó el 30 % (Figura 1). Por otra parte, se observó un comportamiento similar en las abejas tratadas con polen Eu; donde la sobrevivencia al final del ensayo no sobrepasó el 25 % (20 dpi), siendo significativamente menor que aquellas abejas que fueron expuestas a los tratamientos Mb (70 %), Pol (60 %) y Psu (50 %) (Figura 1). Estos resultados demuestran que la sobrevivencia disminuye significativamente para las abejas expuestas al tratamiento Eu. Un estudio realizado en Uruguay analizó el contenido de proteína cruda del polen de *Eucalyptus* spp. donde se observó que este presenta menos del 20 % de proteína cruda, estando bajo los niveles sugerido por Kleinschmidt y Kondos (1976) para una aceptable nutrición de las abejas. Además, se observó que aquellas colonias alimentadas solo con polen de *Eucalyptus* suelen presentar cuadros agudos de Nosemosis, enfermedad del sistema digestivo de las abejas causada por los hongos microsporidios *Nosema apis* y *N. ceranae* (Santos *et al.*, 2005). En contraste, en colonias que contaban con reservas de polen de diferente origen botánico, las abejas presentaban más proteína corporal y menor infección con *Nosema*.

Figura1. Sobrevivencia de abejas sanas e inoculadas con DWV en condiciones controladas. Cada curva representa abejas expuestas a los tratamientos: *M. boaria* (Mb), *E. globolus* (Eu), polifloral (Pol) y el sustituto de polen (PSU) con o sin DWV.



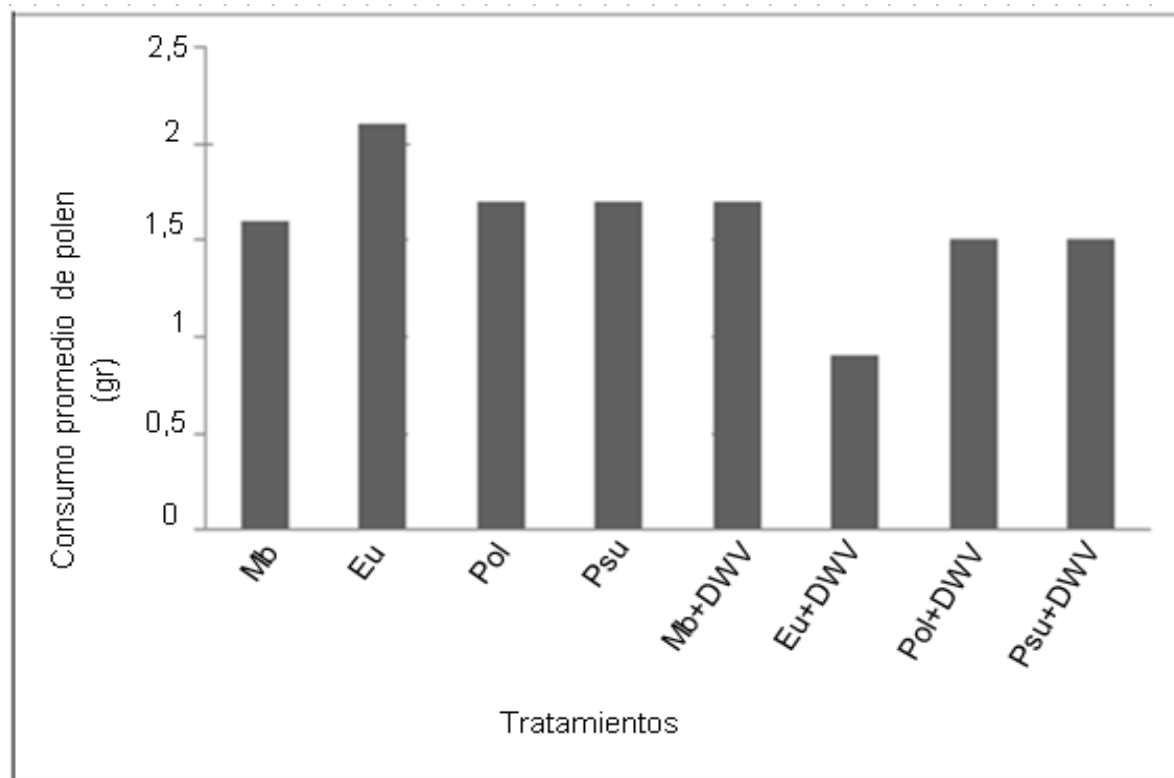
Los asteriscos indican diferencias significativas (prueba de rango logarítmico, $p < 0,05$) entre tratamientos con respecto al control (sustituto de polen).

Entonces, independientemente del contenido de proteína cruda, la disponibilidad de polen de variado origen botánico puede mejorar la nutrición de las abejas. Stace (1996) encontró que los pólenes de la mayoría de las especies de eucaliptos en Australia son deficientes en el aminoácido esencial isoleucina, no alcanzando a cubrir la demanda mínima de las abejas (4 %). Esto explicaría por qué la supervivencia en el tratamiento Eu fue tan baja. Por lo tanto, una buena fuente de alimentación de diferente origen botánico rica en aminoácidos y proteínas contribuiría con la supervivencia de las abejas, como se vio reflejada en los tratamientos de polen nativo (Mb) y polifloral (Pol) los que mejoraron significativamente la supervivencia en las abejas infectadas con el virus de las alas deformadas (Figura 1).

