



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, genética y evolución.

**La abeja *Apis mellifera* como bioindicador del impacto ambiental:
estudio sobre su fisiología, comportamiento y sociabilidad en un
agroecosistema.**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Lic. Ivana Noelia Macri

Director de tesis: Dr. Walter M. Farina

Codirector de tesis: Dr. Jorge Zavala

Consejera de estudios: Dra. Haydeé Pizarro

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insectos Sociales. IFIBYNE-CONICET. DBBE, FCEN-UBA.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Fecha de defensa: julio 2023

La abeja *Apis mellifera* como bioindicador del impacto ambiental: estudio sobre su fisiología, comportamiento y sociabilidad en un agroecosistema.

Resumen

La abeja *Apis mellifera* L. es uno de los principales polinizadores en agroecosistemas, y como tal, sus colonias están expuestas a la intensificación agrícola. Esto conlleva una mayor utilización de agroquímicos y una reducción de diversidad floral, resultando en hábitats fragmentados y más homogéneos. Los recursos que obtienen en estos entornos pueden estar expuestos a agroquímicos, lo que podría acumularse en sus colonias y distribuirse entre sus miembros. En la presente tesis se planteó comparar desde un abordaje comportamental, sociobiológico, molecular y fisiológico, el estado integral de las colmenas de abejas melíferas en dos momentos diferentes del manejo del agroecosistema circundante y considerando la disponibilidad de recursos, la heterogeneidad del entorno y la aplicación de agroquímicos. Esto se realizó a lo largo de cuatro temporadas de verano, evaluando las diferentes etapas de desarrollo de las abejas. Desde un abordaje comportamental, se estudió la actividad recolectora de las colonias y se evaluó la sensibilidad gustativa y la capacidad de aprender un olor recompensado a través de un condicionamiento olfativo clásico, utilizando el paradigma de respuesta de extensión de la probóscide (REP) en individuos recolectores capturados en los distintos apiarios. Desde un abordaje ecotoxicológico se analizó la presencia de residuos de agroquímicos en miel, cera, polen y cuerpo de abejas recolectoras. A su vez, a través de un abordaje molecular, se estudió la expresión relativa de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos en larvas y abejas adultas jóvenes. En las abejas recolectoras se analizaron los niveles de expresión de genes asociados a las bases genéticas de la sociabilidad. En suma, los resultados de esta tesis confirman que trazas de agroquímicos están ingresando a las colmenas y generando efectos subletales sobre todas las etapas del desarrollo de los miembros de la colonia. Se observaron cambios en los niveles de expresión de los biomarcadores de exposición, relacionados a la detoxificación de xenobióticos, tanto en abejas adultas como en larvas, siendo estas últimas más vulnerables. La recolección de polen y su potencial nutricional tienen una relación directa con los perfiles de expresión génica, tanto en abejas obreras jóvenes asociadas al cuidado de la cría como en abejas recolectoras. Esto no se observa en larvas, donde los perfiles de expresión génica no tienen relación directa con las variables de recolección de recursos, pero sí con las concentraciones de residuos de pesticidas encontrados en miel y cera. Adicionalmente, hay un efecto negativo sobre las capacidades cognitivas de las abejas recolectoras que afecta directamente a la eficiencia recolectora y, sumado a los efectos sobre la expresión de genes relacionados a la actividad neural y sociabilidad en abejas, podría llevar a una desorganización de las actividades colectivas afectando la cohesión social de las colonias. De esta forma, la presente tesis aporta evidencias de que es posible un abordaje multivariado e integrativo mediante protocolos estandarizados para evaluar el impacto ambiental en las colonias de abejas melíferas en situaciones reales de campo. Por otro lado, da cuenta de la importancia de salvaguardar parches de flora silvestre que aporten diversidad floral tanto en el entorno de las colmenas como a lo largo de todo el periodo donde la recolección es intensa. Ambos aspectos mejorarían el estado nutricional a lo largo de toda la temporada de actividad recolectora, situación que podría paliar los efectos subletales observados.

Palabras clave: *Apis mellifera*, intensificación agrícola, pesticidas, detoxificación de xenobióticos, capacidades cognitivas, eusocialidad.

The honeybee *Apis mellifera* as a bioindicator of environmental impact: study of their physiology, behavior and sociability in an agroecosystem.

Abstract

The honey bee *Apis mellifera* L. is one of the main pollinators in agroecosystems, and as such, its colonies are exposed to agricultural intensification. This leads to increased use of agrochemicals and a reduction in floral diversity, resulting in fragmented and more homogeneous habitats. The resources they obtain in these environments may be exposed to agrochemicals that can accumulate in their colonies and be distributed among their members. In the present thesis, a behavioral, sociobiological, molecular and physiological approach was used to compare the global state of beehives at two different times of crop management in a field in the province of Buenos Aires, in relation to the availability of resources, the heterogeneity of the environment and the application of agrochemicals. This was done during four summer seasons, evaluating the different stages of bee development. From a behavioral approach, on the one hand, we studied the foraging activity of the colonies, in the entrance of the hives and with pollen traps. On the other hand, using the proboscis extension response (PER) in forager bees captured in the different apiaries, sucrose responsiveness and odor-reward association were evaluated through olfactory conditioning. From a molecular approach, the presence of agrochemical residues in honey, wax, pollen and body of forager bees was analyzed. Furthermore, the relative expression of genes associated with the detoxification of xenobiotics in larvae and young bees inside the hive was studied. In addition, the relative expression of genes associated with the genetic basis of sociability in bees was evaluated in forager bees. In sum, the results of this thesis confirm that traces of agrochemicals are entering the hives and causing sub lethal effects on all stages of bee development. Changes in the expression levels of genes related to xenobiotic detoxification were observed in both, bees and larvae, the latter being more vulnerable. Pollen collection -and its nutritional potential- has a direct relationship with gene expression profiles, in both, young bees and forager bees. This was not observed in larvae, where gene expression profiles showed no direct relationship with the resources collection, but do exhibited a direct relationship with pesticides concentrations found in honey and wax samples. Additionally, there is a negative effect on the cognitive abilities of forager bees that directly affects foraging efficiency and, added to the negative effects on the expression levels of genes related to neural activity and sociability in bees, could lead to a disorganization of collective activities and the social structure of the hive. Thus, this thesis provides evidence that a multivariate approach is possible through standardized protocols to evaluate environmental impact and stress in honey bee colonies in current real field situations. On the other hand, it shows the importance of safeguarding patches of wild flora that provide floral diversity both, in the surroundings of the hives and throughout the period of intense harvesting. Both aspects would improve the nutritional status throughout the harvesting season, a situation that could mitigate the sublethal effects observed.

Keywords: *Apis mellifera*, agricultural intensification, pesticides, detoxification of xenobiotics, cognitive abilities, eusociality.

A Marian y Nacho, que creyeron siempre en mí.

Esta tesis no sería posible sin ustedes.

Gracias, siempre.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1	Agroecosistemas	8
1.2	La abeja <i>Apis mellifera</i> como polinizador en agroecosistemas	11
1.3	Organización social de la colmena	18
1.4	El comportamiento de la abeja melífera y su interacción con el ambiente	22
	1.4.1 El comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i>	22
	1.4.2 Aprendizaje asociativo	23
	1.4.2.1 Condicionamiento olfativo clásico y operante	23
	1.4.3 Sensibilidad gustativa	25
1.5	Fisiología de la abeja melífera	25
	1.5.1 Nutrición y detoxificación de xenobioticos	25
	1.5.2 Bases genéticas de la sociabilidad	28
1.6	Importancia de la abeja melífera como biosensor	29
1.7	Objetivos	30
	1.7.1 Objetivos particulares e hipótesis	30

METODOLOGÍA GENERAL

2.1	Sitio de estudio	32
2.2	Abordaje comportamental	35
	2.2.1 Actividad recolectora	35
	2.2.1.1 Actividad en la entrada de las colmenas	35
	2.2.1.2 Trampas de polen	37
	2.2.2 Ensayos comportamentales <i>in situ</i>	39
	2.2.2.1 Sensibilidad gustativa	39
	2.2.2.2 Condicionamiento olfativo clásico	40
2.3	Abordaje molecular	42
	2.3.1 Análisis de expresión génica	42
	2.3.2 Análisis de pesticidas	44
2.4	Abordaje ecotoxicológico	
	2.4.1 Cromatografía acoplada a espectrometría de masas	44

SITUACIÓN DE CAMPO 1: Exposición a herbicidas de post emergencia por aplicación terrestre. Evaluación de actividad recolectora y de perfiles de expresión de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos en larvas y abejas jóvenes de interior de colmena

3.1	Introducción	49
3.2	Metodología	51

3.2.1 Sitio de estudio, cultivos y aplicación de agroquímicos	51
3.2.2 Variables analizadas	55
3.2.3 Colecta de muestras	55
3.2.4 Análisis de expresión génica	57
3.2.5 Análisis estadístico	60
3.3 Resultados	60
3.3.1 Abordaje comportamental: actividad recolectora	60
3.3.2 Abordaje molecular: Análisis de expresión de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos	62
3.3.3 Abordaje multivariado: Correlaciones y Análisis de Componentes Principales (ACP)	66
3.4 Discusión	69

SITUACIÓN DE CAMPO 2: Exposición a mezcla de insecticidas y fungicidas por aplicación aérea. Evaluación de actividad recolectora, de residuos de pesticidas en productos de colmena y de perfiles de expresión de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos en larvas

4.1 Introducción	74
4.2 Metodología	76
4.2.1 Sitio de estudio, cultivos y aplicación de agroquímicos	76
4.2.2 Variables analizadas	80
4.2.3 Colecta de muestras	81
4.2.4 Análisis de expresión génica	82
4.2.5 Análisis de pesticidas en cera y miel	82
4.2.6 Análisis estadístico	84
4.3 Resultados	85
4.3.1 Abordaje comportamental: actividad recolectora	85
4.3.2 Abordaje molecular: Análisis de expresión de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos	87
4.3.3 Abordaje ecotoxicológico: Análisis de pesticidas en miel y cera	89
4.3.4 Abordaje multivariado: Correlaciones y Análisis de Componentes Principales (ACP)	97
4.4 Discusión	100

SITUACIÓN DE CAMPO 3: Exposición a herbicidas e insecticidas por aplicación terrestre. Evaluación de actividad recolectora, de residuos de pesticidas en polen y de perfiles de expresión de genes asociados a las bases genéticas de la sociabilidad en abejas

5.1	Introducción	104
5.2	Metodología	107
	5.2.1 Sitio de estudio, cultivos y aplicación de agroquímicos	107
	5.2.2 Variables analizadas	112
	5.2.3 Colecta de muestras	116
	5.2.4 Análisis de expresión génica	116
	5.2.5 Análisis de pesticidas en polen y cuerpos de abejas recolectoras	118
	5.2.6 Análisis estadístico	118
5.3	Resultados	119
	5.3.1 Abordaje comportamental: actividad recolectora, sensibilidad gustativa y condicionamiento olfativo	119
	5.3.2 Abordaje molecular: análisis de expresión de genes relacionados con las bases genéticas de la sociabilidad	125
	5.3.3 Abordaje ecotoxicológico: Análisis de pesticidas en polen y abejas recolectoras	131
	5.3.4 Abordaje multivariado: Correlaciones y Análisis de Componentes Principales (ACP)	137
5.4	Discusión	142
	 Discusión general	146
	 Referencias Bibliográficas	151
	 Anexo estadístico	172

Introducción general

1.1 Agroecosistemas

Los agroecosistemas, tal como los definió Odum (1984), son un tipo especial de ecosistema, intermedios entre los ecosistemas naturales y los ecosistemas urbanos como las ciudades, totalmente construidos por el ser humano. El manejo que el ser humano hace de los ecosistemas consiste en reemplazar una gran cantidad de especies vegetales silvestres por unas pocas o sólo una especie de utilidad agrícola (Conway, 1987).

A nivel mundial, la superficie total cultivada se incrementó de manera consistente durante las últimas seis décadas (Andrade, 2020). Este fenómeno se debió, principalmente, a un aumento en los rendimientos por unidad de superficie como consecuencia del proceso denominado “Revolución Verde” (Borlaug, 2007). Este proceso se dio por una conjunción de innovaciones, tales como la disponibilidad de fertilizantes nitrogenados de costos relativamente bajos, un mayor potencial de rendimiento en los cultivos, con genes de tolerancia a enfermedades y de insensibilidad fotoperiódica que les proveían amplia adaptación a distintas latitudes y la aparición de nuevos herbicidas que permitieron la difusión de estos cultivares, al disminuir la competencia con las malezas (Evans, 1997; Borlaug, 2007).

El uso de pesticidas tuvo un rol relevante en la revolución verde y, desde 1960 al 2018, la producción global de fertilizantes aumentó 6,4 veces, la de plaguicidas 5,9 veces, y el uso de energía basada en combustibles fósiles para todo uso se incrementó 4,5 veces (Andrade, 2020). Los plaguicidas son sustancias químicas líquidas o sólidas que producen efectos tóxicos agudos y crónicos sobre ciertos organismos y que se utilizan principalmente para combatir las plagas (malezas, insectos, otros animales y enfermedades) que afectan a los cultivos (Andrade et al., 2017). Actualmente, el promedio mundial anual de uso de plaguicidas por hectárea, alcanza 2,7 kg de principio activo (Andrade, 2020) y, particularmente en Argentina, se aplica más del doble de este promedio (FAO, 2020). Estos compuestos están presentes en el aire, en el suelo, en el agua superficial y subterránea y en los alimentos, siendo la principal fuente de contaminación puntual del ambiente (Larsen et al., 2013; Aparicio et al., 2015; Colombo y Sarandón, 2015). Debido a esta amplia presencia en matrices ambientales, afectan la salud humana y animal, a los insectos benéficos y a las comunidades microbianas (Tittonell, 2013; Aparicio et al., 2015). Se estima que el

63,7% de las tierras agrícolas a nivel mundial están en riesgo de contaminación por la presencia de más de un agroquímico (principio activo) y el 20,9% por más de diez (Tang et al., 2021). A su vez, el 69,4% de las tierras agrícolas de América del Sur están expuestas a la contaminación por más de un principio activo (Figura 1.1).

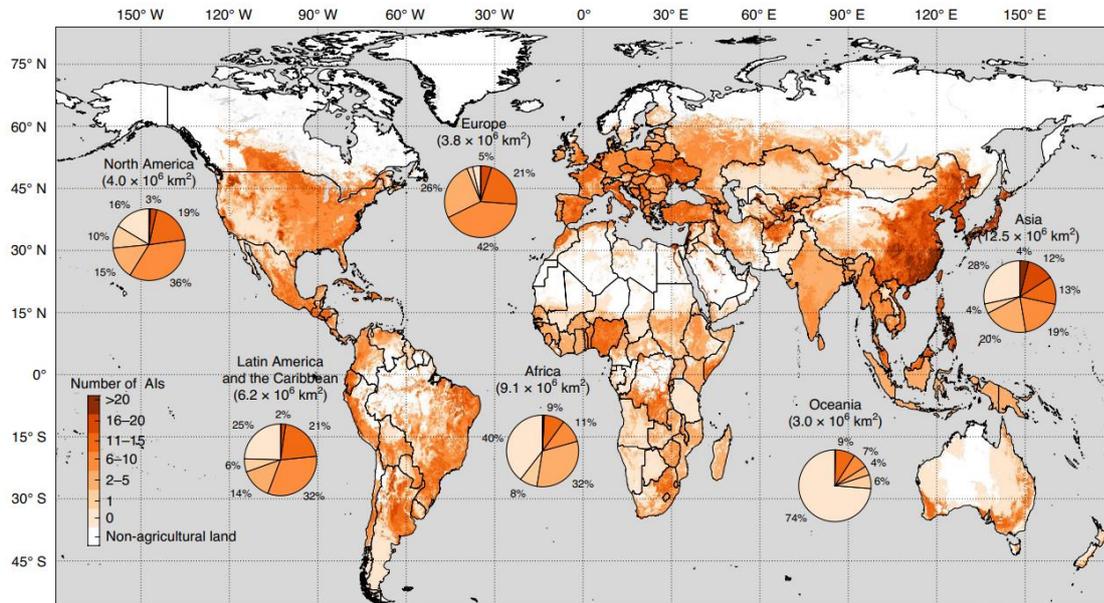


Figura 1.1 Mapa global del número de componentes activos (AIs) que suponen un riesgo para el ambiente. Los gráficos de torta representan la fracción de tierra agrícola contaminada por diferentes números de IA's en cada región y los valores entre paréntesis encima de los gráficos de torta representan la tierra agrícola total de esa región. Tomado de Tang et al., 2021.

Otra consecuencia importante de la intensificación agrícola es la pérdida de biodiversidad. La biodiversidad, entendida como la diversidad de especies de organismos vivos y la variabilidad genética dentro de ellas, cumple importantes funciones en los agroecosistemas en relación con su producción y regulación interna y con su resiliencia, estabilidad y adaptación frente a cambios ambientales (Isbell et al., 2015; Dainese et al., 2019). La agricultura, por avanzar sobre áreas de bosques y otros tipos de ambientes, tiene una alta responsabilidad en los incrementos en la tasa de extinción de especies (Andrade, 2020).

En suma, la importante intensificación de la producción agrícola basada en agroquímicos, junto con el laboreo excesivo de los suelos y el avance de la frontera agropecuaria originaron problemas de degradación ambiental y de contaminación, de pérdida de biodiversidad, de emisión de gases de efecto invernadero, de disponibilidad de agua dulce, entre otros (Foley et al., 2005; Rockström et al., 2009; Bringezu et al., 2010; Tiftonell, 2013; Gordon et al., 2017; Ripple et al., 2017; Springmann et al., 2018; FAO, 2020; Rockström et al., 2020).

En el caso de Argentina, en las últimas décadas el modelo de producción agrícola-ganadera de la región pampeana implementó un uso más intensivo de insumos externos, tecnología y gestión para

lograr incrementos de producción adicionales, a la vez que se expandió sobre otras regiones dominadas por la vegetación natural en el norte del país (Aapresid, 2018). Esto tuvo como consecuencia un aumento significativo del área ocupada por cultivos anuales en toda la región y la consecuente reducción de superficie de bosques naturales, provocando una pérdida y fragmentación generalizadas de la vegetación natural (Galletto y Torres 2020).