Se observó que el consumo de las abejas inoculadas con DWV y no inoculadas fue variable para cada tratamiento (Figura 2). Las abejas inoculadas no consumieron

menores cantidades de polen en comparación a las no inoculadas, lo que demuestra que la infección del virus no afecta el consumo de polen, a excepción del tratamiento Eu + DWV, donde, se observó un menor consumo de polen (Figura 2).

Figura 2. Consumo promedio de polen en abeja (en base peso seco).



Las barras representan el consumo de las abejas sanas e infectadas con el DWV en cada uno de los siguientes tratamientos: Mb: *Maytenus boaria*, Eu: *Eucalyptus globulus*, Pol: polifloral y Psu: polen sustituto.

El polen es un componente esencial en la dieta de las abejas melíferas, es químicamente complejo, sirve como la fuente primaria de proteínas y lípidos, mientras que proporciona vitaminas, minerales, flavonoides y otros (Campos *et al.*, 2008). Los diferentes componentes nutricionales del polen confieren diversas propiedades terapéuticas muy valiosas, capaces de combatir enfermedades y patógenos (Denisow y Denisow-Pietrzyk, 2016; Kieliszek *et al.*, 2017). La carencia o el bajo valor nutritivo de este determinan que las abejas sean más débiles, generalmente más pequeñas, con poca capacidad de alimentar a la cría y con una expectativa de vida menor (De Groot, 1953; Haydak, 1970; Winston, 1987; Crailsheim *et al.*, 1992; Herbert, 1992; Keller *et al.*, 2005). Estudios especulan que

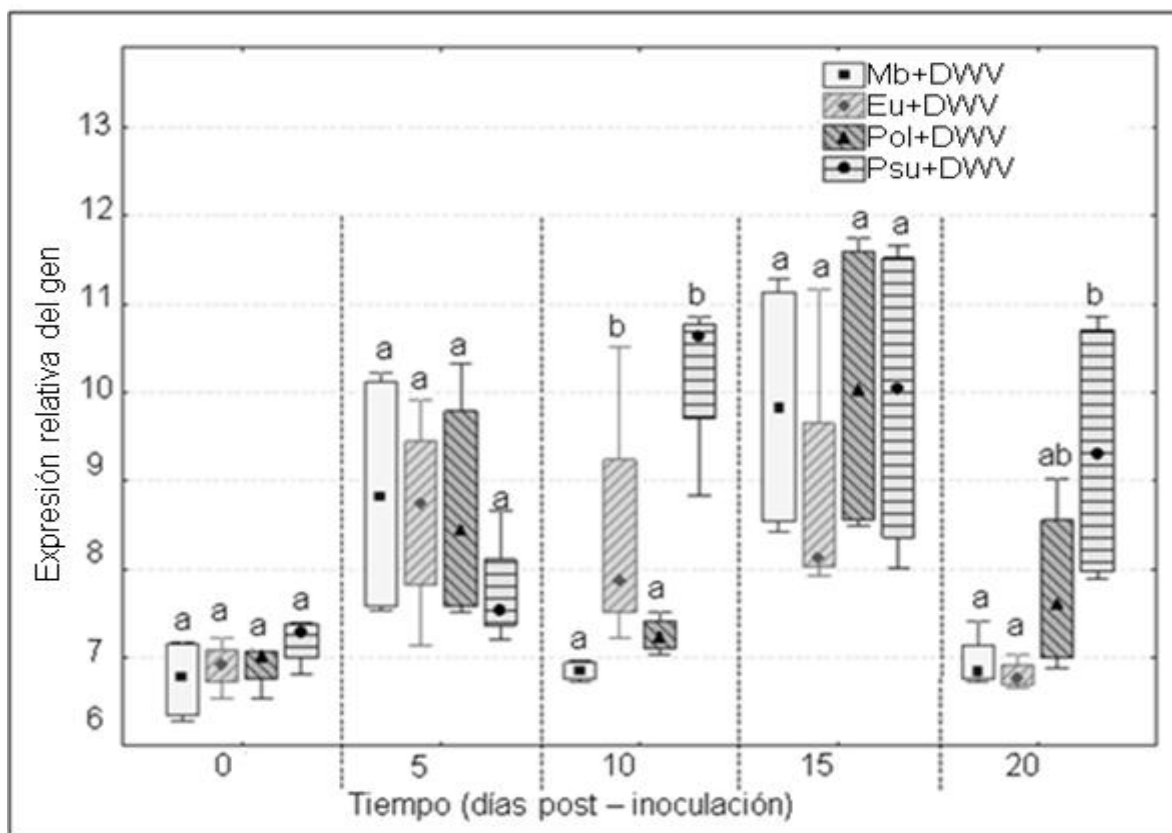
una cantidad estándar de polen permite a la abeja obtener una cantidad suficiente de los principios activos contenidos en este para contrarrestar los efectos perjudiciales del virus (Annoscia *et al.*, 2017.)

La carga del virus DWV por abeja fue variable de acuerdo a los periodos medidos, observándose diferencias significativas después de los 10 dpi, donde los tratamientos Mb+DWV y Pol+DWV redujeron significativamente la carga viral en las abejas en comparación con el tratamiento control (Psu+DWV) (Figura 3). A diferencia de esto, en el tratamiento Eu+DWV se observó el doble de la carga inicial del virus por abeja y tuvo niveles similares al control Psu+DWV (Figura 3). No obstante, aquello, se demostró que a los 20 dpi la carga del virus disminuyó significativamente para los tratamientos Eu+ DWV y Mb+DWV en comparación con el control (Psu+DWV) (Figura 3).

Al exponer a obreras de *A. mellifera* a la infección del patógeno virus de las alas deformadas (DWV), la expresión de los péptidos antimicrobianos (defensina, abaecina e himenoptaecina) se vio alterado en comparación con el tratamiento control (Figura 4, 5 y 6).

En el caso de la expresión de defensina, no se observan diferencias significativas entre tratamiento durante los primeros 5 dpi. Pero esta situación cambia, a los 10 dpi se observan diferencias significativas para aquellas abejas expuestas al tratamiento de polen monofloral nativo (Mb), donde las abejas inoculadas (Mb+DWV) disminuyen la expresión del gen (Figura 4).

Figura 3. Carga viral en las abejas melíferas infectadas con DWV y alimentadas con pólenes nativos y no nativos, medidos a 0, 5, 10, 15 y 20 días después de la inoculación.



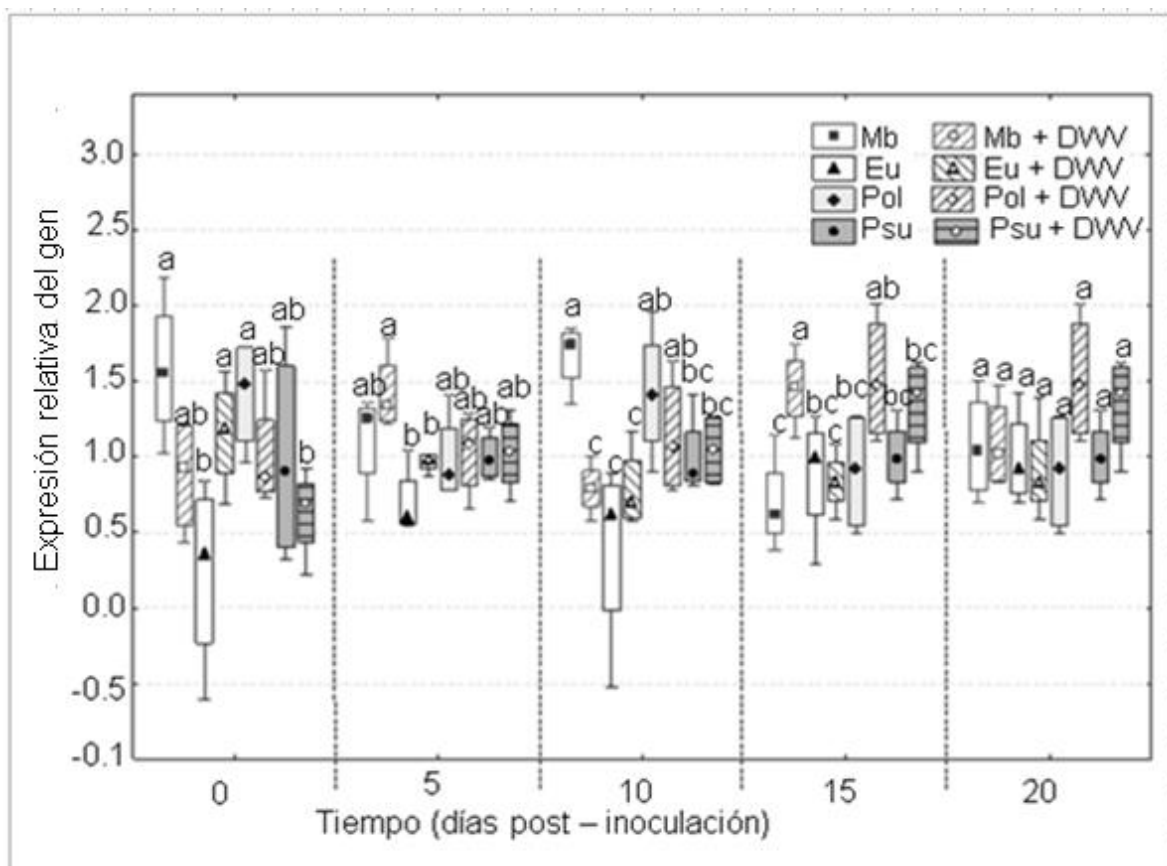
Punto: Mediana; Caja: 25 % - 75%. Letras diferentes indican diferencia estadística establecido en post-hoc, comparaciones múltiples filas de medias para todos los grupos después de la prueba de Kruskal-Wallis ($H p < 0,05$)

Mb: *Maytenus boaria*, Eu: *Eucalyptus globulus*, Pol: polifloral y Psu: polen sustituto.

Sin embargo, al 15 dpi se produjo un aumento significativo en las abejas expuestas a los tratamientos Mb+DWV y Pol+DWV, a diferencia del tratamiento Eu+DWV el cual disminuyó la expresión de defensina mientras que el tratamiento Psu+DWV mantuvo la expresión del gen (Figura 4).

En cuanto a la expresión del gen codificante para abaecina, se observa al día 5 post-inoculación (pi) diferencias significativas entre los tratamientos, donde en las abejas expuestas al tratamiento Pol+DWV aumentó la expresión de abaecina en comparación con aquellas abejas no inoculadas y expuestas al tratamiento Pol (Figura 5).

Figura 4. Expresión relativa del gen codificante para el péptido antimicrobianodefensina evaluado a las 0, 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación en abejas sanas e inoculadas con el virus de las alas deformadas (DWV) y alimentadas con pólenes nativos.



Mediana; Caja: 25 % - 75 %; Bigotes: Min- Max.