A fines de la década de 1980 se difundió en el país la siembra directa, un sistema a partir del cual no se recurre a la utilización de un arado ni se remueve el suelo antes de la siembra, sino que la sembradora crea una hendidura en la que se van depositando las semillas. Esta tecnología, a su vez, potenció el uso de agroquímicos tales como herbicidas, fungicidas e insecticidas, así como también un mayor uso de fertilizantes (Satorre y Andrade, 2021).

Debido a que la siembra directa implica no arar la tierra, el desmalezamiento se realiza casi exclusivamente mediante la aplicación de herbicidas, los que a su vez pueden afectar el cultivo. Esto llevó a la adopción de cultivos modificados genéticamente, a partir de su surgimiento en el mercado argentino en el año 1996 (Satorre y Andrade, 2021). Actualmente, el porcentaje de variedades transgénicas cultivadas supera el 95% del área sembrada con soja en el país (Leguizamón, 2020). La ingeniería genética no se redujo a la soja, sino que se extendió también al maíz. Existen híbridos de maíz genéticamente modificados (maíces Bt) con tolerancia al barrenador del tallo, lepidóptero que en su estado larval resulta ser una de las plagas más importantes de este cultivo. Se estima que en al menos un 70% del área sembrada con maíz se cultiva algún híbrido *Bt* (Trigo, 2011).

En la primera década del milenio la agricultura extensiva se identificaba con un reducido número de especies; de hecho, los cultivos de soja, maíz, trigo y girasol ocuparon más del 95% del área sembrada, con el cultivo de soja alcanzando el 65% del área cultivada hacia el año 2009. Asimismo, la superficie sembrada con el cultivo de soja tendió a incrementarse en dicho periodo, sin embargo, comenzó a disminuir en los últimos años (Satorre y Andrade, 2021), (Figura 1.2).

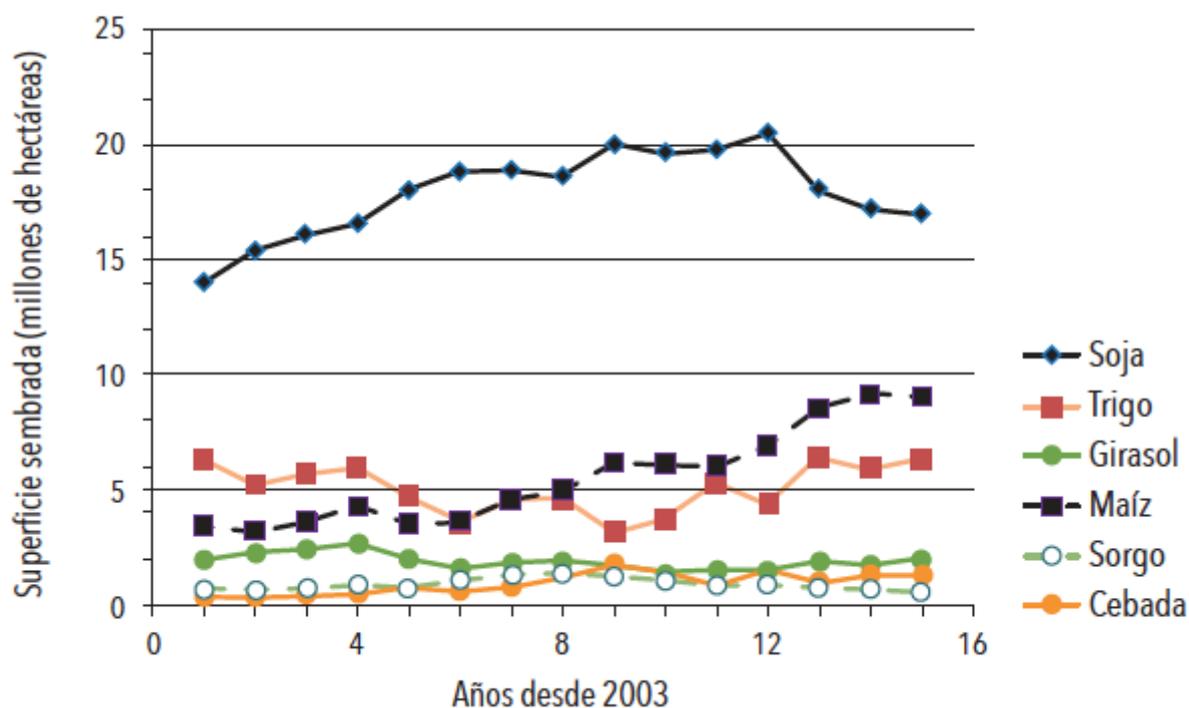


Figura 1.2. Evolución del área sembrada (Mhas) de los principales cultivos extensivos de granos en el período 2004-2018 en la Argentina. Tomado de Satorre y Andrade, 2021.

1.2 La abeja *Apis mellifera* como polinizador en agroecosistemas

La producción del 70% de los principales cultivos aumenta con la polinización animal, la cual depende principalmente de la abeja doméstica *Apis mellifera*, y representa un tercio de la producción mundial de alimentos (Klein et al., 2007). Los servicios de polinización son servicios ecosistémicos de relevancia, tanto para la producción de alimentos como para la conservación de especies no cultivadas, y también se ha reconocido su valor en términos socioculturales (IPBES, 2016). La distribución y adaptabilidad de las abejas melíferas a distintas regiones del mundo, su amplia dieta generalista y su capacidad de cubrir grandes áreas de vuelo, sumado a una larga tradición de apicultura como actividad humana y a la posibilidad de trasladar colmenas entre distintos cultivos, han convertido a esta especie en el principal polinizador manejado en sistemas agrícolas (McGregor, 1976; Klein et al., 2007). La polinización, es decir, la transferencia de polen desde las anteras hasta el estigma de flores de la misma especie, está mediada por animales en la gran mayoría de las angiospermas, especialmente insectos (polinización entomófila) y en particular por abejas (Tepedino, 1979; Kearns et al., 1998; Abrol, 2012). Aunque la polinización entomófila es irrelevante para una

gran parte de los cultivos, se ha estimado que el 35% de la producción global de alimentos depende de polinizadores (Klein et al., 2007). Por otra parte, las tierras agrícolas destinadas a cultivos dependientes de polinizadores están en continua expansión en todo el mundo, habiendo aumentado un 137% en el período 1961-2016 (Aizen et al., 2019). Esta tendencia global se refleja en los países de Sudamérica y, en particular, en Argentina, donde el incremento resultó ser de 142% y 178%, respectivamente.

En los últimos años, se ha registrado en diferentes países, un aumento en la pérdida de colonias de abejas melíferas utilizadas para servicios de polinización. En el caso particular de Estados Unidos y Europa, este fenómeno es denominado “Síndrome de Colapso de las Colmenas” y es atribuido a múltiples factores, que incluyen diferentes patógenos tales como virus, parásitos externos e internos, microsporidios, bacterias y hongos (Potts et al., 2010; González-Varo et al., 2013). Estos patógenos, a su vez, pueden presentar efectos sinérgicos entre ellos. Además de las diferentes plagas y enfermedades como impulsores naturales directos, hay muchos otros factores llamados antropogénicos, que conducen a la pérdida de colonias. Las principales causales de este tipo son el uso de agroquímicos y la pérdida y fragmentación de hábitats naturales, ambos como consecuencia de la intensificación de la agricultura y la expansión de la frontera agropecuaria (Benbrook, 2016). En muchos casos, es la interacción de estos factores naturales y antropogénicos, lo que conduce a la morbilidad y mortalidad de las colonias (Hristov et al., 2020).

Aún cuando *Apis mellifera* es el polinizador más importante económicamente, existen más de 20.000 especies conocidas de abejas (Michener, 2000; Fernández y Sharkey, 2006). En la Argentina, se han reconocido unas 1.100 especies de abejas silvestres nativas y al menos siete especies exóticas, introducidas accidentalmente o, en algunos casos, como polinizadores para ciertos cultivos (Roig-Alsina, 2008). Si bien el rol de los polinizadores silvestres en agroecosistemas ha sido reconocido en los últimos años (Garibaldi et al., 2013; Rader et al., 2016, 2020), la contribución relativa de las distintas especies varía en función de la diversidad de los ensambles de polinizadores, la cual puede modificarse en el espacio y en el tiempo (Rader et al., 2012; Gibbs et al., 2016). Más aún, los ensambles de polinizadores silvestres suelen ser menos diversos en regiones por fuera del área de distribución nativa de las plantas cultivadas, especialmente en áreas de gran intensificación agrícola, en donde los hábitats semi-naturales que ofrecen recursos alimenticios y sitios de nidificación se encuentran reducidos a pequeñas superficies fragmentadas. En tales paisajes, si bien los cultivos ofrecen abundantes recursos, la oferta se da de forma explosiva durante un periodo limitado, y los polinizadores dependen de la disponibilidad de otras fuentes de alimento y de sitios de nidificación cercanos para su supervivencia (Mandelik et al., 2012). Numerosos estudios muestran que distintos grupos de abejas se diferencian en rasgos tales como el tamaño corporal, la pilosidad, el largo de la probóscide, la recompensa floral recolectada o el tiempo invertido por visita, lo cual influye en su eficiencia de polinización (Hoehn et al., 2008; Klein et al., 2009; Martins et al., 2015). Así, ensambles diversos de polinizadores pueden propiciar interacciones interespecíficas que promuevan de manera indirecta la polinización del cultivo (Greenleaf y Kremen, 2006; Carvalheiro et

al., 2011). Sin embargo, en regiones con uso agrícola intensivo, el elenco de polinizadores silvestres puede limitarse a tan solo unas pocas especies numéricamente inferiores frente a las abejas melíferas introducidas al cultivo. En dichos escenarios, la abundancia de unas pocas especies dominantes, y no la riqueza de especies, resulta determinante en la provisión del servicio de polinización (Winfree et al., 2015).

Los agroquímicos son sustancias químicas tóxicas con un modo de acción específico, que suele afectar a una vía metabólica concreta de un organismo blanco (Lushchak et al., 2018). La exposición de las abejas a los plaguicidas se produce por la ingestión de residuos que se encuentran en el polen y el néctar de las plantas contaminadas (plantas de cultivo o malezas de los campos), (Sanchez-Bayo y Goka, 2014). A su vez, esta exposición puede producirse por vía oral, por contacto o, en menor medida, por la inhalación de partículas volatilizadas en el aire (Stanley et al., 2016). La probabilidad de exposición de las abejas a los residuos está estrechamente relacionada con la forma y el momento en que se aplica un plaguicida, la matriz y otras sustancias químicas con las que interactúa, y sus propiedades fisicoquímicas y su persistencia en el ambiente (Boyle et al., 2019). En general, el principal método de aplicación de pesticidas es mediante pulverizadores terrestres (Figura 1.3). Así mismo, es común el uso de pulverizadores manuales y, debido a la gran expansión de los monocultivos, el rociado aéreo (Giesy et al. 2000), (Figura 1.3). En cualquiera de estos métodos de aplicación puede ocurrir deriva, esto es, el desplazamiento de las gotas de pulverizado fuera del blanco; dispersándose en el aire, el suelo y en masas de agua aledañas a los cultivos (Matthews, 2006). De esta forma, cuando los plaguicidas se pulverizan sobre un cultivo, las gotas pueden ser dispersadas por el viento, pudiendo caer directamente sobre las abejas que están forrajeando o volando en las proximidades del cultivo tratado. La deriva de la pulverización también puede contaminar los recursos cercanos de forrajeo y anidación, como las flores silvestres, el suelo y el agua (Sánchez-Bayo y Goka, 2014). Esto puede conducir tanto a la ingestión de polen y néctar contaminados como a la exposición por contacto directo de las abejas que se posan o caminan sobre superficies contaminadas, como el suelo, el césped, las flores, el follaje y otros materiales de nido naturales o artificiales (Kopit y Pitts-Singer, 2018; Sgolastra et al., 2018; Gradish et al., 2019), (Figura 1.4). De esta manera, se hace imperativa la gestión responsable de los agroquímicos. En Argentina, las buenas prácticas agrícolas tienen como objetivo lograr el manejo y uso responsable de estos insumos durante todo su ciclo de vida: desde su descubrimiento y desarrollo, ciclo comercial y uso en el campo, hasta su eliminación. Según las buenas prácticas, los agroquímicos deberían usarse solamente cuando la intensidad de la plaga a combatir va a significar un riesgo sobre el rédito económico y únicamente en cultivos autorizados, respetando las dosis indicadas, los periodos de carencia y siguiendo estrictamente todas las indicaciones de la etiqueta referidas a cuestiones de seguridad (Cid, 2014). Además, en forma previa a la aplicación, es fundamental llevar a cabo una evaluación de las coberturas necesarias y de las condiciones climáticas (temperatura, humedad, vientos, inversiones térmicas) a fin de elegir adecuadamente las opciones para la misma (Elorza, 2021). Por otro lado, se debe constatar el buen funcionamiento del equipo de pulverización y la

calibración adecuada de la pulverizadora para lograr el número de gotas por cm^2 y diámetro promedio de gotas adecuado (Federico Elorza, CASAFE, 2021). Una vez finalizada la aplicación, se debe hacer un correcto reciclado de los envases plásticos vacíos, a través de un triple lavado a presión, según la Norma IRAM N° 12.069 y perforados para su inutilización, transformándolos en insumos para la elaboración de artículos útiles para la sociedad en una forma ambientalmente segura y sustentable (Federico Elorza, CASAFE, 2021).





Figura 1.3. Métodos de aplicación de agroquímicos. A) Terrestre. B) Aérea. Fotos tomadas de inta.gob.ar.

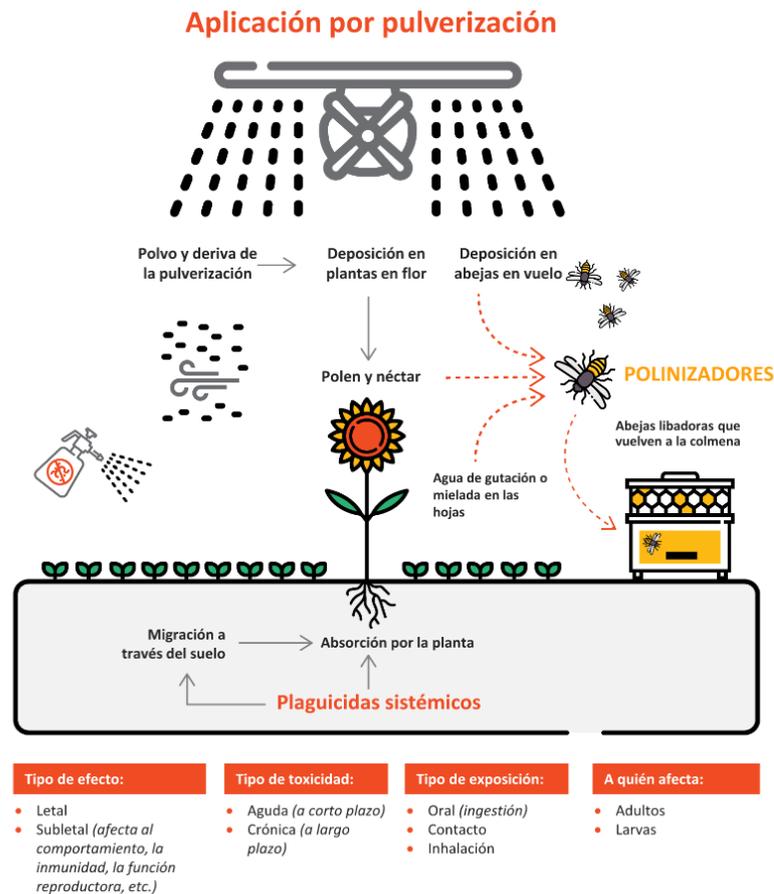


Figura 1.4. Rutas de exposición a agroquímicos. Fuente: Tribunal de Cuentas Europeo, a partir de información de la EFSA, 2020.

Las abejas melíferas realizan varios vuelos al día para recolectar recursos y, al hacerlo, pueden quedar expuestas a los productos agroquímicos que pueden estar presentes en las flores visitadas tras las aplicaciones (DeGrandi-Hoffman y Martin, 1993; Grüter y Farina, 2007). El néctar es, principalmente, fuente de hidratos de carbono y el polen lo es de proteínas, aunque también puede contener lípidos, vitaminas y minerales (Baker y Baker, 1975). Estos recursos son colectados mayormente de las flores y almacenados en el interior del nido para ser consumidos durante el otoño y el invierno, periodo durante el cual la oferta floral es muy baja o nula. Al ser un insecto social, la supervivencia de la colonia depende de las tareas colectivas de todos los individuos y de un crecimiento poblacional adecuado. Por lo tanto, es importante considerar no solo la exposición a pesticidas de la abeja recolectora, sino también la exposición de las larvas y de las abejas que realizan diversas tareas dentro de la colmena (Farina et al., 2019). Debido a la alta conectividad entre individuos que muestran las colonias, una vez que una abeja recolectora retorna a la colmena, puede contaminar a sus compañeras a través de contactos corporales casuales entre individuos, al compartir la comida a través de la distribución de alimento líquido boca a boca entre congéneres (trofalaxia) o al depositar los recursos contaminados en las celdas de almacenamiento. Las sustancias que se introducen en la colmena pueden permanecer almacenadas durante largos periodos y acumularse hasta que los recursos se utilicen como suministros para la colonia (Devillers

y Pham-Delègue, 2002). Es debido a esto que el estudio de los efectos crónicos subletales es de particular importancia en insectos sociales.

El polen recogido se compone de una mezcla de diferentes plantas presentes en número variable, lo que refleja la composición floral del entorno de la colmena. En las zonas de cultivo extensivo de plantas poliníferas, llegan a la colonia grandes cantidades de polen procedente de los cultivos. El pan de abeja se compone principalmente de polen, el cual puede estar contaminado por pesticidas. Las abejas añaden miel y secreciones de abeja al polen para convertirlo en una fuente nutricional de proteínas, siendo consumido en grandes cantidades por las abejas nodrizas y, en menor medida, por las larvas (Rortais et al., 2005).