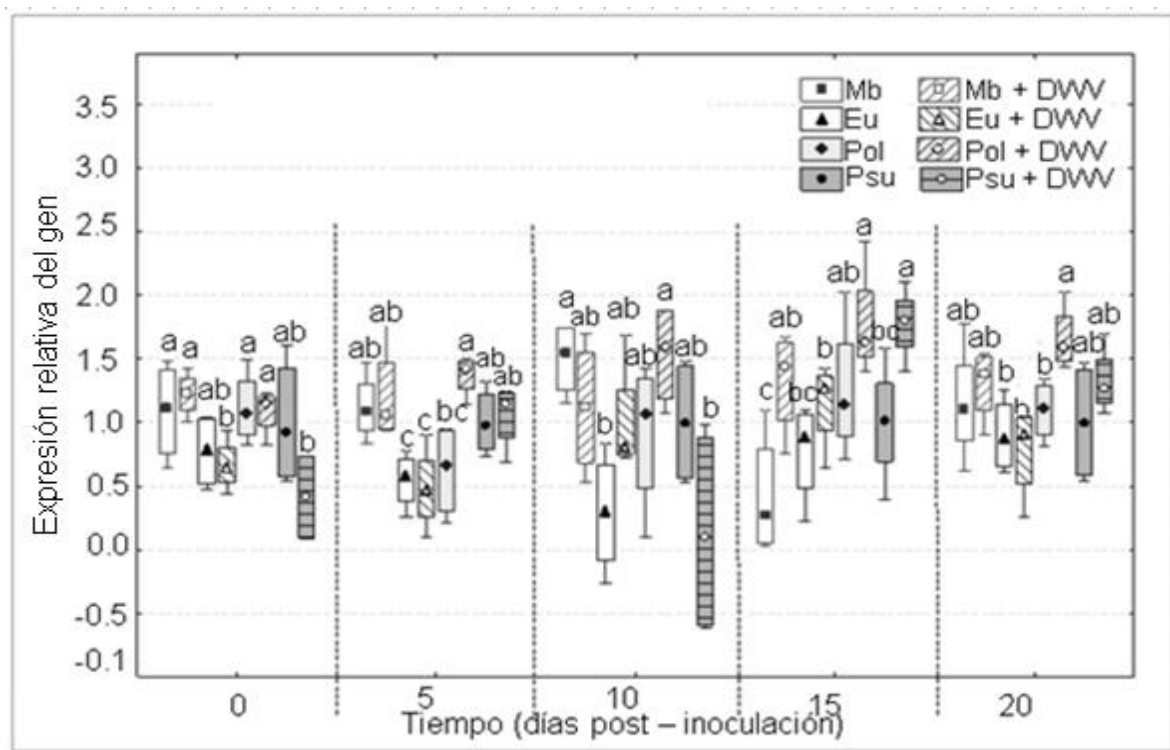
Mb: *Maytenus boaria*, Eu: *Eucalyptus globulus*, Pol: polifloral y Psu: polen sustituto.

Al día 15 pi, se aprecia que la expresión de este gen aumenta para las abejas expuestas a los tratamientos Mb+DWV y Psu+DWV. Sin embargo, a los 20 dpi solo presentó diferencias significativas en aquellas abejas que fueron expuestas al tratamiento Pol+DWV, donde se aprecia un aumento significativo en la expresión abaecina. Siendo este último quien tuvo los mejores resultados a lo largo del ensayo (Figura 5).

Por otro lado, la expresión del gen codificante para himenoptaecina sólo presentó diferencias entre los 0 y 10 dpi, para algunos tratamientos. A los 0 dpi, se observó un aumento significativo en la expresión del gen en aquellas abejas inoculadas y expuestas al tratamiento Eu+DWV y Pol+DWV en comparación con aquellas no inoculadas y expuestas al mismo tratamiento (Eu y Pol), donde la expresión de himenoptaecina disminuye el doble (Figura 6). Al día 5 dpi, se mantiene el aumento

del gen en aquellas abejas inoculadas y expuestas al tratamiento Pol+DWV en comparación con aquellas no inoculadas (Pol), mientras que los demás tratamientos mantuvieron la expresión del gen (Figura 6). Por otra parte, al día 10 dpi esta situación cambia y aquellas abejas expuestas al tratamiento Mb+DWV disminuyen considerablemente la expresión de himenoptaecina, mientras que los tratamientos Eu+DWV, Pol+DWV y Psu+DWV mantuvieron la expresión (Figura 6).

Figura 5. Expresión relativa del gen codificante para el péptido antimicrobiano abaecina evaluado a las 0, 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación en abejas sanas e inoculadas con DWV y alimentadas con pólenes nativos.