Las colonias de abejas melíferas utilizadas para servicios de polinización se enfrentan a una menor diversidad de pólenes en su dieta, lo que, a su vez, puede traducirse en un déficit de nutrientes esenciales (Brodschneider y Crailsheim, 2010). Un monocultivo dependiente de los polinizadores representa un exceso de oferta de un único recurso floral sólo disponible durante unas pocas semanas, seguido de un largo período de escasez de alimento (Requier et al., 2015; Dolezal et al., 2019). En el caso de los cultivos de verano estudiados, tanto el girasol (*Helianthus annuus*) como el maíz (*Zea mays*) tienen un polen de baja calidad, con un nivel proteico por debajo del 20% necesario para que las abejas adquieran sus requerimientos nutricionales básicos (Somerville, 2001). Por otro lado, el néctar de girasol es muy atractivo para las abejas melíferas, siendo sus flores muy visitadas por ellas (Rortais et al., 2005). En el caso de la soja (*Glycine max*), sus flores son visitadas principalmente para la recolección de néctar (Chiari et al., 2005). En este sentido, las abejas melíferas dependen de la adecuada disponibilidad y recolección de polen para satisfacer la mayor parte de sus necesidades alimentarias. Por lo tanto, un equilibrio en la variabilidad de polen es fundamental para el crecimiento y la sostenibilidad de las colonias, y a su vez, afecta a muchos procesos posteriores, tales como el cuidado de las crías y el comportamiento de las obreras. Por otro lado, este equilibrio en la variabilidad de polen tiene una fuerte influencia sobre las interacciones entre dieta, nutrición, presencia de enfermedades y el estado del sistema inmunitario de la colonia (Smart et al., 2016). Por lo tanto, esta fuerte reducción de la diversidad espacial y la disponibilidad temporal de los recursos florales puede poner en peligro la supervivencia de las colonias de abejas melíferas, así como los servicios de polinización que proporcionan (Potts et al., 2010). Esta demanda nutricional podría ser complementada mediante el establecimiento y protección de zonas no cultivadas, con presencia de flora silvestre. Se ha reportado que la presencia de estas zonas *buffer* en los márgenes del cultivo provee de recursos florales más diversos, que resultan atractivas para los polinizadores (IPBES, 2016) y que, además, podrían reducir la deriva de pesticidas en ambientes adyacentes (Ucar y Hall, 2001). El informe de IPBES sugirió, además, que la "intensificación ecológica" (Tittonell, 2014), es una estrategia clave de mitigación. La intensificación ecológica destaca el rol de los polinizadores y la utilización de técnicas que intenten restaurar los balances ecológicos a través de la biodiversidad y, como consecuencia, depender menos de insumos externos o complementarlos (Tittonell, 2014).

De esta manera se podría aumentar la producción sin tener los altos costos ambientales y sociales del sistema tradicional (Garibaldi et al., 2016).

En los últimos años, se ha registrado que más del 35% de muestras de pan de abeja y miel, analizadas a partir de colmenas de todo el mundo, presentan residuos de agroquímicos (Mullin et al., 2010; Giroud et al., 2013; Mitchell et al., 2017; Song et al., 2018; Tong et al., 2018; Ligor et al., 2020; Raimets et al., 2020; Kadlikova et al., 2021; Xiao et al., 2022). A su vez, Rubio y colaboradores encontraron que el 59% de las muestras de miel analizadas, provenientes de diferentes países del mundo –entre ellos Argentina-, presentaron residuos de glifosato, con un promedio de 64 ng/g (Rubio et al., 2014). Este promedio es superior al límite reglamentario de 50 ng/g de presencia de glifosato en mieles no orgánicas para la Unión Europea (European Commission, 2016).

1.3 Organización social de la colmena

Las abejas melíferas son insectos holometábolos, por lo cual, la transición de larva a adulto ocurre durante un estadio pupal intermedio (Figura 1.5). A su vez, son insectos eusociales, es decir, presentan división reproductiva del trabajo, cooperación en el cuidado de la cría y solapamiento de distintas generaciones capaces de contribuir en las tareas dentro de la colonia (Michener, 1974). En la colonia conviven todos los estadios, por lo tanto, larvas y adultos comparten el mismo nicho. Dentro de los nidos de estos insectos, se realizan actividades con un alto grado de coordinación que involucran a un gran número de individuos. Dada esta división del trabajo, dentro de una colonia de abejas de *Apis mellifera* existen castas reproductivas y castas no reproductivas (Figura 1.5). En el primer caso, se encuentran la reina y los zánganos, únicos individuos que tienen el aparato reproductor desarrollado y son capaces de dejar descendencia fértil. La reina puede poner miles de huevos por día, y a su vez, es la principal responsable de mantener la cohesión de la colonia gracias a sus feromonas. En el segundo caso, la casta no reproductiva está compuesta por las obreras, que cooperan en el cuidado de cría y cuyas generaciones se solapan contribuyendo en la labor social (Wilson, 1971). De esta forma, una típica colonia de abejas melíferas está constituida por 10-40 mil abejas obreras (hembras), desde ninguno a varios cientos de zánganos (machos) dependiendo la época del año y una única reina, o hembra fértil (Winston, 1987), (Figura 1.5).

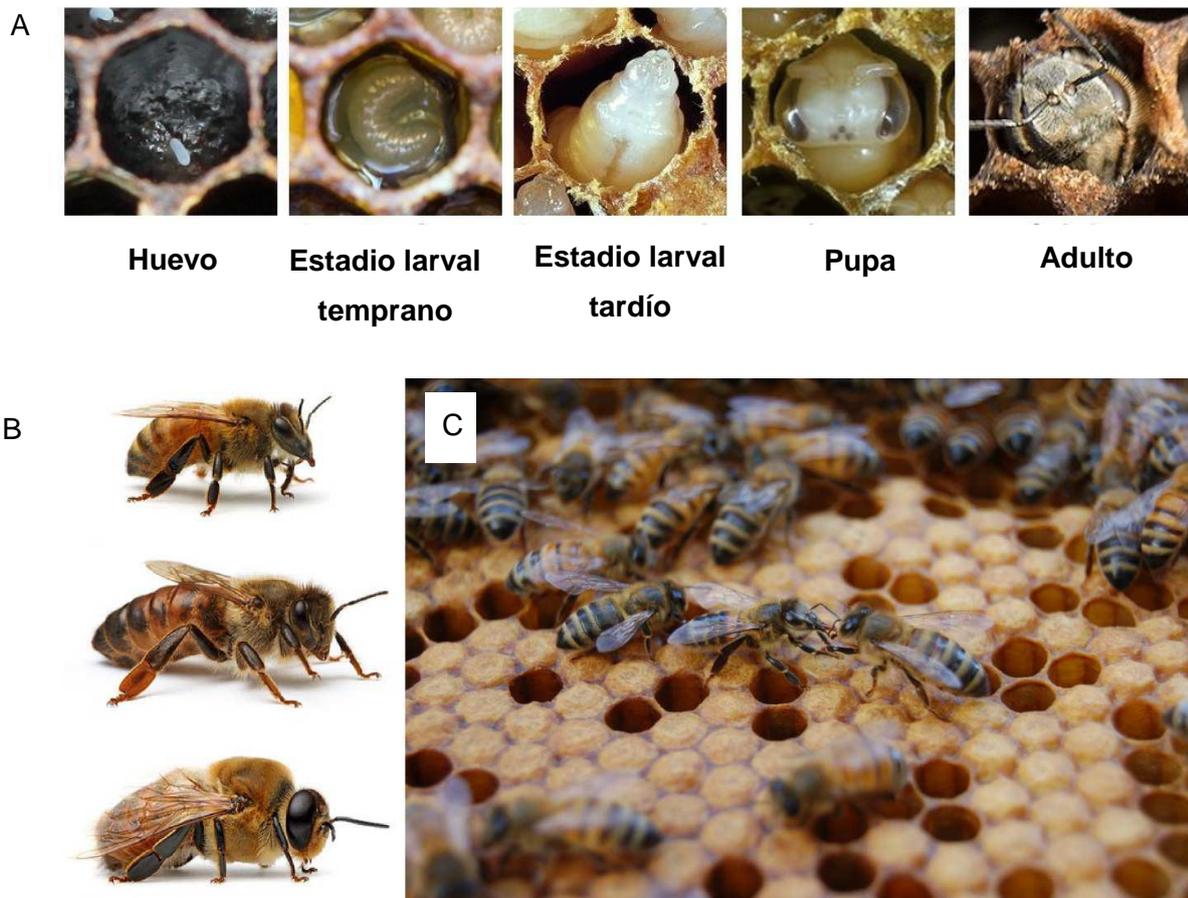


Figura 1.5. A) Ciclo de vida de una abeja obrera. **B)** Distintas castas: obrera, reina y zángano (de arriba hacia abajo). Crédito: Alexander Wild. **C)** Abejas obreras sobre un panal operculado, realizando diferentes tareas. En el centro de la imagen se puede ver a dos abejas haciendo trofalaxia. Credito fotográfico: grupo INSSOC.

Las obreras realizan diferentes actividades organizadas según su edad. Debido a este fenómeno denominado polietismo etario (Lindauer, 1952; Seeley, 1982; Winston, 1987), las obreras progresan en una serie de tareas programadas a medida que avanzan en edad, la cual comprende castas temporales o subcastas (Lindauer, 1952; Seeley, 1982). La abeja obrera comienza realizando tareas dentro del nido y, finalmente, se desempeña en el exterior de la colmena. Durante los primeros días de vida adulta, la abeja obrera desempeña actividades en el interior del nido relacionadas con la limpieza de celdas recientemente liberadas. Cuando alcanza los tres días de edad, se dedica a atender a la reina, sellar celdas y acicalar y alimentar a compañeras de nido. Además, se desempeña como nodriza al alimentar y cuidar a la cría, las larvas. Este patrón de comportamiento continúa durante los siguientes once días. Cuando alcanzan los trece días de edad adulta, la obrera deja el centro del nido donde está la cría para pasar a trabajar en la periferia, en la región de almacenamiento de alimento de la colmena. Allí, comienza a procesar el alimento: recibe néctar de las abejas recolectoras que ingresan a la colmena, lo convierte en miel y la deposita en las celdas superiores que funcionan como reserva de alimento. Además, coloca el polen en las celdas correspondientes,

ventila la colmena agitando las alas, colabora con las guardianas en la entrada de la colmena y continúa alimentando y acicalando a sus compañeras de nido. Finalmente, a partir de los 17-20 días de edad y hasta el final de su vida, la obrera realiza tareas en el exterior: recolecta recursos y defiende el nido (Lindauer, 1952; Seeley 1982), (Figura 1.6).

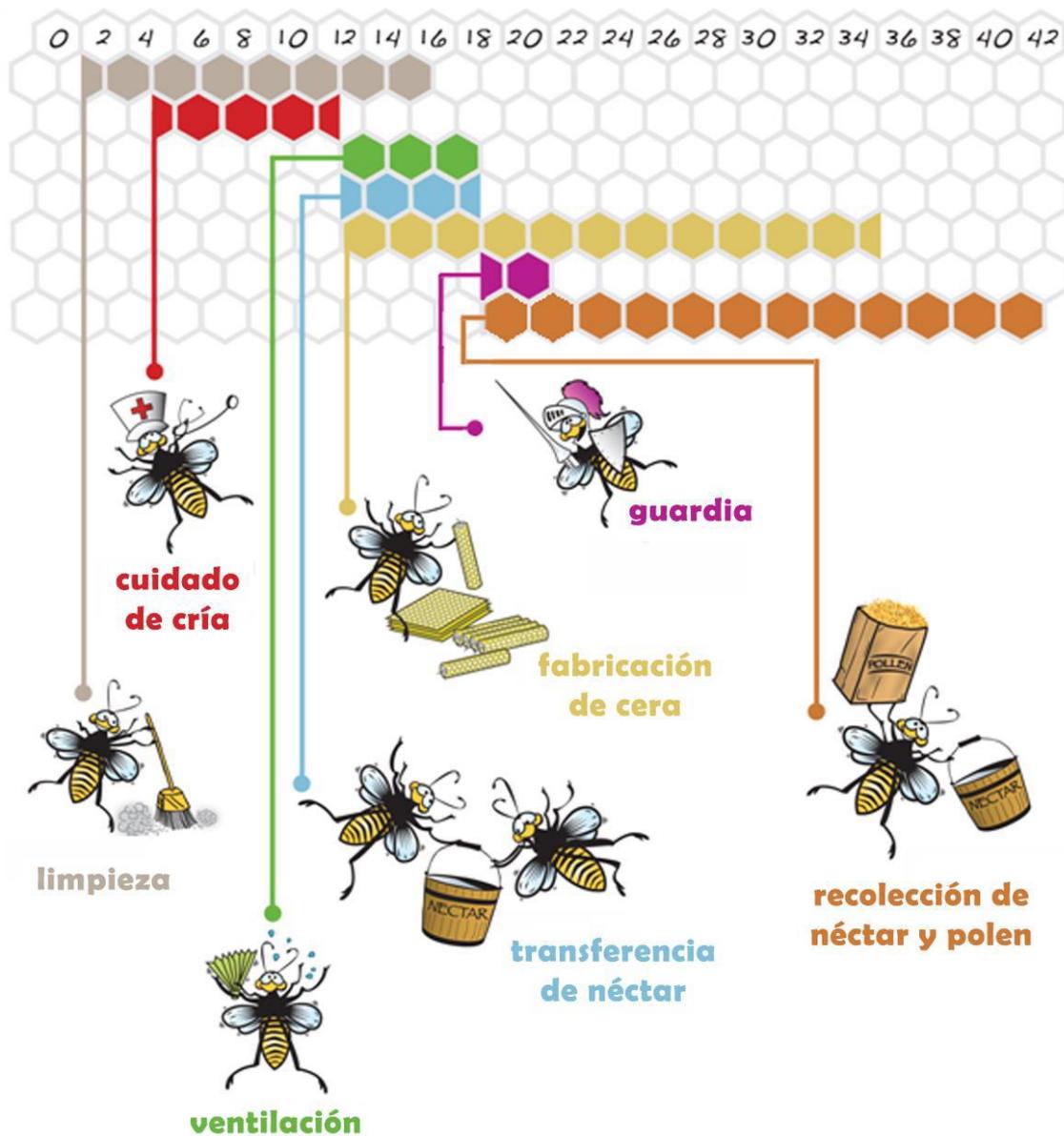


Figura 1.6. Polietismo etario. Tareas realizadas por una abeja obrera a lo largo de su vida adulta. Crédito: Grupo INSSOC.

La división de tareas se da gracias a que individuos de distintas edades presentan diferentes umbrales de respuesta que les permiten responder a ciertos estímulos de manera variada a escala colectiva (Robinson, 1992; Page et al., 1998). La transición de una tarea a otra requiere de cambios importantes en las habilidades sensoriales y cognitivas, las cuales están acompañadas por cambios

morfológicos y fisiológicos (Robinson, 1992). Las nodrizas presentan una hipertrofia de las glándulas hipofaríngeas, encargadas de la secreción de sustancias nutritivas con las que se alimenta a las larvas (Figura 1.7). Luego estas glándulas colapsan y las glándulas de cera, ubicadas entre los segmentos abdominales 2 y 4, comienzan su crecimiento. Es en este momento, cuando la obrera puede especializarse en tareas de construcción y refacción del nido (Figura 1.7). A continuación, las glándulas de cera se reducen y la abeja se dedica a la tarea de procesamiento de alimento. Finalmente, las recolectoras presentan una atrofia total de ambos tipos de glándulas (Winston, 1987). Por lo tanto, la edad fisiológica impone restricciones sobre la tarea a realizar por un individuo. Sin embargo, es importante subrayar que éste no es el único factor que controla la división del trabajo, sino que las actividades se ajustan de acuerdo con los requerimientos de la colonia y éstos varían según las condiciones tanto dentro como fuera del nido (Lindauer, 1952; Ribbands, 1955; Robinson, 1992; Seeley, 1995).

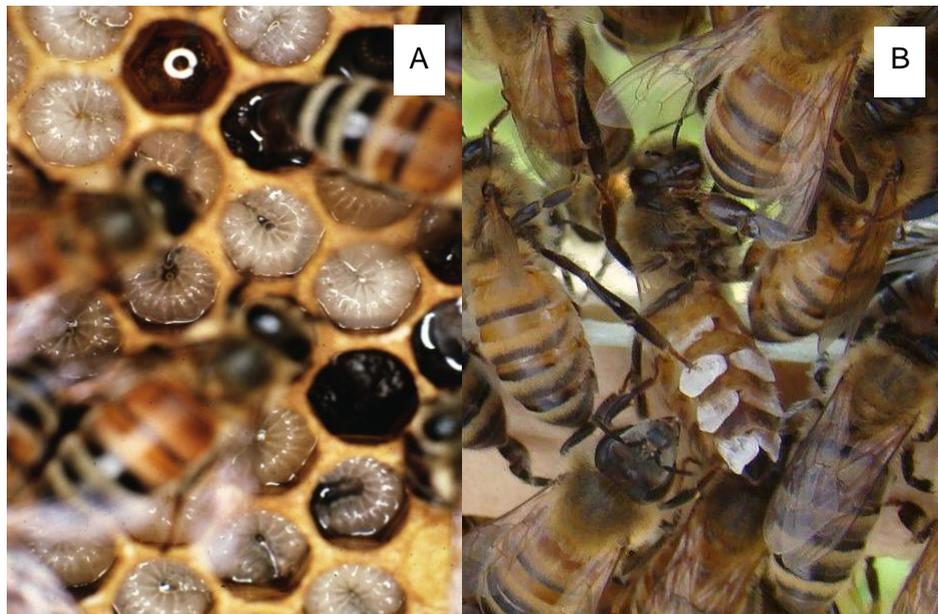


Figura 1.7. A) Abejas nodrizas alimentando a las larvas. Fuente: ecobugdoctor.files.wordpress.com. **B)** Abeja con escamas de cera producidas por glándulas cereras. Fuente: thebeekeepingfamily.blogspot.com.