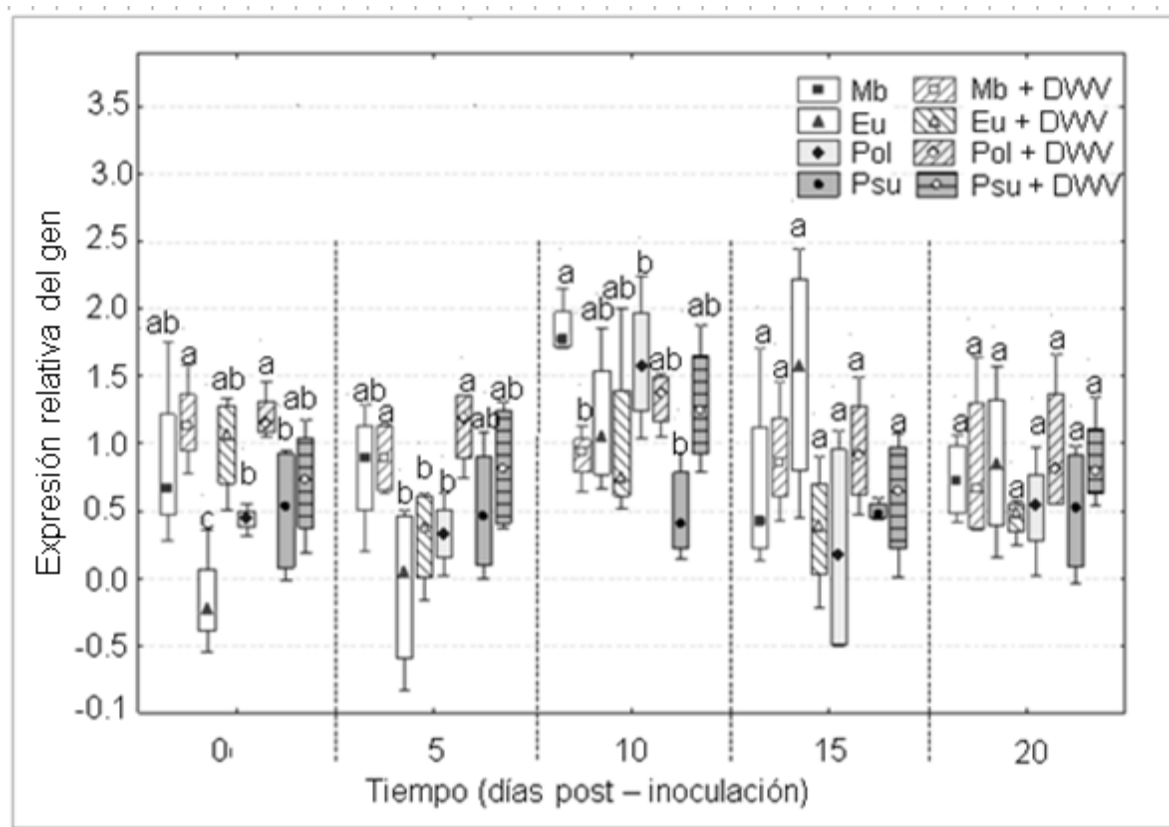


Mediana; Caja: 25 % - 75 %; Bigotes: Min- Max.

Mb: *Maytenus boaria*, Eu: *Eucalyptus globulus*, Pol: polifloral y Psu: polen sustituto.

Los péptidos antimicrobianos, inducidos por las vías IMD (Casteels *et al.*, 1993), son componentes claves de la inmunidad humoral de los invertebrados, con amplio espectro inhibitorio contra bacterias, hongos, virus y protozoos (Klotman y Chang 2006, McMenamin *et al.*, 2016).

Figura 6. Expresión relativa del gen codificante para el péptido antimicrobiano himenoptaecina evaluado a las 0, 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación en: abejas sanas e inoculas con DWV y alimentadas con pólenes nativos.



Mediana; Caja: 25 % - 75 %; Bigotes: Min- Max.

Mb: *Maytenus boaria*, Eu: *Eucalyptus globulus*, Pol: polifloral y Psu: polen sustituto.

Las abejas inoculadas y expuestas a los diferentes tratamientos tienden a presentar una óptima expresión de los péptidos antimicrobianos abaecina, defensina e himenoptaecina, mostrando una respuesta positiva en abejas inoculadas con DWV y expuestas a los tratamientos monofloral nativo (Mb) y polen polifloral (Pol), donde la expresión del gen que codifica para defensina y abaecina aumenta significativamente (Figura 4 y 5). El aumento de la expresión de los péptidos antimicrobianos podría preparar a las abejas contra la infección del virus y ayudar a prevenir la propagación a través de las colonias, y posiblemente poblaciones y comunidades (Palmer-Young *et al.*, 2017). Los factores nutricionales pueden influir

fuertemente en la inmunidad y el resultado de la infección, no sólo en los seres humanos, sino también en las abejas (Brunner *et al.*, 2014, Conroy *et al.*, 2016). El polen es utilizado principalmente por las abejas como fuente de aminoácidos esenciales necesarios para la síntesis de péptidos en las vías inmunes (Grimble 2001, Schmid-Hempel 2017), además, de influir positivamente en la expresión de genes implicados en la producción de algunos péptidos antimicrobianos y de longevidad (Alaux *et al.*, 2011). Así mismo, el néctar y polen son ricos en fitoquímicos que mejoran la salud de las abejas, apoyada por una mayor supervivencia. Por lo que, consumir fitoquímicos de diferente origen botánico puede aumentar la inmunidad incluso cuando se consumen concentraciones relativamente bajas durante periodos cortos de tiempo (Palmer-Young *et al.*, 2017). Por lo tanto, el polen nativo mono floral (Mb) y Polifloral (Pol) podrían ser utilizados para potenciar el sistema inmune de las abejas, presentar una mayor tolerancia al virus de las alas deformadas y con ello, mejorar la sobrevivencia frente a la infección de este virus.

CONCLUSIONES

1. La ingesta de pólenes nativos aumenta la sobrevivencia en abejas infectadas con el virus de las alas deformadas.
2. Los niveles del virus de las alas deformadas disminuyen en abejas alimentadas con pólenes Mb, Pol y Eu comparadas con el polen sustituto.
3. La inclusión de pólenes nativos y de diverso origen botánico en la dieta de las abejas infectadas con el virus de las alas deformadas (DWV) permite aumentar la expresión de péptidos antimicrobianos defensina y abaecina.

REFERENCIAS

1. Adler, L.S. 2001. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91: 409–420.
2. Aizen, M.A. and L.D. Harder. 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.* 19(11): 915-918.