1.4 El comportamiento de la abeja melífera y su interacción con el ambiente

1.4.1 El comportamiento recolector de *Apis mellifera*

En un ambiente dinámico en el cual la oferta floral no se mantiene constante en el tiempo, la recolección de recursos es un proceso altamente coordinado e implica un equilibrio entre decisiones que maximicen la eficiencia de recolección individual de una fuente rica a corto plazo y aquellas que optimicen la explotación de recursos considerando a la colonia como un todo a largo plazo (Núñez, 1982). El rango de recolección de una colonia promedio en un ambiente natural tiene una distancia modal, mediana y media de 0,7, 1,2 y 2,2 km a la redonda, respectivamente (Seeley, 1995). Estas distancias se reducen a unos cientos de metros cuando las colonias están rodeadas de cultivo. El pasaje de tareas dentro del nido a la recolección en el exterior involucra el desarrollo de nuevas habilidades, tales como la navegación en vuelo, la detección de recursos, la recolección y la comunicación de esta información al resto de la colonia. A edades recolectoras, el desarrollo del sistema nervioso se considera concluido (Masson y Arnold 1987). Los adultos recolectores aprenden aromas florales mientras visitan flores, resultando en memorias asociativas que se almacenan en diferentes regiones del cerebro (Galizia et al., 2012; Menzel, 2012; Sandoz y Giurfa, 2012). Estas memorias una vez reactivadas guían a la abeja hasta el estímulo aprendido mostrando constancia floral (Lindauer 1961; Seeley 1995).

Las abejas recolectan néctar, polen, agua y resinas de los entornos cercanos a la colmena. El néctar es la fuente principal de hidratos de carbono, aunque también contiene aminoácidos, vitaminas, minerales, lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, los cuales pueden afectar la preferencia de las abejas (Nicolson et al., 2007; Roy et al., 2017). El polen es la fuente natural de proteínas y aminoácidos esenciales, y constituye el principal alimento de las larvas de la casta obrera en forma de pan de abeja (Herbert, 1992; Zhu et al., 2017). La cantidad de cría y de reservas de alimento de la colonia, así como la oferta floral disponible en el ambiente, la cual es variable en términos cuantitativos y cualitativos de acuerdo a la estación del año, influirá en el total de obreras destinadas a la recolección de néctar o de polen (Free, 1967; Pankiw et al., 1998; Pernal y Currie, 2001).

Las abejas melíferas son altamente generalistas, pudiendo interactuar con numerosas especies de plantas tanto cultivadas como silvestres, lo cual les permitió adaptarse a los distintos ambientes donde viven. Si bien las abejas obtienen néctar y polen de una gran variedad de plantas, su composición química varía y no todos los pólenes cumplen con los requerimientos nutricionales de las abejas, debido a un bajo contenido de proteína cruda o a la deficiencia en algún aminoácido esencial (Somerville, 2001). El acceso a una dieta diversificada resulta fundamental, dado que una

dieta polifloral está directamente relacionada con mayores niveles de inmunidad individual y social respecto de una dieta monofloral (Alaux et al., 2010).

Al regresar a la colmena, las abejas recolectoras descargan el alimento que traen consigo. En el caso del néctar, éste es transferido de manera directa por trofalaxia a otras compañeras de nido, las que posteriormente procesan y almacenan este recurso (von Frisch, 1967). Por otro lado, despliegan dentro del nido un comportamiento estereotipado denominado la danza de reclutamiento (von Frisch 1967). Este despliegue es considerado una señal multi-componente que brinda información sobre la presencia, localización y calidad de una fuente de alimento, además de poder reactivar memorias en seguidoras de la danza (von Frisch 1967; Riley et al. 2005; Thom et al. 2007; Grüter y Farina 2009).

1.4.2 Aprendizaje asociativo

Los animales se desarrollan en ambientes donde los estímulos sensoriales abundan y, por lo tanto, deben ser capaces de reconocer los importantes para su supervivencia. Es por ello que son cruciales las experiencias previas que les permitirán diferenciar aquellos estímulos relevantes de los que no lo son. En este sentido, el aprendizaje se define como el proceso que genera un cambio en el comportamiento debido a una experiencia comportamental (Pavlov, 1927; Kandel et al., 1991; Carew, 2000).

Durante la recolección de alimento las abejas aprenden claves olfativas, visuales y gustativas de las flores, las cuales les permiten orientarse y encontrar una fuente rica de recursos en los sucesivos ciclos de recolección (von Frisch, 1967). En un ambiente fluctuante, la supervivencia de la colonia dependerá del aprendizaje de nuevas claves que guiarán a las recolectoras a las fuentes de alimento más productivas, de manera de optimizar la explotación de los recursos disponibles.

El aprendizaje asociativo surge al establecerse un vínculo entre al menos dos estímulos contingentes, uno de los cuales es un estímulo excitatorio o refuerzo y el otro un estímulo a priori neutro. La contingencia se establece cuando un estímulo neutro de cualquier modalidad sensorial alcanza un valor predictivo para el animal, es decir, predice al estímulo excitatorio. Estas asociaciones permiten al animal reducir su nivel de incertidumbre (Menzel, 1999; Giurfa, 2007). En este sentido, la capacidad de las abejas melíferas de asociar claves olfativas y visuales de las flores con su recompensa (por ejemplo, un néctar rico en azúcares) ha sido muy bien estudiada (von Frisch, 1919; Menzel y Erber, 1978; Menzel, 1999).

1.4.2.1 Condicionamiento olfativo clásico y operante

En el caso particular de las abejas, la búsqueda de fuentes de alimento fuera de la colmena se basa en dos tipos de aprendizaje asociativo: (1) el condicionamiento operante (Skinner, 1938), en el que se construye una contingencia entre el volar o caminar hacia un estímulo discriminativo (respuesta del insecto) y el resultado de esa respuesta (volar hacia una flor y obtener alimento), y entre el estímulo discriminativo (olor floral, color o patrones florales) y la respuesta del insecto; y (2) el condicionamiento clásico (Pavloviano), en el cual se construye una contingencia entre las claves florales (EC) y la recompensa de néctar (EI). Ambos tipos de aprendizaje asociativos se vinculan con el mismo contexto apetitivo de búsqueda de alimento, pero implican distintos tipos de asociaciones que han sido abordadas experimentalmente (Sandoz et al., 2000).

En el caso del condicionamiento olfativo clásico, existe un protocolo bien establecido para abejas melíferas bajo el paradigma de la respuesta de extensión de probóscide (Takeda, 1961; Bitterman et al., 1983). En este protocolo se amarra a las abejas experimentales de manera tal que sus movimientos queden limitados a las antenas y piezas bucales (Frings, 1944). De esta forma, es posible presentar de forma ordenada los diferentes estímulos. La respuesta de extensión de probóscide (REP) es una respuesta refleja e innata que ocurre en la naturaleza cuando una abeja contacta con sus antenas o tarsos, el néctar de las flores. En el laboratorio, es posible evocar dicha respuesta refleja al contactar las antenas de abejas amarradas con un palillo embebido en solución azucarada. Se comienza con la presentación de un olor que funciona como estímulo neutro, es decir que inicialmente no genera la respuesta REP. Este olor se presenta solapado en el tiempo con el contacto de solución azucarada en las antenas (EI, que sí genera REP). Al cabo de repetidas presentaciones pareadas de ambos estímulos, seguidas de la ingesta de la solución azucarada, se establece una asociación entre ambos estímulos y el estímulo que antes era neutro ahora es un estímulo condicionado (EC) y, por lo tanto, es capaz por sí mismo de evocar una respuesta REP que ahora es una respuesta condicionada (Figura 1.8).



Figura 1.8. Condicionamiento olfativo.

1.4.3 Sensibilidad gustativa

La quimiorrecepción por contacto o gusto es una modalidad muy importante en los insectos dado que les permite seleccionar su alimento con cuidado. Las abejas se encuentran con diferentes tipos de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), ácidos orgánicos, lípidos, minerales, vitaminas, compuestos aromáticos, aminoácidos, enzimas, compuestos fenólicos y sales, al coleccionar néctar, polen, agua y resinas (Harborne, 1982). De manera que la quimiorrecepción resulta crucial, no solo para las abejas recolectoras, sino también para las abejas jóvenes que cumplen funciones dentro del nido y que entran en contacto con estos mismos compuestos cuando procesan los recursos que son transportados hacia la colmena por parte de las pecoreadoras.

En la abeja *A. mellifera*, los órganos quimiosensoriales principales son las antenas, las piezas bucales y los segmentos distales del primer par de patas. Los receptores gustativos se encuentran dentro de cavidades o pelos sensoriales llamadas sensilias (Goodman, 2003). Se ha visto que las sensilias antenales responden a la estimulación con sacarosa incluso más que las ubicadas en la probóscide y los tarsos (Whitehead y Larsen, 1976; de Brito Sánchez et al., 2008). Esto destaca el rol fundamental que tienen las antenas como órganos gustativos al momento de evaluar una potencial fuente de alimento.

1.5 Fisiología de la abeja melífera

1.5.1 Nutrición y detoxificación de xenobióticos

Una de las características más llamativas del genoma de *A. mellifera* es que contiene un número considerablemente menor de genes que el genoma de otras especies de insectos. Su genoma contiene unos 11.000 genes codificadores de proteínas (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006), mientras que, por ejemplo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* tiene unos 13.500 y el mosquito de la malaria *Anopheles gambiae* unos 14.000 (Holt et al., 2002). Además, su genoma presenta un déficit en relación a todas las familias de genes asociadas a la detoxificación de xenobióticos (Claudianos et al., 2006).

La detoxificación de xenobióticos implica la conversión de sustancias liposolubles en metabolitos hidrosolubles y excretables (Berenbaum y Johnson, 2015). En la Fase I de la detoxificación, la estructura de la toxina se altera enzimáticamente y se vuelve incapaz de interactuar con los sitios de acción lipofílicos. Esta función es realizada principalmente por los citocromos *P450* monooxigenasas (*P450*) y las carboxilesterasas (CE), aunque también pueden intervenir otras enzimas como las monooxigenasas dependientes de flavina y las ciclooxigenasas (Sehlmeyer et al., 2010; Xu et al., 2013). Las reacciones de la Fase II suelen implicar la conjugación de los productos de la Fase I, para su solubilización y transporte. Las principales enzimas de esta fase son las glutatión-S-transferasas,

aunque éstas también puedan participar de la Fase I. Otras enzimas que también participan de la Fase II de detoxificación en insectos son las glicosiltransferasas, fosfotransferasas, sulfotransferasas, aminotransferasas y glicosidasas (Xu et al., 2013). Por último, la Fase III implica el transporte de los productos conjugados en la Fase II fuera de las células para su excreción. Entre las proteínas que participan en este proceso se encuentran las proteínas de resistencia a múltiples fármacos y otras transportadoras de unión a ATP (Dermaauw y Van Leeuwen, 2014).

En esta tesis nos enfocaremos en las enzimas que participan de la Fase I de la detoxificación, particularmente, los citocromos *P450*. Las abejas utilizan estas enzimas tanto para detoxificar los flavonoides de la miel y el polen (Mao et al., 2009), como para metabolizar los diferentes agroquímicos a los que se ven expuestas en los entornos agrícolas (Iwasa et al., 2004; Niu et al., 2010; Johnson et al., 2013). Paradójicamente, a pesar de esta dependencia de los *P450*, las abejas melíferas cuentan con solo 46 genes de esta familia en su genoma, siendo el más reducido comparando incluso con otras especies de himenópteros (Berenbaum y Johnson, 2015), (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Citocromos *P450* presentes en *Apis mellifera* y otras especies de insectos, separados por clan. El clan *CYP3*, que incluye las familias *CYP6* y *CYP3*, es el que cumple las funciones detoxificantes. Tomado de Berenbaum y Johnson, 2015.

	<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Pogonomyrmex barbatulus</i>	<i>Nasonia vitripennis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
	Hymenoptera	Hymenoptera	Hymenoptera	Hymenoptera	Diptera
	abeja eusocial	abeja eusocial	hormiga eusocial	avispa solitaria	mosca solitaria
Clan <i>CYP3</i>	28	27	40	49	36
Clan <i>CYP4</i>	4	4	18	29	32
Clan <i>CYP2</i>	8	7	7	7	6
Mitocondrial	6	6	7	7	11
<i>P450s</i> total	46	44	72	92	85

Este déficit en su genoma podría ser una consecuencia evolutiva de la eusocialidad de *A. mellifera*. En cuanto a la inmunidad, las abejas muestran defensas de comportamiento cooperativo contra parásitos y patógenos, incluyendo la “fiebre social” para actuar contra las bacterias sensibles a las altas temperaturas, la recolección de resinas vegetales antimicrobianas para la producción de propóleos y la eliminación de la cría enferma, que en conjunto, constituyen un sistema de inmunidad social (Cremer et al., 2007; Wilson et al., 2013), que puede haber reducido la dependencia de la inmunidad fisiológica codificada en el genoma. Aún no está claro si los comportamientos sociales contribuyen de forma comparable a la detoxificación de xenobióticos, provocando o compensando la reducción de los inventarios genéticos de desintoxicación. Los mecanismos de comportamiento que pueden reducir la exposición a las toxinas incluyen la búsqueda selectiva de alimentos, detectando y evitando a las toxinas en el néctar y el polen, la dilución de las toxinas mediante la mezcla de néctares y pólenes, la transformación del néctar en miel y el cultivo de hongos y otros microbios para convertir el polen en pan de abeja. Estos comportamientos pueden reducir significativamente el

número y la concentración de toxinas que requieren un procesamiento enzimático, una especie de "fase 0" en el esquema tradicional de detoxificación de xenobióticos (Berenbaum y Johnson, 2015), (Figura 1.9).

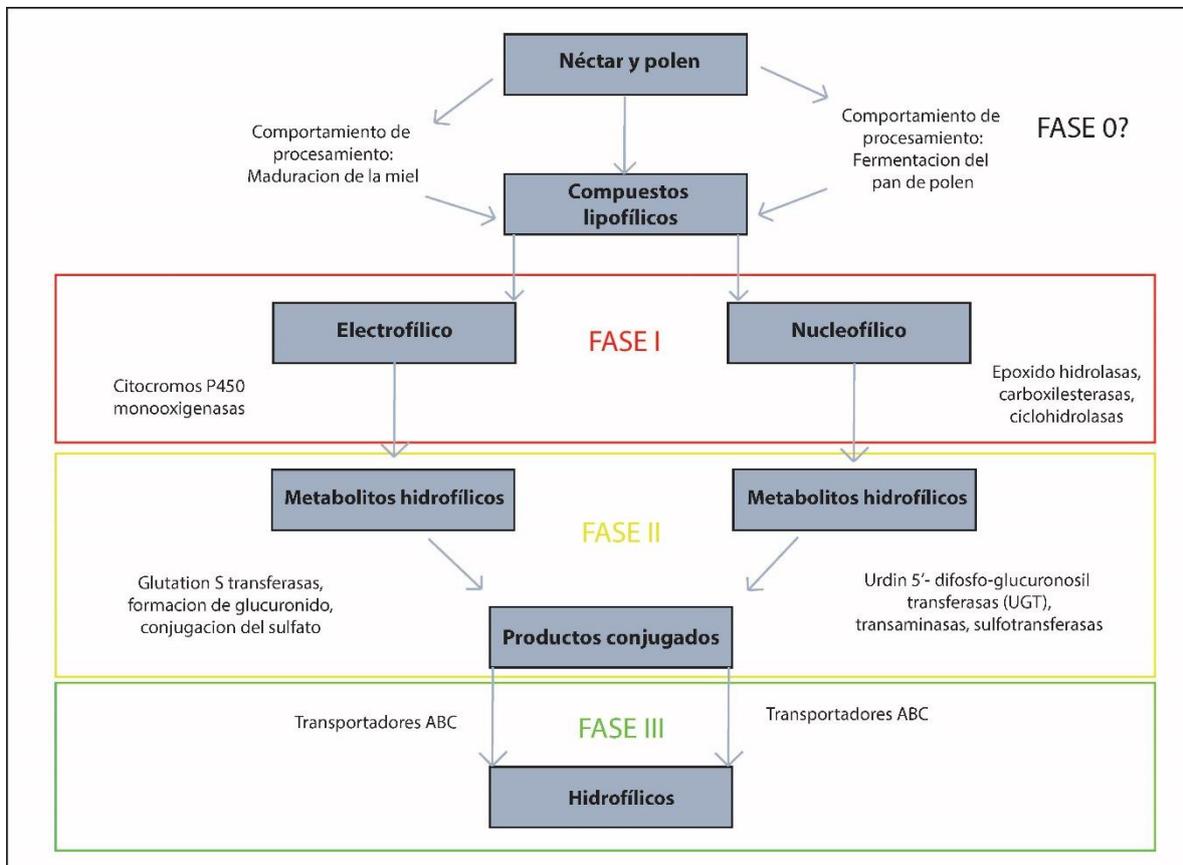


Figura 1.9. Esquema del proceso de detoxificación en *A. mellifera*, con las enzimas asociadas a cada fase. El comportamiento social de procesamiento de recursos alimenticios es propuesto como Fase 0. Adaptado de Berenbaum y Johnson, 2015.

La nutrición cumple un rol importante en la capacidad de detoxificación de xenobióticos. Se ha evidenciado una fuerte superposición entre la expresión de genes de respuesta a pesticidas y genes de respuesta a la dieta (Schmehl et al., 2014), registrándose, además, que la expresión de varios miembros de las familias *CYP4* y *CYP6* de los citocromos *P450* disminuye debido a una dieta empobrecida en abejas nodrizas (Corby-Harris et al., 2014). A su vez, se observó que la ingesta de polen afecta los niveles de transcripción de los *P450* (Alaux et al., 2011; Corby-Harris et al., 2014), registrándose que una dieta polifloral se relaciona directamente con mayores niveles de inmunidad individual y social respecto de una dieta monofloral (Alaux et al., 2010).