3. Alaux, C., C. Dantec, H. Parrinello and Y. Le Conte. 2011. Nutrigenomics in honey bees: Analysis of digital gene expression of nutritional effects of pollen in healthy and *Varroa* beesparasitized. *BMC Genom.* 12: 496(Art. N°). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-496> [en línea]
4. Annoscia, D., V. Zanni, D. Galbraith, A. Quirici, C. Grozinger, R. Bortolomeazzi and F. Nazzi. 2017. Elucidating the mechanisms underlying the beneficial health effects of dietary pollen on honey bees (*Apis mellifera*) infested by *Varroa* mite ectoparasites. *Sci. Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06488-2> [en línea]
5. Arismendi, N., M. Vargas, M.D. López, Y. Barría and N. Zapata. 2018. Promising antimicrobial activity against the honey bee parasite *Nosema ceranae* by methanolic extracts from Chilean native plants and propolis. *J. Apic. Res.* 57(4): 522-535.
6. Breeze, T.D., B.E. Vaissière, R. Bommarco, T. Petanidou, N. Seraphides, L. Kozák, J. Scheper, J.C. Biesmeijer, D. Kleijn, S. Gyldenkerne, M. Moretti, A. Holzschuh, I. Steffan-Dewenter, J.C. Stout, M. Pärtel, M. Zobel and S.G. Potts. 2014. Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS One* 9(1): 21(Art. N°). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082996> [en línea].
7. Brunner, F.S., P. Schmid-Hempel and S. M. Barribeau. 2014. Protein-poor diet reduces host-specific immune gene expression in *Bombus terrestris*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 281. 20140128. doi: 10.1098/rspb.2014.0128 [en línea].
8. Bulet, P. and R. Stöcklin. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.* 12(1): 3-11.
9. Campos, M.G.R., S. Bogdanov, L. Bicudo de Almeida-Muradian, T. Szczesna, Y. Mancebo, C. Frigerio and F. Ferreira. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J. Apic. Res.* 47(2): 154-161.
10. Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs and P. Tempst. 1993. Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that isinfection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.* 268: 7044–7054.
11. Carrillo-Tripp, J., A. G. Dolezal, M. J. Goblirsch, W. Miller, A. L. Toth and B. C. Bonning. 2016. *In vivo and in vitro* infection dynamics of honey bee viruses. *Sci. Rep.* 6(Art. N°). <https://doi.org/10.1038/srep22265> [en línea].

12. Chaimanee, V., P. Chantawannakul, Y. Chen, J. D. Evans and J. S. Pettis. 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J. Insect Physiol* 58(8): 1090-1095.
13. Chen, Y.P., J. Evans and M. Feldlaufer. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 92: 152-159.
14. Chung, P., B. Gutiérrez y S. Benedetti. 2017. Variabilidad morfológica de frutos de Peumo (*Cryptocarya alba* (Mol.) Looser) de distintas localidades de la Región del Biobío. *Cienc. Investig. For.* 23(1): 7-17.
15. Crailsheim, K., L.H.W Schneider, N. Hrassnigg, G. Buhlmann, U. Gmeinbauer and B. Schoffmann. 1992. The consumption of pollen and the use of worker bees (*Apis mellifera carnica*): The dependence of the personage and function. *Physiol Insect J.* 38: 409-419.
16. Crailsheim, K and U. Riessberger-Gallé. 2001. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie* 32(1): 91-103.
17. Dainat, B., T. Ken, H. Berthoud and P. Neumann. 2009. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (*Acari, Laelapidae*) as a vector of honey bee viruses *Insect. Soc.* 56: 40-43.
18. DeGrandi-Hoffman, G., L.S. Gagea, V. Corby-Harrisa, M. Carrola, Mona Chambersa, H. Grahama, E. Watkins deJonga, G. Hidalgo, S. Callea, F. Azzouz-Oldenb, C. Meadora, L. Snydera and N. Ziolkowsk. 2018. Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 109: 114–124.
19. De Groot, A.P. 1953. Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiol. Comparata d'Ecol.* 3: 197-285.
20. Delaplane, K.S. and D.F. Mayer. 2004. *Crop pollination by bees.* University Press. Cambridge, UK.
21. De Miranda, J.R. and E. Genersch. 2010. *Deformed wing virus.* *J. Invertebr. Pathol.* 103(Suppl.) S48–S61.
22. Denisow, B and Denisow-Pietrzyk, M. 2016. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J. Sci. Food Agric.* 96(13): 4303.
23. Dobson, H.E.M. 1988. Survey of pollen and pollenkitt lipids—chemical cues to flower visitors. *Am. J. Bot.* 75: 170–182.