1.5.2 Bases genéticas de la sociabilidad

La eusocialidad ha surgido de forma independiente al menos 11 veces en la clase *Insecta* (Wilson y Hölldobler, 2005). A pesar de la existencia de una vasta cantidad de trabajos teóricos sobre la evolución de la eusocialidad, se sabe relativamente poco sobre los cambios moleculares asociados a dicha evolución. Woodard y colaboradores (2011) examinaron los patrones de evolución molecular en tres orígenes independientes de la eusocialidad mediante la secuenciación de los transcriptomas de nueve especies de abejas con diferentes grados de sociabilidad y combinaron estos datos con la secuencia del genoma de la abeja melífera para generar alineaciones de secuencias ortólogas para 3.647 genes. De esta forma, encontraron un conjunto de 212 genes compartidos con una evolución acelerada en todos los linajes eusociales estudiados, así como también, conjuntos únicos de 173 y 218 genes específicos de los linajes altamente eusociales o de los sociales primitivos, respectivamente. Los genes implicados en la transducción de señales, el desarrollo de las glándulas y el metabolismo de los carbohidratos se encuentran entre los genes más destacados que evolucionan rápidamente en los linajes eusociales. Estos hallazgos proporcionan un punto de partida para vincular cambios genéticos específicos con la evolución de la eusocialidad (Woodard et al., 2011). De hecho, se encontró un alto grado de solapamiento de genes en la expresión de fenotipos sociales en diferentes trabajos que estudiaron las bases genéticas de la sociabilidad (Jones et al., 2017). Adicionalmente, estas vías genéticas muestran una profunda conservación dentro del reino animal (Rittschof et al., 2014; Shpigler et al., 2017b). Al estudiar la variación fenotípica natural de la especie *Lasioglossum albipes*, una abeja facultativamente social, se encontró que muchas de las diferencias genéticas de estas variantes (solitarias y sociales) ocurren en regiones reguladoras, incluyendo la *sintaxina 1a* (*syx1a*), un gen que regula la liberación de neurotransmisores y que ha sido implicado en los trastornos del espectro autista (TEA) en humanos (Kocher et al., 2018).

Es a partir de estos trabajos, que decidimos analizar los cambios de expresión génica a partir de la exposición a diferentes agroquímicos de post emergencia, de diferentes grupos de genes relacionados a las bases genéticas de la sociabilidad en abejas. Los genes elegidos para el estudio de esta tesis son, por un lado, los genes de rápida evolución en todos los linajes de abejas eusociales *brahma* y *syntaxin7* (*syx7*), ambos genes sobre expresados en comparación a los linajes no eusociales. *Brahma* es un gen relacionado tanto a la remodelación de la cromatina como a la oogénesis y axonogénesis, mientras que *syx7* es una proteína de membrana, con actividad receptora axónica (Tabla 1.2). Por otro lado, los genes de rápida evolución en linajes de abejas altamente eusociales *enolase* y *pelle*. El primero de ellos es una enzima asociada a la glicólisis, mientras que el segundo es una quinasa, relacionada a la respuesta inmune y la orientación axónica (Tabla 1.2). A estos genes, sumamos la *syx1a*, que como se mencionó antes, regula la liberación de neurotransmisores y se ha relacionado con el autismo humano (Kocher et al., 2018) y la *acetilcolinesterasa* (*AChE*), que codifica la enzima para la ruptura catalítica de la *acetilcolina* (*ACh*) y

que podría tener un rol importante en la adquisición de memoria y aprendizaje en las abejas melíferas (Silman y Sussman, 2008).

Tabla 1.2. Genes de rápida evolución en linajes de abejas eusociales. En negrita los estudiados en la presente tesis. Adaptado de Woodard et al., 2011.

Gen	Función	<i>A. mellifera</i>	Rank	p
Evolución acelerada en todos los linajes eusociales				
<i>girdin</i>	proteína de unión a Actina; regulación del tamaño celular	GB 14448	4	0,00000
<i>dihidrolipoamida deshidrogenasa 1</i>	enzima; glucólisis	GB 17626	8	0,00006
<i>brahma</i>	remodelador de cromatina; axonogénesis y oogénesis	GB 30507	11	0,00015
<i>syntaxin7</i>	proteína de membrana; actividad receptora SNAP	GB 14433	15	0,00020
Evolución acelerada en linajes altamente eusociales				
<i>fosfofructoquinasa</i>	enzima; glucólisis	GB 17113	3	0,00000
<i>enolase</i>	enzima; glucólisis	GB 15039	4	0,00000
<i>pelle</i>	serina/treolina quinasa; respuesta inmune y orientación axónica	GB 16397	5	0,00000
<i>nicotinato fosforribosiltransferasa</i>	enzima, metabolismo del nicotinato	GB 15603	24	0,00004
<i>RhoGAP100F</i>	GTPasa; axonogénesis y traducción de señales	GB 15150	25	0,00005

1.6 Importancia de la abeja *Apis mellifera* como biosensor

El uso de especies centinelas permite la recolección de datos que facilitan la estimación de riesgo en la salud pública, identificación de contaminación y determinación de impacto ambiental (van der Schalie et al., 1999; Carignan y Villard, 2002). El estudio de la fisiología y el comportamiento de las especies animales que forman parte de los agroecosistemas, y que, por lo tanto, están continuamente expuestos al uso de agroquímicos y la homogenización del entorno, permite evidenciar los efectos subletales, más sutiles y difíciles de detectar. Un ejemplo de ellos son los organismos polinizadores, los cuales están íntimamente relacionados con el ambiente que habitan y, por lo tanto, son considerados bioindicadores (Kevan, 1999; Devillers y Pham-Delegue, 2002).

La abeja *A. mellifera* es una excelente especie centinela debido a su amplia distribución geográfica, a sus hábitos sedentarios y sus numerosas poblaciones. Debido a su estructura social, puede estudiarse en múltiples niveles, tanto a nivel de abeja individual, como a nivel de colonia. Por otro lado, esta especie también permite el análisis de los efectos subletales de la exposición a agroquímicos en diferentes etapas de su desarrollo, tanto a nivel de larva como en las diferentes subcastas de las obreras. A su vez, tiene la ventaja de que tanto las abejas adultas como las larvas, son relativamente fáciles de muestrear en el campo, sin impactar significativamente al nivel

poblacional de las colonias, dada su alta capacidad reproductiva (800 - 2.000 individuos diarios). Otra característica importante de esta especie, es que presenta ciclos de vida cortos, que varían de menos de dos meses en verano a alrededor de tres meses en invierno. Esto permite un recambio generacional importante de las colonias.

Como se mencionó anteriormente, debido al comportamiento recolector de las abejas obreras de mayor edad, miles de abejas por colmena realizan varias salidas diarias visitando distintos ambientes (Winston, 1987), retornando al nido con néctar y polen que pudo haber estado expuesto a los agroquímicos administrados en el entorno agrícola. Los recursos recolectados y almacenados en grandes cantidades dentro de las colmenas son convertidos en diferentes productos, como la miel, y utilizados para la supervivencia y el crecimiento de la colonia (Winston, 1987). Esto brinda la posibilidad de evaluar la presencia de trazas de agroquímicos en estos productos y el efecto de acumulación de sustancias, tanto en la abeja como en la colonia misma (Kirchner, 1999). Estas características de la especie la vuelven una excelente herramienta para el monitoreo ambiental (Devillers y Pham-Delegue, 2002).

1.7 Objetivos

El objetivo general de esta tesis es correlacionar las respuestas de la abeja *A. mellifera* referidas a su biología social, comportamiento y fisiología, con la presencia de pesticidas en los productos de colmena y con el grado de disturbio ambiental, definido por las prácticas agrícolas utilizadas y la biodiversidad vegetal de sus entornos. Para ello se analizarán distintas variables, antes y después de la aplicación de pesticidas, en colmenas ubicadas en un ecosistema agrícola.

1.7.1 Objetivos particulares e hipótesis

1. Evaluar los niveles de actividad de las colmenas que permitan inferir la actividad recolectora general, a través de mediciones en piquera y de trampas de polen.
2. Evaluar parámetros vinculados a las capacidades quimiosensoriales y cognitivas de abejas recolectoras capturadas en los distintos apiarios y momentos mediante bioensayos que permitan comparar respuestas comportamentales.
3. Evaluar las respuestas detoxificantes e inmunológicas a nivel molecular en muestras de tubo digestivo de abejas que realizan tareas en el interior de la colmena y en larvas.
4. Evaluar la expresión de genes vinculados a las bases genéticas de la sociabilidad en muestras de cerebros de abejas recolectoras de colmenas ubicadas en los distintos entornos agrícolas estudiados.

5. Evaluar los niveles de metabolitos indicadores de la presencia de agroquímicos en abejas, mieles, ceras y polen recolectado provenientes de esas mismas colonias.

En todos los casos, la hipótesis específica es que las variables estudiadas se verán afectadas por la administración de agroquímicos y la menor diversidad floral de los entornos.

Metodología general

2.1 Sitio de estudio

Los muestreos y los estudios comportamentales *in situ* fueron realizados en la estancia San Claudio, situada en la localidad de Carlos Casares, provincia de Buenos Aires (35°57'7.29" S, 61°13'6.33" O) y con una superficie de 5.467 ha, dividida en 35 lotes (Figura 2.1). Dicha estancia es administrada por la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, la cual nos habilitó la estadía y el trabajo de campo. Las campañas se realizaron durante la etapa de desarrollo de cultivos de verano, tales como soja (*Glycine max*), maíz (*Zea mays*) y girasol (*Helianthus annuus*), entre los años 2016 y 2021. La estancia contaba con tres apiarios ya instalados previamente, donde se realizaron los muestreos. Dichos apiarios incluían entre 20 y 50 colmenas de abejas melíferas tipo Langstroth (Figura 2.1). A su vez, cada colmena contaba con diez cuadros, una reina fecundada, tres a cuatro cuadros con cría operculada y limitada reserva de alimento. Estos colmenares estaban ubicados en tres lotes diferentes, cada uno dentro de pequeñas áreas de monte, rodeadas a su vez, por diferente composición de cultivos y proporción de cultivo/flora silvestre en sus inmediaciones (Figura 2.1). La mayor parte de la flora silvestre presente en los alrededores de los apiarios, estaba compuesta de especies melíferas, tales como *Diplotaxis tenuifolia*, *Conyza bonariensis*, *Styphnolobium japonicum*, *Verbena sp.* Además, malezas como *Sorghum halepense*, *Amaranthus palmeri*, *Chloris* y *Trichloris*, diferentes especies de Cucurbitáceas silvestres, cardos, eucaliptus, tréboles, dientes de león y acacias (Figura 2.2). El porcentaje de flora silvestre presente en las inmediaciones de cada apiario fue calculado con una imagen satelital de Google Earth de la estancia y sus lotes, en la cual se delimitó un área de forrajeo para cada apiario (una circunferencia de 2 km de diámetro, Figura 2.1). De esta manera, dentro de cada circunferencia de navegación, se calculó el área ocupada por cultivo y el área ocupada por flora silvestre, y consecuentemente, el porcentaje de vegetación no cultivo presente en los alrededores de cada apiario. Esto se repitió en cada temporada de verano y se verá en la sección particular de cada situación de campo estudiada. En función de esto, se definió el nombre de los lotes en relación a un porcentaje creciente de flora silvestre presente en sus inmediaciones. De esta forma, el apiario del lote A es el que disponía de menor porcentaje de vegetación no cultivo en su área de navegación, el apiario del lote B es el de porcentaje medio y el apiario del lote C el de mayor porcentaje de flora silvestre presente. En todos los casos, los colmenares estaban ubicados a una distancia de al menos 2,5 km entre sí (Figura 2.1). De acuerdo con estudios previos, una colonia de abejas melíferas promedio, ubicada en entornos agrícolas, realiza la mayor parte de su actividad recolectora dentro de unos pocos cientos de metros

de la colmena, mientras que, en áreas boscosas, se observa una distancia modal, mediana y media de 0,7, 1,6 y 2,2 km a la redonda, respectivamente (Seeley, 1995). Por lo tanto, sería poco probable un solapamiento en las áreas de recolección de las colonias de los diferentes apiarios.

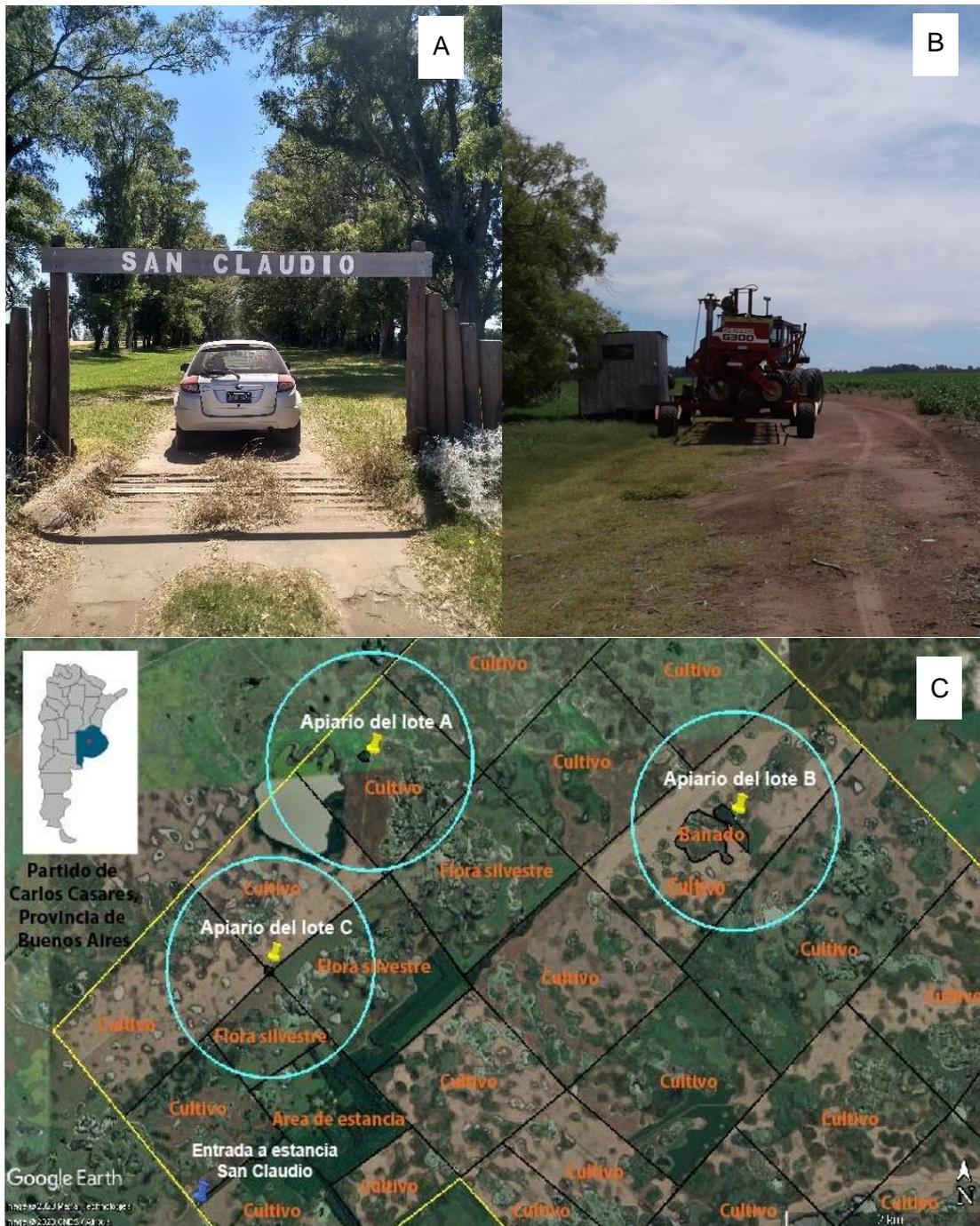


Figura 2.1. A) Entrada y C) mapa de la estancia San Claudio. Partido de Carlos Casares, Provincia de Buenos Aires. B) Maquinaria agrícola en uno de los lotes de cultivo. Crédito fotográfico: grupo INSSOC. Mapa y delimitación de áreas de navegación realizados en Google Earth.



Figura 2.2. Ejemplos de flora silvestre presente en los alrededores de los apiarios estudiados en la estancia San Claudio. **A)** Especie de Cucurbitácea silvestre, **B)** *Amaranthus palmeri*, **C)** *Verbena sp.*, **D)** *Styphnolobium japonicum* y **E)** *Cirsium vulgare*. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

En cada temporada de verano, se realizó un muestreo previo a la aplicación de agroquímicos de post-emergencia y un segundo muestreo de entre quince y treinta días posteriores a dicha administración con la finalidad de evaluar las diferencias registradas entre un momento y otro.

2.2 Abordaje comportamental

2.2.1 Actividad recolectora

Con la finalidad de analizar el comportamiento recolector de las colonias emplazadas en los ambientes agrícolas estudiados, en función de la administración de agroquímicos, tipo de cultivo y porcentaje de flora silvestre presente en su entorno, evaluamos dos parámetros diferentes de recolección. Por un lado, se registró el ingreso de abejas recolectoras en la entrada de las colmenas, y por el otro, se colocaron trampas de polen en las piqueras de las colmenas, para medir tanto el peso total de polen colectado, como la variabilidad de polen presente en las trampas. Las variables analizadas varían según la temporada estudiada.

2.2.1.1 Actividad en la entrada de las colmenas

Con el objetivo de obtener un indicador de la actividad de recolección general, se registró en la entrada de las colmenas el número total de abejas ingresantes por unidad de tiempo. A su vez, se registró el número de abejas con carga de polen en sus patas posteriores. Para esto, se seleccionaron ocho colmenas al azar en cada apiario. Las abejas ingresantes fueron contabilizadas en la entrada de cada una de estas colmenas, durante un minuto, siempre en el mismo rango horario, una o dos veces por día, dependiendo de la temporada estudiada (Figura 2.3). En cada temporada de verano, las mismas colmenas fueron evaluadas en un muestreo previo y un muestreo posterior a la administración de agroquímicos.



Figura 2.3. Registro de actividad recolectora en la entrada de las colmenas. A) Apiario del lote A y **B)** apiario del lote B. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

2.2.1.2 Trampas de polen

La cantidad de polen recolectado por las colonias de abejas melíferas fue considerado otro indicador de la actividad general de las colmenas. Para poder medir esta variable se utilizaron trampas de polen convencionales frontales. Dichas trampas son estructuras de madera con una malla metálica removible que permite el paso ajustado de las abejas, y provoca que dejen las cargas de polen antes de pasar por la malla, las cuales caen en un recipiente contenedor (Figura 2.4). Esto se realizó en las campañas llevadas a cabo durante los años 2020 y 2021 (sección 5 de la presente tesis), en tres colmenas seleccionadas al azar para la medición de actividad en piquera. Las trampas se colocaron por la mañana y permanecieron en las entradas de las colmenas seleccionadas durante un promedio de seis horas. Esto se realizó durante tres días consecutivos, en cada campaña de esas temporadas. Con el polen recolectado se midieron dos variables diferentes. Por un lado, el peso total de polen colectado en cada trampa. Por otro lado, un índice de variabilidad de polen dado por la cantidad de colores de polen diferentes encontradas en cada trampa, dividido el número total de colores encontrados en todas las trampas de todos los apiarios, en esa misma campaña de muestreos.