24. Estay, P. 2012. Abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): Polinización según especie objetivo. Boletín INIA N°235. INIA La Platina. Santiago, Chile.
25. Evans, J.D. 2006. Beepath: an ordered quantitative- PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J. Invertebr. Pathol.* 93: 135-139.
26. Fernández, X. 2016. Los retos que enfrenta la industria apícola [en línea]. *El Mercurio*, Chile. <<http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Noticias/2016/02/23/Los-desafios-que-enfrenta-la-industria-apicola.aspx>> [Consulta: 10 abril 2022].
27. Gallai, N., J.M. Salles, J. Settele and B.E. Vaissie`re. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68: 810–821.
28. Garibaldi, L.A., I. Steffan-Dewenter, R. Winfree, M.A. Aizen, R. Bommarco, S.A. Cunningham, C. Kremen, L.G. Carvalheiro, L.D. Harder, O. Afik, I. Bartomeus, F. Benjamin, V. Boreux, D. Cariveau, N.P. Chacoff, J.H. Dudenhöffer, B.M. Freitas, J. Ghazoul, S. Greenleaf, J. Hipólito, A. Holzschuh, B. Howlett, R. Isaacs, S.K. Javorek, C.M. Kennedy, K.M. Krewenka, S. Krishnan, Y. Mandelik, M.M. Mayfield, I. Motzke, T. Munyuli, B.A. Nault, M. Otieno, J. Petersen, G. Pisanty, S.G. Potts, R. Rader, T.H. Ricketts, M. Rundlöf, C.L. Seymour, C. Schüepp, H. Szentgyörgyi, H. Taki, T. Tschardtke, C.H. Vergara, B.F. Viana, T.C. Wanger, C. Westphal, N. Williams and A.M. Klein. 2013. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339(6127): 1608-1611.
29. Grimble, R.F. 2001. Nutritional modulation of immune function. *Proc. Nutr. Soc.* 60: 389-397.
30. Haydak, M.H. 1970. Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* 15: 143-156.
31. Heil, M. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends Plant Sci.* 16: 191–200.
32. Herbert, E.W.J. 1992. Honey bee nutrition. pp: 197-233. In: J.E. Graham (Ed.). *The hive and the honey bee*. Dadant & Sons Inc. Hamilton, USA.
33. Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, A.V. González-Porto, P. García-Palencia, A. Meana, M.J. del Nozal, R. Mayo and J.L. Bernal. 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.* 1(2): 110-113.

34. Higes, M., P. García-Palencia, R. Martín-Hernández and A. Meana. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94(3): 211-217.
35. Hoffmann, J.A., F.C. Kafatos, C.A. Janaway and R.A. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspective in innate immunity. *Science* 284(5418): 1313-1318.
36. Holm, S. 1979. A simple sequential rejective method procedure. *Scand. J. Stat.* 6: 65–70.
37. Kaškonienė, V., G., Ruočkusienė, P. Kaškonas, L. Akuneca and A. Maruška. 2015. Chemometric analysis of bee pollen based on volatile and phenolic compound compositions and antioxidant properties. *Food Anal. Methods* 8(5): 1150–163.
38. Keller, I., P. Fluri and A. Imdorf. 2005. Pollen nutrition and colony development in honey bees: part I. *Bee World* 86(1): 3-10.
39. Kieliszek, M., K. Piwowarek, S. Blazejak, A. Chlebowska-Śmigiel and I. Wolska. 2018. Bee pollen and bread as new health-oriented products: a review. *Trends Food Sci Technol.* 71: 170-180.
40. Kukielka, D., F. Esperon, M. Higes and J.M. Sanchez-Vizcaino. 2008. A sensitive one step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods* 147(2): 275-281.
41. Klatt, B.K., A. Holzschuh, C. Westphal, Y. Clough, I. Smit, E. Pawelzik and T. Tscharntke. 2014. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 281. doi:10.1098/rspb.2013.2440 [en línea].
42. Klotman, M. E. and T. L. Chang. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6(6): 447-456.
43. Khongphinitbunjong. K., L.I. de Guzman, M. Tarver, T.E. Rinderer and P. Chantawannakul. 2015. Interactions of *Tropilaelaps mercedesae*, honey bee viruses, and immune response in *Apis mellifera*. *J. Apic.* 54(1): 40-47.
44. Klein, A.M., B.E. Vaissière, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen and T. Tscharntke. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 274(1608): 303-313.

45. Kleinschmidt, G.J. and A.C. Kondos. 1976. Influence of crude protein levels on colony production. *Aust. Beekeep* 78: 36-39.
46. Lanzi, G., J.R. De Miranda, M.B. Boniotti, C.E. Cameron, A. Lavazza, L. Capucci, S.M. Camazine and C. Rossi. 2006. Molecular and biological characterization of *deformed wing virus* of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* 80: 4998-5009.
47. Li, Q.Q., K. Wang, M.C. Marcucci, A.C.H.F. Sawaya, L. Hu, X.F. Xue, L.M. Wu and F.L. Hu. 2018. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *J. Funct. Foods* 49: 472-484.
48. Luong, G.T.H., J.S. Lee, S.J. Yong and B.S. Yoon. 2015. Development of ultra-rapid reverse transcription real-time PCR for detection against black queen cell virus in honeybee. *J. Apic.* 30(3): 171-179.
49. MINSAL (Chile). 2009. Medicamentos herbarios tradicionales, 103 especies vegetales. MINSAL. Santiago, Chile.
50. Montes, M. 1987. Aspectos de la medicación oopular en la Región del Biobío, Chile. *Acta Farm. Bonaerense* 6(2): 115-24.
51. Morais, M., L. Moreira, X. Feás and L. M. Estevinho. 2011. Honeybee collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food. Chem. Toxicol.* 49(5): 1096 -1101.
52. McMenamin, A.J., L.M. Brutscher, W. Glennly and M.L. Flenniken. 2016. Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. *Curr. Opin. Insect Sci.* 16: 14–21.
53. Negri, G., E.W. Teixeira, M.L. Alves, A.C. Moreti, I.P. Otsuk, R.G. Borguini and A. Salatino. 2011. Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from southeast Brazil. *J. Agric. Food Chem.* 59(10): 5516-5522.
54. Palmer-Young, C.E., C.O. Tozkar, R.S. Schwarz, Y. Chen, R.E. Irwin, L.S. Adler and J.D. Evans. 2017. Nectar and pollen phytochemicals stimulate honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) immunity to viral infection. *J. Econ. Entomol.* 110(5): 1959–1972.
55. Porrini, M.P., P.M. Garrido and M.J. Eguaras. 2013. Individual feeding of honey bees: Modification of the Rinderer technique. *J. Apic. Res.* 52(5): 194-195.

56. Potts, S.G., V. Imperatriz-Fonseca, H. Ngo, M.A. Aizen, J. C. Biesmeijer, T. D. Breeze, L. V. Dicks, L.A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele and A.J. Vanbergen. 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* 540: 220–229.
57. Romanucci, V., D. D'Alonzo, A. Guaragna, C. Di Marino, S. Davinelli, G. Scapagnini and A. Zarrelli. 2016. Bioactive compounds of *Aristotelia chilensis* Stuntz and their pharmacological effects. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 17(6): 513-23
58. Rubilar, M., C. Gutiérrez, M. Villarroel and C. Shene. 2010. Influence of separation conditions on antimicrobial activity of polyphenolic fractions from murta leaves extract. *CyTA J. Food.* 8: 139–149.
59. SAG (Chile). 2022. Boletín apícola. Boletín N° 7. Servicio Agrícola y Ganadero. Santiago, Chile.
60. Santos, E., E. García, R. Di Landro, G. Daners, A. Saadoun, C. Cabrera y C. Invernizzi. 2009. Contenido de proteína cruda del polen de las principales especies botánicas utilizadas por las abejas melíferas en Uruguay. *Agrociencia Uruguay* 13(2): 9-13.
61. Simeunović, P., J. Stevanović, D. Vidanović, J. Nišavić, D. Radović, L. Stanišić and Z. Stanimirović. 2014. A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from Serbia using real-time RT-PCR. *Acta Vet.-Beograd.* 64(1): 81-92.
62. Schmid-Hempel P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 529-551.
63. Shene, C., A. Reyes, M. Villarroel, J. Sineiro, M. Pinelo and M. Rubilar. 2008. Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. *Eur. Food Res. Technol.* 228: 467–475.
64. Steinhauer. N., K. Rennich, M.E. Wilson, D.M. Caron, D.M. Caron, E.J. Lengerich, J.S. Pettis, R. Rose, J.A. Skinner, D.R. Tarpy, J.T. Wilkes and D. vanEngelsdorp. 2014. A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J. Apic. Res.* 53: 1-18.
65. Spleen A, E.J. Lengerich, K. Rennich, D. Caron, R. Rose, J.S. Pettis, M. Henson, J.T. Wilkes, M. Wilson, J. Stitzinger, K. Lee, M. Andree, R. Snyder and D. VanEngelsdorp 2013. A national survey of managed honey bee 2011–12

- winter colony losses in the United States: results from the Bee Informed Partnership. *J. Apic. Res.* 52(2): 44-53.
66. Tantillo, G., M. Bottaro, A. Di Pinto, V. Martella, P. Di pinto and V. Terio. 2015. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. *Ital. J. Food saf.* 4(3): 5364(Art. N°). doi: 10.4081/ijfs.2015.5364 [en línea].
67. Tejera, L., C. Invernizzi y G. Daners, 2013. Población y recursos alimenticios en colonias de *Apis mellifera* L. en Uruguay. *Arch. Zootec.* 62(240): 607-610.
68. VanEngelsdorp, D., J.D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B.K. Nguyen, M. Frazier, J. Frazier, D. Cox-Foster, Y. Chen, R. Underwood, D.R. Tarpy and J.S. Pettis. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *Plos one* 4(8). doi: 10.1371/journal.pone.0006481[en línea].
69. VanEngelsdorp, D. Caron, J. Hayes, R. Underwood, M. Henson, K. Rennich, A. Spleen, M. Andree, R. Snyder, K. Lee, K. Roccasecca, M. Wilson, J. Wilkes, E. Lengerich and J. Pettis. 2012. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J. Apic. Res.* 51: 115-124.
70. Verde, M. 2011. Bienestar animal en la apicultura. El bienestar de las colmenas. *Rev. Cuba. Cienc. Vet.* 32(1): 26-31.
71. Velis, H., P. Silva y M. Núñez. 2009. Producción apícola, informe anual 2008. Instituto Nacional de Estadísticas. Santiago, Chile.
72. Vogel, H., I. Razmilic, J. San Martín, Ú. Doll y B. González. 2005. Plantas medicinales chilenas: Experiencias de domesticación y cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui. Fundación para la Innovación Agraria. Chile.
73. Yang, X and D.L. Cox-Foster. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(21): 7470-7475.
75. Yi. H.Y., M. Chowdhury, Y.D. Huang and X.Q. Yu. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 98(13): 5807-5822.
76. Yue, C., E. Genersch. 2005. RT-PCR analysis of *deformed wing virus* in honey bees (*Apis Mellifera*) and mites (*Varroa destructor*) *J. Gen. Virol.* 86: 3419-3424.

ANEXO

Composición polen tratamiento 1: Monofloral, nativo de *Maytenus boaria* (60 %).

Composición polen tratamiento 2: Monofloral de *Eucalyptus globulus* (98 %)

Composición polen tratamiento 3: polifloral, *Malus domestica* (40 %), *boaria Maytenus* (20 %), *Cryptocarya alba* (20 %).

Composición polen sustituto: (6 %), almidón de patata (2 %), aceite de canola (0.2 %) y sacarosa (57.8 %) harina de soja (18 %), polen curcínulado (10 %), harina de maíz (6 %), harina de trigo.