Figura 2.4. A-B) Trampas de polen colocadas en la entrada de una de las colmenas de los apiarios estudiados. **C)** Recolección del polen acumulado en las trampas. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

2.2.2 Ensayos comportamentales *in situ*

La búsqueda y recolección de alimento es un proceso altamente coordinado que precisa de la transferencia de información entre los miembros de la colonia para que resulte eficiente. En este sentido, tanto la quimiorrecepción como las claves olfativas, juegan un papel muy importante durante la recolección. Mediante la quimiorrecepción por contacto o gusto, las abejas recolectoras pueden seleccionar su alimento, al detectar los diferentes tipos y concentraciones de azúcares, lípidos y vitaminas, entre otros compuestos importantes. A su vez, durante los vuelos que éstas realizan, aprenden claves olfativas de las flores visitadas, lo cual les permite orientarse y encontrar el recurso en los próximos vuelos de recolección (von Frisch, 1923; Lindauer, 1971; Seeley, 1995). De este modo, es crucial el estudio de los efectos subletales que los diferentes agroquímicos aplicados en los entornos de las colonias puedan tener por sobre las capacidades cognitivas de las abejas obreras, que podrían afectar a la eficiencia de la búsqueda de alimento y a la coordinación de las actividades colectivas en la colmena.

2.2.2.1 Sensibilidad gustativa

Las abejas extienden su probóscide como reflejo en respuesta a un estímulo gustativo como el néctar (Frings, 1944). En la naturaleza, esto ocurre cuando una recolectora visita una flor que ofrece néctar o cuando una abeja recibe néctar de otra durante la trofalaxia. Sin embargo, existe una variación individual en términos de sensibilidad gustativa. Ésta puede ser estimada a través de un ensayo donde al mismo sujeto se le presentan soluciones de sacarosa de concentración creciente, % p/p equivalente a g de sacarosa por 100 g de solución (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 y 50 % p/p), (Page et al., 1998). Con el objetivo de reducir los tiempos de experimentación *in situ*, se estimuló a cada abeja al tocar sus antenas con un palillo de madera embebido en una única solución azucarada, con una concentración seleccionada al azar, siguiendo una versión modificada del procedimiento utilizado por Scheiner y colaboradores (2004). De esta forma, se registró si cada abeja individual respondía o no al estímulo de la presentación de solución de sacarosa, de esa concentración en particular. Al final del experimento se obtuvo, entonces, una proporción de respuesta para cada concentración de solución de sacarosa, basada en el número de abejas que respondieron al estímulo, dividido el número total de abejas evaluadas para esa concentración. Antes de cada presentación de solución de sacarosa, se ofreció agua a las abejas para asegurar que la extensión de la probóscide no se debiera a la sed. A aquellas abejas que respondieron al agua, se les permitió beber hasta saciarse. Las abejas fueron capturadas al azar, en la entrada de las diferentes colmenas presentes en cada apiario. A continuación, las abejas fueron anestesiadas en frío y amarradas en cepos metálicos, de

manera tal que permanecieran inmobilizadas, pero que sus piezas bucales y antenas quedaran libres (Frings 1944; Takeda, 1961; Bitterman et al., 1983), (Figura 2.5). Luego del encepado, las abejas fueron mantenidas en condiciones de oscuridad por una hora, previo a la realización del ensayo.



Figura 2.5. Abejas encepadas para ensayos comportamentales *in situ*.
Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

2.2.2.2 Condicionamiento olfativo clásico

La respuesta de extensión de probóscide (REP) a una solución de sacarosa es de naturaleza incondicionada, es decir innata y refleja, sin embargo, puede ser condicionada de una manera clásica (Takeda, 1961; Bitterman et al., 1983). En el condicionamiento olfativo las abejas son entrenadas para asociar un olor a priori neutral (estimulo condicionado, EC) con una recompensa de sacarosa, para finalmente exhibir una REP al olor solamente (respuesta condicionada, RC), (Figura 2.6). Para llevar a cabo el protocolo de REP, se impregnó un papel de filtro con 4 μ l de olor puro, el cual fue colocado dentro de una jeringa plástica, la cual se usó para liberar un flujo de aire con el olor hacia la cabeza de la abeja encepada. Se usó el odorante nonanal (Sigma-Aldrich) como EC, comúnmente presente en las fragancias florales (Knudsen and Tollsten, 1993). Antes de la presentación del olor,

las abejas fueron expuestas a un flujo de aire a través de la jeringa, sin el olor, para la familiarización y también para constatar que no haya una respuesta mecánica al estímulo. Solo aquellas abejas que no respondieron al estímulo mecánico del flujo de aire fueron utilizadas en el experimento. El olor se presentó durante 6 s y la recompensa se ofreció durante los últimos 3 s de este periodo al tocar las antenas con una solución de sacarosa 50 % p/p y luego alimentar a la abeja. Se computó una respuesta condicionada (RC) si la abeja extendió su probóscide durante los primeros 3 s de presentación de olor. Cada ensayo duró 39 s y se compuso por 16 s de aire limpio, 6 s de olor y 17 s de aire limpio. El entrenamiento consistió de tres ensayos separados por 15 minutos. Las abejas que extendieron su probóscide en el primer ensayo (respuesta espontánea) no fueron consideradas para el análisis. Luego de esta etapa de entrenamiento, se mantuvo un tiempo de 20 minutos entre el último ensayo y la posterior fase de evaluación, la cual consistió en una única presentación no recompensada del olor condicionado. Para asegurar que todos los investigadores usaran el mismo tiempo de experimentación, se utilizó una grabación de audio indicando el tiempo de presentación del olor y la recompensa. Las abejas experimentales fueron capturadas y encepadas de la misma forma detallada en la sección anterior.

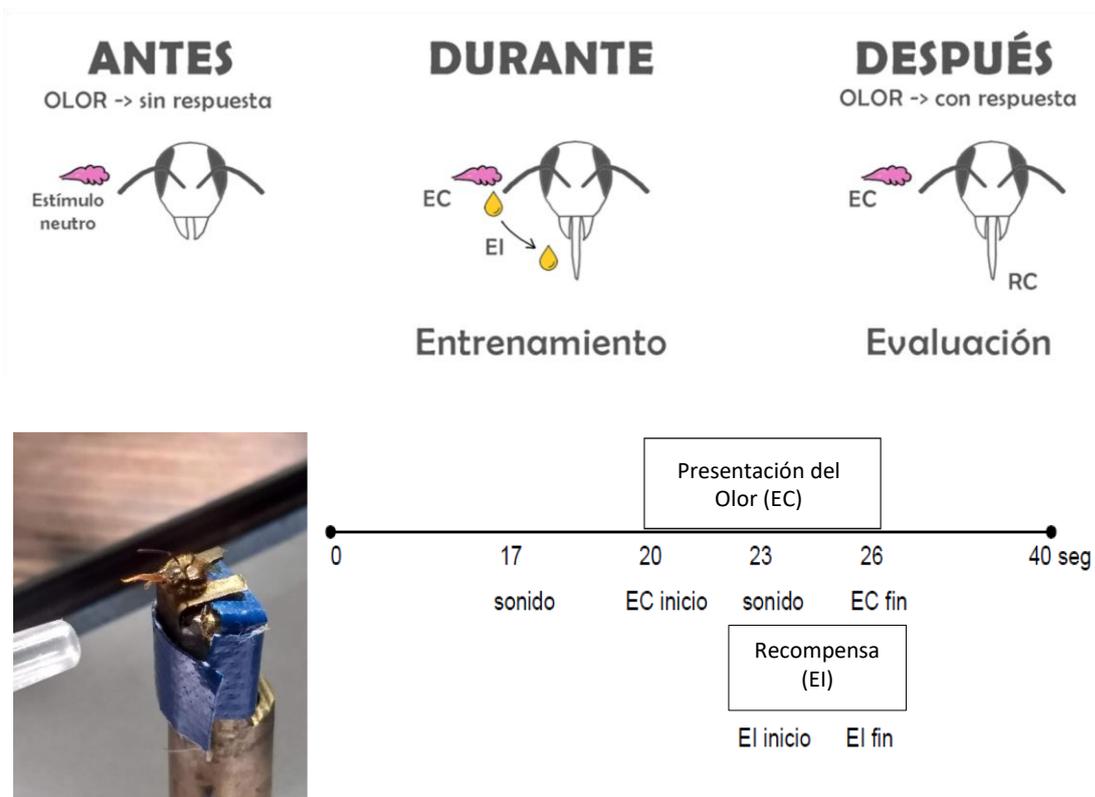


Figura 2.6. Condicionamiento olfativo clásico en *A. mellifera*. En este caso, es de tipo apetitivo y olfativo. El condicionamiento consiste en una etapa de entrenamiento y una de evaluación. En la primera, se presenta el olor (EC) junto con la solución de sacarosa (EI) en tres ocasiones. La estimulación apetitiva se logra tocando las antenas de la abeja y luego alimentándola. En la segunda, se presenta el EC en ausencia del EI. Se evalúa la REP durante el entrenamiento y en la evaluación. Créditos: grupo INSSOC.

2.3 Abordaje molecular

Como abordaje molecular, nos proponemos analizar la expresión relativa de genes clave relacionados, por un lado, a la detoxificación de xenobióticos en intestinos de abejas obreras jóvenes de interior de colmena y en larvas. Por otro lado, genes relacionados a las bases genéticas de la sociabilidad en abejas, centrándonos en muestras de cerebros de abejas obreras recolectoras de recursos florales.

2.3.1 Análisis de expresión génica

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR, quantitative polymerase chain reaction por sus siglas en inglés) es la técnica más sensible para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La qPCR es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, de manera que la acumulación de ADN amplificado es detectada y cuantificada a medida que la reacción avanza. Esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el incremento de su fluorescencia es proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción. Es una técnica con alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10⁷ equivalentes genómicos de la secuencia blanco) y rapidez en la visualización del producto, ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior (Brechtbuehl et al., 2001).

Durante la amplificación por la qPCR, se genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de amplificación por la qPCR se puede dividir en cuatro fases: 1) inicial o basal, 2) geométrica (conocida como logarítmica o exponencial), 3) lineal y 4) plateau o estacionaria (Figura 2.7). Durante la fase inicial, entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal de la reacción. Sin embargo, esta fase sirve para delimitar la línea base, la cual permite corregir las curvas que se obtienen de un experimento, restándose ese ruido basal a la fluorescencia observadas en las curvas de amplificación. En la fase geométrica, los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la qPCR tiene una eficiencia cercana al 100%. En esta fase de la reacción, la cinética de amplificación es 2^n , es decir, a partir de cada molécula del ADN se generan dos, por lo que el producto de la qPCR se duplica después de cada uno de los ciclos (Kubista et al., 2006). La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase. Por último, la fase estacionaria muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes de la reacción se agotaron. En ésta, la cantidad de producto obtenida es constante, aunque se incremente el número de ciclos.

El Ct, del inglés threshold cycle, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia (fase geométrica), (Figura 2.7). La comparación de los valores de Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del molde específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del ADN blanco haya en una muestra, menor será el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar la fase geométrica de la reacción. Entonces, el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad del ARNm o del ADN presente en la muestra (Kubista et al., 2006).



Figura 2.7. Cinética de amplificación de la qPCR. Durante los ciclos iniciales de la PCR no hay cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia emitida, por lo que es indistinguible el producto amplificado del ruido basal, pero permiten fijar la línea base. En la siguiente etapa, aumenta la cantidad de producto amplificado y la señal fluorescente. El punto donde se observa un sensible incremento en la fluorescencia se conoce como fase inicial, la cual es el origen de la fase logarítmica o geométrica donde la eficiencia de la reacción es de casi 100%. Posteriormente, se inicia la fase lineal en la cual la eficiencia de amplificación no es constante. Finalmente, se llega a la fase estacionaria donde el producto obtenido permanecerá constante, aunque se aumente el número de ciclos. Esquema tomado de Aguilera et al., 2014.

Para los análisis de expresión génica, se parte de una extracción de ARN de las muestras y, a continuación, se realiza una reacción de transcripción reversa (RT) que permite generar las moléculas de ADN complementario (ADNc) a partir de los ARNm contenidos en el sustrato de la reacción. Posteriormente, este ADNc se usa como molde en la qPCR (Stahlberg et al., 2004). Para los análisis de expresión génica se puede utilizar un ensayo de cuantificación relativa en la que la expresión del gen de interés se "relativiza" respecto a un gen endógeno que posee una expresión constante. Como no se conoce la cantidad absoluta del gen de interés, sólo se pueden determinar los niveles de expresión respecto a un gen control, que debería tener una expresión constante en las condiciones analizadas. La normalización es necesaria para que los valores de expresión resultantes

sean reflejo de los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de molde de las muestras estudiadas. Existen varios métodos y modelos para normalizar la expresión del gen blanco y el control, algunos de los cuales consideran la eficiencia de la amplificación, como el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Según este método, primero los cambios de expresión del gen de interés se relativizan respecto al gen control y, a continuación, frente a los niveles de expresión en una condición control (que también fue relativizada previamente frente a un gen control). Antes de realizar ensayos de expresión relativa por qPCR, es necesario calcular la eficiencia (E) de los primers utilizados y así como su R^2 . Este valor indica la proximidad de ajuste entre la línea de regresión de la curva estándar y los puntos de datos Ct individuales de las reacciones estándar. Un valor de 1 indica un ajuste perfecto entre la línea de regresión y los puntos de datos (Applied Biosystem, 2014). Para ello, se preparan diluciones seriadas del molde de la reacción y se miden los niveles de expresión, tanto para el gen de interés como para el gen control. A partir de los valores de Ct obtenidos y los valores de dilución utilizados se calcula la eficiencia y el R^2 para cada primer. El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ requiere que la eficiencia de amplificación de los genes de interés y genes control esté entre 90-110% y el R^2 sea lo más cercano a 1 posible. Se recomienda que los productos amplificados en la qPCR tengan un tamaño entre 100-250 pb para optimizar la dinámica de la reacción.

2.4 Abordaje ecotoxicológico

2.4.1 Cromatografía acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija y otra móvil.

En el caso de la cromatografía gaseosa, la fase móvil es un gas que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Esta fase fija puede ser un sólido poroso (cromatografía gas-sólido), o bien una película líquida delgada que recubre un sólido particulado, o las paredes de la columna (cromatografía gas-líquido). Esta última es la más utilizada y es la aplicada en esta tesis. En ella, el proceso de separación se produce por partición de los componentes entre la fase líquida y gaseosa (Verde Calvo et al., 1999; Barry y Grob, 2007). El gas portador (fase móvil) proviene de cilindros provistos con válvulas reductoras de presión. La muestra se introduce en el inyector con una micro jeringa a través de un septum de goma. Allí se produce la vaporización de la misma y su introducción en la corriente de gas. El detector produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia a medida que cada componente separado fluye a través de él (Verde Calvo et al., 1999). Esa señal es enviada al registrador (PC) que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo (cromatograma). Idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente

de la muestra original. Se calcula, además, el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de analito (Figura 2.8).

La cromatografía gaseosa es una herramienta analítica ampliamente utilizada en el análisis químico de alimentos y otras matrices.

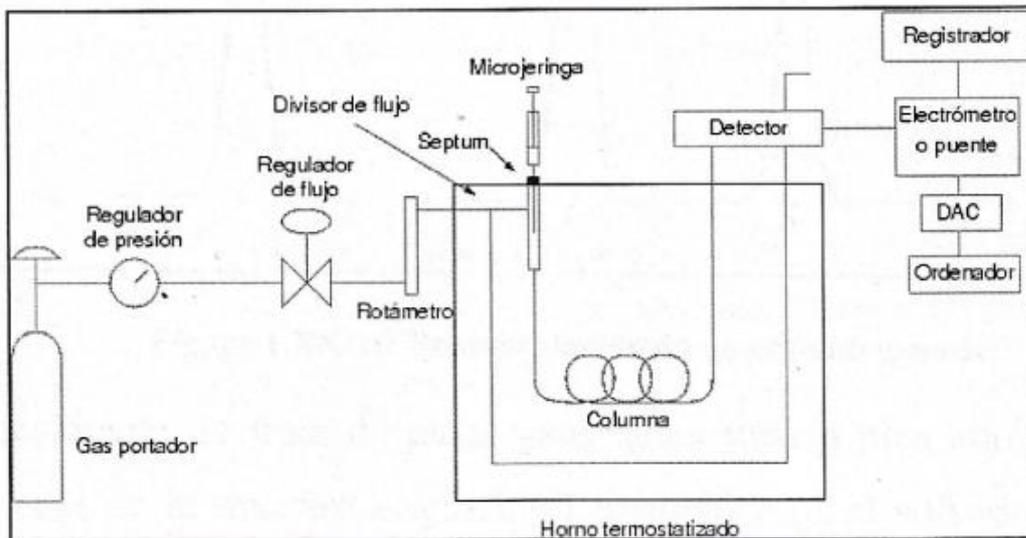


Figura 2.8. Esquema simplificado de un cromatógrafo de gases. Tomado de Rojas, 2020.

La espectrometría de masas (MS) da nombre a un conjunto de técnicas utilizadas para la determinación de la masa de iones y su abundancia en fase gaseosa. Estas técnicas de masas son capaces de suministrar información sobre la composición cualitativa y cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos en muestras complejas, la estructura molecular, las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras, y la estructura y composición de superficies (MacLafferty y Turecek, 1993). Las tres partes básicas de un detector de espectrometría de masas son la fuente de ionización, el analizador o filtros de masas y el transductor o detector (Figura 2.9).

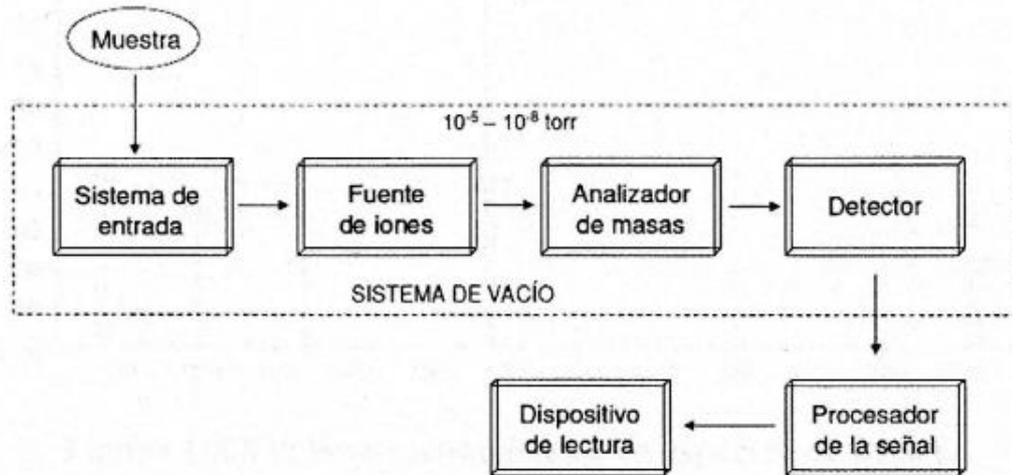


Figura 2.9. Esquema simplificado de un espectrómetro de masas. Tomado de Rojas, 2020.

La muestra gaseosa se ioniza entre dos placas cargadas, las moléculas se rompen en fragmentos, algunos de los cuales están cargados (iones) y otros no. Los iones se aceleran por aplicación de un potencial eléctrico y pasan desde la fuente de ionización a un analizador de masas, donde los iones se separan en base a su relación masa/carga (m/z), de manera que llegan al detector en diferentes momentos. Esta corriente de iones se amplifica por un multiplicador de electrones. El espectro de masas muestra cantidades de masa recogidas a valores crecientes de la relación m/z . Cada pico del espectro da información sobre la masa molecular de un determinado fragmento de la molécula que lo originó (MacLafferty y Turecek, 1993; Skoog et al., 2001), (Figura 2.10).

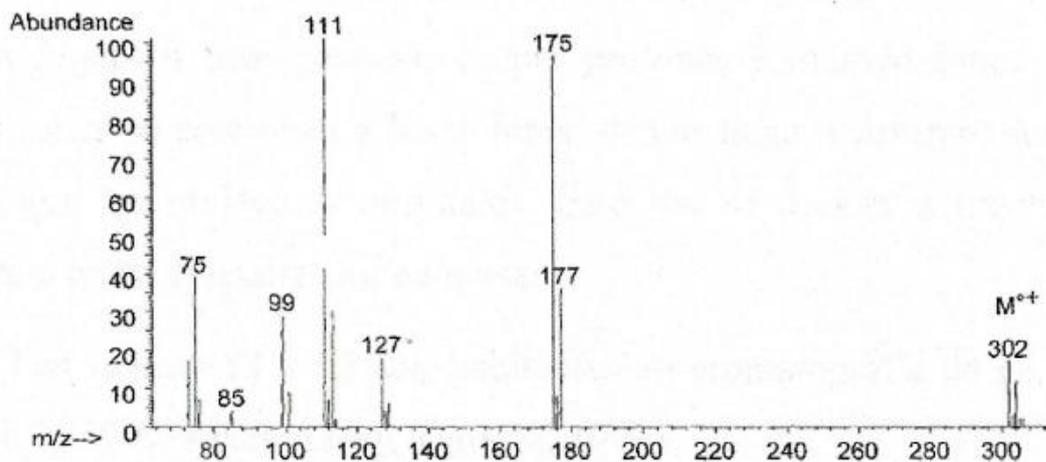


Figura 2.10. Representación de un espectro de masas. Tomado de Rojas, 2020.

Los espectrómetros de masas se pueden acoplar tanto con cromatógrafos de gases (GC/MS), como con cromatógrafos de líquidos (LC/MS), (Figura 2.11).



Figura 2.11. A) Cromatógrafo de gases asociado a espectrómetro de masas (GC-MS) Perkin Elmer, modelo Clarus 600. B) Cromatógrafo de líquidos asociado a espectrómetro de masas (LC-MS), Waters Acuity UPLC-SQD. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

La cromatografía líquida con espectrometría de masas es un importante proceso de análisis que combina las técnicas de cromatografía líquida para la separación (Figura 2.12) y la de espectrometría de masas para la detección, identificación y cuantificación de compuestos orgánicos/organometálicos en una muestra. La combinación de estas técnicas posee una sensibilidad muy alta, la cual se basa en la ionización de las moléculas, así como también, en la separación y detección de los iones que se produzcan, según la relación entre su masa y carga en un sistema al vacío.

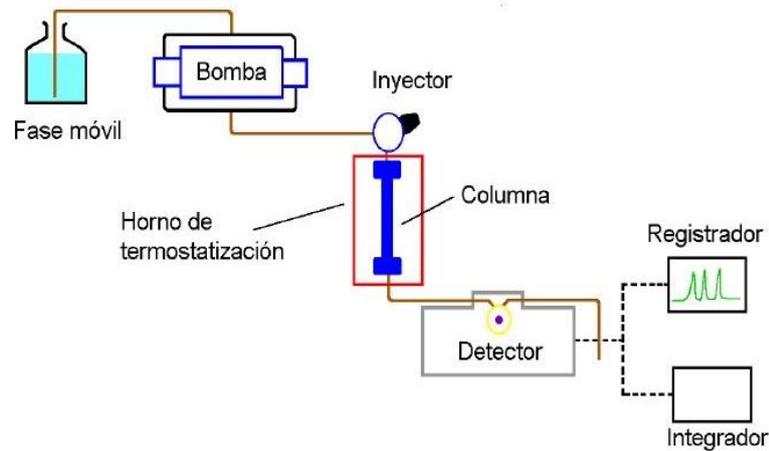


Figura 2.12. Esquema simplificado de un cromatógrafo líquido. Tomado de Rojas, 2020.

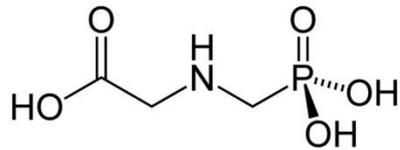
El área bajo un pico del espectro es proporcional a la cantidad de analito presente en el cromatograma. Calculando el área del pico mediante la función matemática de integración, se puede determinar la concentración de un analito en la muestra original. La concentración puede calcularse utilizando una curva de calibración creada al encontrar la respuesta para una serie de concentraciones de analito, o determinando el factor de respuesta relativa de un analito. Para generar una curva de calibración, se inyectan en la cromatografía muestras estándar de proporciones molares o de masa conocidas y se registran los porcentajes indicados por el instrumento.

SITUACIÓN DE CAMPO 1: Exposición a herbicidas de post emergencia por aplicación terrestre. Evaluación de actividad recolectora y de perfiles de expresión de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos en larvas y abejas jóvenes de interior de colmena

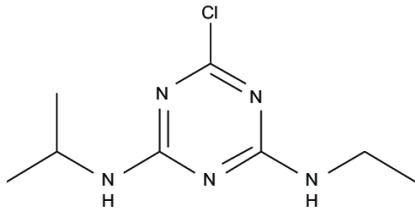
3.1 Introducción

En Latinoamérica se ha extendido ampliamente el uso de cultivos genéticamente modificados (GM), lo que conlleva una creciente dependencia de los herbicidas, principalmente glifosato, para el control de malezas. En el caso particular de Argentina, la siembra directa es el sistema de cultivo más ampliamente utilizado, ocupando el 90% de la superficie sembrada (Aapresid, 2018). Este modelo depende exclusivamente de la aplicación de herbicidas como única forma de control de malezas y entre las formulaciones químicas más utilizadas se encuentran aquellas basadas en los ingredientes activos glifosato (GLI), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y atrazina (ATZ), (CASAFE, 2014). Herbicidas basados en estos tres compuestos activos (Figura 3.1) fueron, efectivamente, los utilizados en esta temporada de muestreos para el control de malezas en el campo estudiado, a través de pulverizadores terrestres. El GLI es un herbicida de amplio espectro utilizado por ser muy efectivo y de bajo costo de producción. Fue comercializado por primera vez en el año 1974 como principio activo del formulado Roundup® (Duke y Powles, 2008; Dill et al., 2010). Desde entonces, su uso ha aumentado considerablemente y en Argentina es el agroquímico de mayor comercialización desde 1997 (CASAFE, 2012). Su modo de acción es a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), la cual forma parte de la vía del shikimato, ruta común para la biosíntesis de compuestos aromáticos en plantas, algas y bacterias (Duke y Powles, 2008). A su vez, presenta una alta solubilidad (10,5 g/L a 20 °C), lo que posibilita el riesgo de transporte hacia cuerpos de agua (Lewis et al., 2016). Por su parte, el 2,4-D es un herbicida orgánico y sistémico que actúa imitando la acción de la hormona del crecimiento de las plantas, la auxina, lo que provoca un crecimiento incontrolado y, eventualmente, la muerte de las plantas susceptibles (Song, 2014). Finalmente, la ATZ es un herbicida de la clase triazina que actúa de manera selectiva inhibiendo la fotosíntesis de plantas susceptibles (Cheremisinoff y Rosenfeld, 2007), con una solubilidad moderada en agua (33 mg/L a 20° C), siendo el contaminante más ubicuo hallado en cuatro cuencas del país (De Geronimo et al., 2014). El principal modo de aplicación de estos herbicidas es por rociado mediante pulverizadores terrestres o aéreos. El empleo de estos

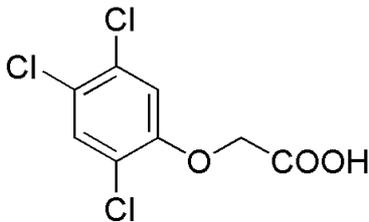
métodos puede resultar en la deriva potencial del herbicida hacia masas de aire, suelos y cuerpos de agua aledaños a los cultivos (Matthews, 2006).



GLIFOSATO



ATRAZINA



2,4 D

Figura 3.1. Esquema de las moléculas de los compuestos activos de los tres herbicidas utilizados en esta temporada.

Las abejas pre-recolectoras, que permanecen dentro de la colmena, están expuestas a las trazas de agroquímicos presentes en el alimento y en las abejas que regresan luego de la recolección, así como también en los recursos almacenados en el interior de la colmena. Concentraciones bajas de GLI, por ejemplo, no son detectadas por las abejas recolectoras (Farina et al., 2019). Por lo cual, la entrada de recursos contaminados sería constante y, a su vez, distribuido a los miembros de la colonia y eventualmente almacenado (Herbert et al., 2014). De esta forma, las abejas dentro de la colmena, así como también las larvas que son alimentadas por ellas, estarían expuestas a los compuestos de manera prolongada. A pesar de que en esta temporada no se evaluó la presencia de trazas de agroquímicos en productos de colmena de las colonias estudiadas, se ha reportado en trabajos previos la presencia de trazas de GLI y 2,4-D en muestras de miel (Rubio et al., 2014; Chamkasem and Vargo, 2017; Berg et al., 2018; Bommuraj et al., 2019) y de trazas de ATZ en polen, cera y abejas (Mullin et al., 2010). A su vez, hay evidencia de que los herbicidas aplicados y sus metabolitos pueden persistir más de veinte días en agua y suelo (Jablonowski et al., 2011; Walters, 2011; Ordaz-Guillén et al., 2014; Bento et al., 2016).

El análisis del estado fisiológico del animal de estudio a través de biomarcadores de respuesta a pesticidas o estrés ambiental es un método muy recomendado en el caso de evaluaciones a campo, dado que revela signos de estrés incluso cuando no se registran síntomas conspicuos evidentes

(Vázquez et al., 2020). A nivel molecular, la exposición a agroquímicos puede activar vías de detoxificación en las abejas melíferas (Mao et al., 2011; Boncristiani et al., 2012; Johnson et al., 2012; Schmehl et al., 2014; Vázquez et al., 2018; Vázquez et al., 2020) y modular la expresión de genes involucrados en la inmunidad y en el desarrollo comportamental (Gregorc et al., 2012; Schmehl et al., 2014). En el caso particular de los herbicidas GLI y ATZ, se ha observado que éstos promueven la peroxidación lipídica (Jumarie et al., 2017), altera la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Boily et al., 2013) y el sistema carotinoides-retinoides en las abejas melíferas (Helmer et al., 2015). Como se mencionó con anterioridad, los *P450* son una de las principales enzimas de la Fase I de detoxificación de los organismos, incluyendo a los insectos, en la cual, xenobióticos tales como los agroquímicos son metabolizados (Mao et al., 2013). A su vez, investigaciones previas sugieren que los perfiles de expresión pueden utilizarse para identificar biomarcadores específicos de estrés en las abejas, ya que tienen vías genéticas distintivas para hacer frente a patógenos, xenobióticos y déficits nutricionales, que están asociados con cambios específicos y, por tanto, diagnósticos, en la expresión génica (Grozinger y Zayed, 2020). En consecuencia, la abeja melífera se convierte en una especie centinela adecuada para la comunidad de polinizadores, especialmente los individuos en desarrollo dentro de las colmenas, dado que son mucho más vulnerables a los desafíos ambientales (Farina et al., 2019).

Teniendo todo esto en cuenta, el objetivo de esta sección fue evaluar el impacto a medio término de la aplicación terrestre de una mezcla de herbicidas de post-emergencia sobre las vías de detoxificación y la actividad recolectora de colonias de abejas melíferas ubicadas en diferentes cultivos de verano. A su vez, evaluar si dicho impacto depende de las características de los cultivos y la proporción de parches de flora silvestre presentes en los entornos de los diferentes apiarios estudiados.

3.2 Metodología

3.2.1 Sitio de estudio, cultivos y aplicación de agroquímicos

La primera temporada de muestreos se realizó durante el verano 2016-2017 (Figura 3.2). Los muestreos se realizaron en la estancia San Claudio, descrita en la sección 2.1. Los cultivos sembrados este verano fueron soja (Nidera 4611 y Don Mario 4615), girasol (Syngenta 3950) y maíz (Dekalb 73-10 y GL Stack 4500). Todos ellos cultivos GM, tolerantes a herbicidas.

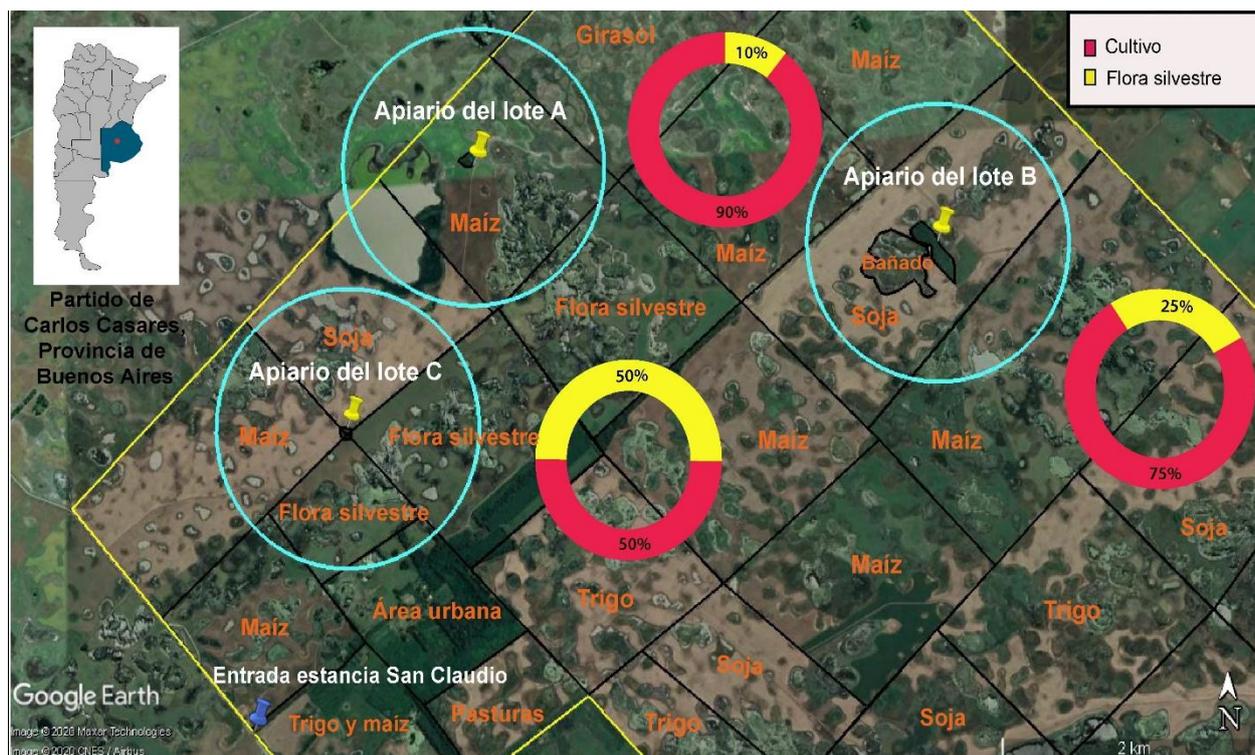


Figura 3.2. Ubicación geográfica de los tres apiarios estudiados. Estancia San Claudio, Carlos Casares, provincia de Buenos Aires, Argentina. Temporada 2016-2017. Las circunferencias de color celeste muestran un radio de 1 km desde cada apiario, indicando el área potencial de recolección. Los círculos que presentan la clasificación por color en cultivo (rosa) y flora silvestre (amarillo), indican el porcentaje de cada tipo de vegetación. En color naranja se especifica el tipo de vegetación presente en cada lote. Mapa y delimitación de áreas de navegación realizados en Google Earth.

El cultivo de soja fue sembrado a finales del mes de noviembre de 2016 (siembra de segunda), con semillas de ciclo de desarrollo corto, mientras que los cultivos de girasol y maíz fueron sembrados a mediados de octubre del mismo año. La aplicación de herbicidas de post-emergencia en todos los cultivos se realizó a principios de enero de 2017, a través de pulverizadora terrestre (1,5 L/ha). El primer muestreo se realizó a mediados de diciembre de 2016, veinte días antes de la administración de herbicidas, mientras que el segundo muestreo fue llevado a cabo a finales de enero de 2017, veinte días después de dicha administración. El tratamiento contra malezas se realizó con una mezcla de tres productos comerciales: un herbicida con ATZ (GESAPRIM® SYNGENTA), un herbicida con 2,4-D (VOLERISTM® SYNGENTA) y un herbicida con GLI (SULFOSATO TOUCHDOWN® SYNGENTA). Durante los periodos de muestreo no se realizaron aplicaciones adicionales de fungicidas o insecticidas. A su vez, los apicultores tampoco trataron a las colmenas con antibióticos o acaricidas. Los tres cultivos estaban en su etapa vegetativa (fase de crecimiento de la planta que ocurre después de la etapa de germinación/semilla y antes de la floración) al momento del primer muestreo y durante la aplicación de herbicidas, sin flores disponibles para el forrajeo de las abejas (Fehr et al., 1971; Schneiter y Miller, 1981; Ritchie y Hanway, 1982). Por el contrario, al momento del segundo muestreo, todos los cultivos estaban en flor (Figura 3.3).

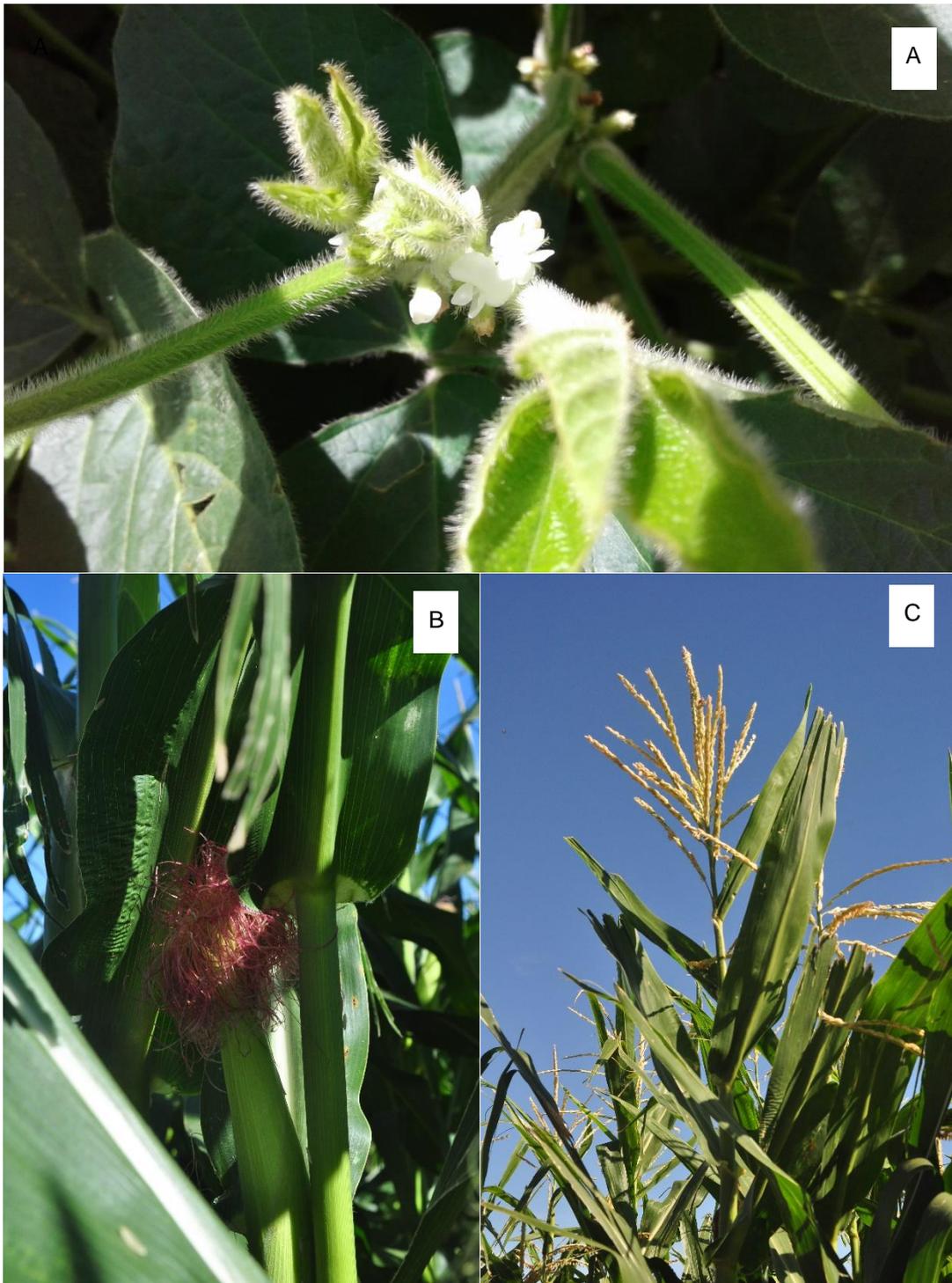


Figura 3.3. A) Cultivo de soja y **B-C)** cultivo de maíz en flor, en los diferentes lotes estudiados. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

Las condiciones climáticas fueron similares en ambos muestreos y óptimas para la actividad de recolección de las abejas, con un promedio de temperatura de 31 y 32 °C y de humedad relativa de 32 y 30%, respectivamente. Además, ambos muestreos fueron en días soleados, sin vientos fuertes

ni lluvias. A su vez, los periodos de muestreo coinciden con los picos de flujo de néctar en la región, y consecuentemente, con el máximo tamaño poblacional de las colonias de abejas melíferas.

La disposición de los apiarios y las características del campo ya fueron detalladas en la sección 2.1. Para el caso particular de esta temporada, y en orden creciente de proporción de flora silvestre, el primer apiario contaba con 23 colmenas, localizadas en un parche de monte ubicado en el que denominamos lote A. Este lote, con un área de 189 ha y sembrado con maíz, estaba localizado, a su vez, a 50 m de un cultivo de girasol. Además, más allá del cultivo de maíz, el campo estaba sembrado con soja, incluida dentro del área de navegación delimitada para este apiario. El porcentaje de flora silvestre calculada para este lote, dentro del área de navegación del correspondiente apiario, fue del 10%. Para mayor detalle de la delimitación de estas circunferencias de navegación y del cálculo de porcentajes de cultivo y flora silvestre, ver sección 2.1. El segundo apiario, por su parte, contaba con 33 colmenas, localizadas en un parche de monte y con presencia de una zona de bañado, en el lote denominado B. Este lote tenía una extensión de 189 ha, y presentaba principalmente un cultivo de soja, rodeado por cultivo de maíz. La zona de bañado incluía una diversidad floral que no se encontraba presente en el entorno de los otros apiarios, tales como diferentes especies del género *Thypha*, *Eryngium* y *Juncus* (Figura 3.4). En este caso, el porcentaje de flora silvestre fue del 25%. Por último, el tercer apiario presentaba 44 colmenas, situadas en un parche de monte localizado en el denominado lote C. Este lote contaba con un área de 178 ha y estaba a 20 m de un cultivo de soja y un cultivo de maíz hacia un lado, y de flora silvestre hacia el otro. De esta forma, el lote C contaba con un porcentaje de flora no cultivo del 50%. La vegetación silvestre fue la única fuente de alimento para las abejas durante el primer muestreo, en todos los lotes estudiados.



Figura 3.4. Bañado presente en la entrada de la zona de monte donde estaba ubicado el apiario del lote B. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

3.2.2 Variables analizadas

En esta primera temporada analizada, se estudiaron tres enfoques diferentes. En primer lugar, dentro del abordaje comportamental, se estudió la actividad recolectora de las colonias, registrándose la actividad en la entrada de las colmenas a través de los ingresos de abejas recolectoras totales y de abejas con polen en sus corbículas por unidad de tiempo, así como también, analizando la relación entre los ingresos de polen y los ingresos totales, según la metodología detallada en la sección de metodología general.

En segundo lugar, dentro del abordaje molecular, se evaluó un set de biomarcadores moleculares de detoxificación y respuesta inmune. Se ha observado que cambios en la transcripción de estos genes son señal de estrés químico asociado con la ingesta de agroquímicos a través del alimento (Gregorc et al., 2012; Vázquez et al., 2018; Vázquez et al., 2020). Los genes elegidos para evaluar el perfil de expresión antes y después de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia y los consecuentes cambios en la floración de los cultivos, fueron el péptido antimicrobiano *Abaecin* (*AB*) y los citocromos *P450 CYP6AS2*, *CYP6AS3*, *CYP6AS4*, *CYP6BD1* y *CYP9Q3*, involucrados en la Fase I de la detoxificación de xenobióticos en *A. mellifera*. Todos estos genes han registrado cambios de expresión ante la exposición a diferentes agroquímicos en trabajos previos, tanto en larvas como en abejas adultas (Mao et al., 2011; Boncristiani et al., 2012; Schmehl et al., 2014; Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2020).

Por último, se estudió un abordaje multivariado, con el objetivo de entender las relaciones subyacentes dadas por los perfiles de expresión génica y de actividad recolectora, luego de la aplicación de herbicidas de post-emergencia. Para ello, se realizó un análisis de correlación entre variables y un Análisis de Componentes Principales (ACP).

3.2.3 Colecta de muestras

Con el objetivo de evaluar el estado fisiológico interno de larvas y abejas que desarrollan tareas dentro de la colmena y que no tienen una exposición directa al entorno agrícola externo, tomamos muestras de larvas y abejas en cuatro de las ocho colmenas seleccionadas al azar en cada uno de los colmenares. En cada una de estas cuatro colmenas, capturamos obreras localizadas en el área de cría, y las colocamos en tubos de ensayo, para una subsiguiente disección *in situ* de los intestinos. Además, tomamos muestras de cinco larvas en el quinto estadio larval. Cada pool de cinco larvas por colmena, se guardó en un único criovial que fue colocado inmediatamente en un termo de nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN a realizarse en laboratorio (Figura 3.5). A continuación, una vez muestreadas todas las larvas y abejas de interior de colmena, de todas las colonias seleccionadas en cada uno de los apiarios, se anestesiaron las obreras capturadas durante 4 minutos a -20 °C, para la subsiguiente disección de los intestinos. De esta forma, se obtuvo un pool de diez

intestinos para cada una de las colmenas, que fueron colocados en un único criovial e inmediatamente guardados en nitrógeno líquido, junto con las larvas ya muestreadas, para las futuras extracciones de ARN (Figura 3.6). Esta metodología de muestreo se desarrolló en un muestreo previo a la aplicación de agroquímicos y luego se repitió en las mismas colmenas, en un muestreo posterior a dicha administración. Al final de la temporada, entonces, contamos con cuatro réplicas biológicas para cada apiario y en cada momento, pre y post aplicación de agroquímicos.



Figura 3.5. A) Colecta de larvas en estadio cinco. B-C) Almacenamiento de pool de larvas en crioviales, dentro de un termo con nitrógeno líquido. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.



Figura 3.6. Disección de intestinos *in situ*. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

La elección de muestrear las larvas en su quinto estadio es debido a que, en esta etapa larval, es cuando más se expone a los alimentos colectados en el exterior (miel y pan de abeja derivados del néctar y el polen recolectados en las flores de su entorno agrícola), (Medrzycki et al., 2008). Además, estas larvas eclosionaron aproximadamente 15 días después de la aplicación de agroquímicos de post-emergencia, de manera que, en el segundo muestreo ya eran obreras de interior de colmena. Por otro lado, elegimos capturar abejas localizadas en el área de cría, dado que son jóvenes obreras que se dedican a tareas tales como procesamiento del alimento, limpieza de las celdas, alimentación de la cría y atención de la abeja reina. De manera que son los individuos que tienen un mayor contacto con el alimento almacenado en el interior de la colmena, sin tener un contacto directo con el exterior.

3.2.4 Análisis de expresión génica

En el caso particular de esta temporada, la extracción de ARN y los análisis de expresión génica por qPCR se realizaron en el Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (INBA, FAUBA-CONICET), (Figura 3.7). El ARN total fue extraído de cada pool de intestinos y larvas con el protocolo de extracción con

TRIZOL® (Invitrogen). El ARN obtenido se trató con la enzima DNAsa, previo a la reacción con transcriptasa reversa (RT). La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN tratado por muestra.

Para la determinación de los niveles de expresión de los genes *AB*, *CYP6AS2*, *CYP6AS3*, *CYP6AS4*, *CYP6BD1* y *CYP9Q3* (Tabla 3.1), que funcionan como biomarcadores de exposición a pesticidas, cada reacción de qPCR se llevó a cabo en triplicado para cada una de las cuatro réplicas biológicas. El análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes estudiados se basó en el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se desarrolló utilizando el software específico para el modelo de termociclador utilizado (Applied Biosystems 7500), siguiendo el protocolo del fabricante para dicho método (Applied Biosystems, 2014). Se calculó la eficiencia de los primers, tanto de los genes de interés como del gen constitutivo (Tabla 3.2). Adicionalmente, con la finalidad de asegurar la especificidad de la amplificación, se analizó la Curva de Melting. El gen constitutivo *Rp18* fue utilizado como control endógeno (Collins et al., 2004; Grosso et al., 2018) y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de herbicidas de post-emergencia, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha aplicación. En todas las corridas de qPCR se incluyeron controles negativos para cada primer por duplicado.

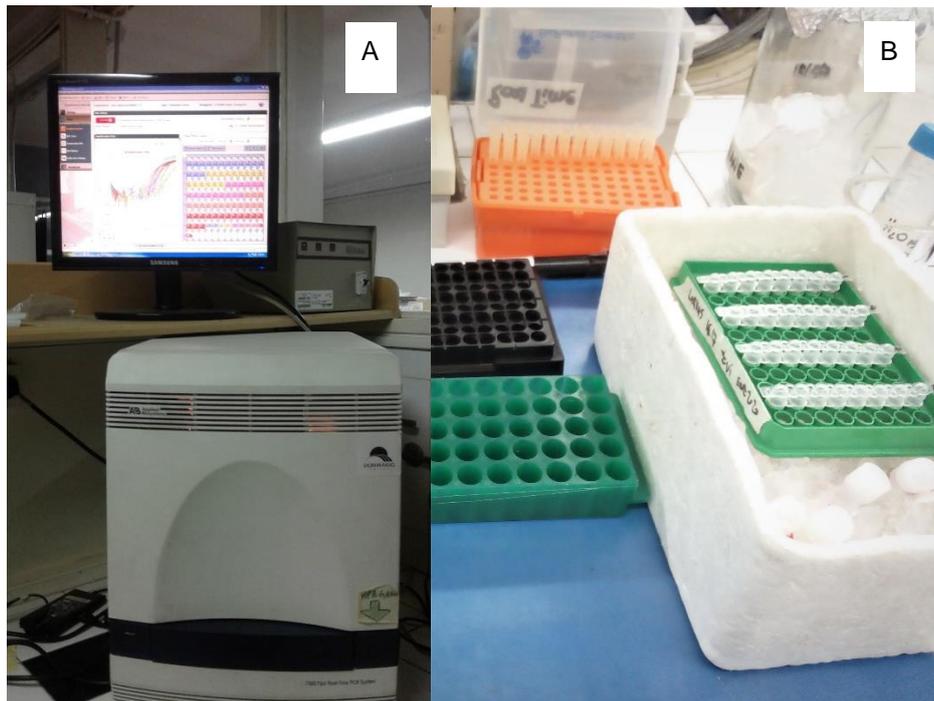


Figura 3.7. Análisis de expresión génica en el laboratorio del INBA, FAUBA-CONICET. A) Termociclador qPCR (Applied Biosystems 7500) con corrida en curso. **B)** Armado de la placa de corrida para qPCR. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

Tabla 3.1. Modelos de primers. Secuencia, tamaño del producto amplificado y temperatura de melting (Tm) para el gen constitutivo *Rpl8* y los genes de interés *Abaecin*, *CYP6BD1*, *CYP9Q3*, *CYP6AS2*, *CYP6AS3*, *CYP6AS4*. Los primers fueron modelados utilizando los softwares Primer 3 y BLAST.

Gen	Secuencia (5' a 3')	Tamaño del amplicon	Tm
<i>Rpl8</i>	F: CACACGGTGGTGGTAATCAT R: CTCGGATTCTTCTGTACGA	114 pb	59
<i>AB</i>	F: CACACTCGAGGTCTGTAGTATCT R: AATGCTGCGCATATCGTGG	111 pb	59
<i>CYP6BD1</i>	F: CTTCTGTTGCTTTTGGAAATTCAAGT R: TGCATGCTGCGAGAAAATGT	106 pb	59
<i>CYP9Q3</i>	F: TTGCAAGCTCCATTCCGGACA R: AACGGCCACGAATACGGTTA	130 pb	60
<i>CYP6AS2</i>	F: CGCCAGTAGACATCCCATGA R: CTGACGACATGTGTGATCAGTT	136 pb	59
<i>CYP6AS3</i>	F: GCGCGAACACTCCACCA R: CTCGTCCTCGGTACGATTTTACA	146 pb	60
<i>CYP6AS4</i>	F: TTGCGCTCTCATCTCACTCG R: AAATCGCGACAAATGCGGTT	125 pb	60

Tabla 3.2. Validación de primers. Valores de eficiencia y R² para los genes de interés y el constitutivo, obtenidos en la curva standard.

	Abejas jóvenes de interior de colmena		
	Gen	Eficiencia (%)	R ²
GENES DE INTERÉS	<i>AB</i>	100.412	0.987
	<i>CYP6BD1</i>	109.38	0.959
	<i>CYP6AS2</i>	107.558	0.836
	<i>CYP6AS3</i>	98.541	0.923
	<i>CYP6AS4</i>	106,517	0.836
	<i>CYP9Q3</i>	102.235	0.966
CONSTITUTIVO	<i>Rpl8</i>	104.382	0.854
	Larvas		
	Gen	Eficiencia (%)	R ²
GENES DE INTERÉS	<i>AB</i>	104.319	0.987
	<i>CYP6BD1</i>	106,031	0.981
	<i>CYP6AS2</i>	109.929	0.876
	<i>CYP6AS3</i>	100.650	0.975
	<i>CYP6AS4</i>	109.188	0.929
	<i>CYP9Q3</i>	99.05	0.876
CONSTITUTIVO	<i>Rpl8</i>	92.918	0.929

3.2.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, tanto de las variables de actividad recolectora como de los datos de expresión génica, se utilizaron métodos no paramétricos. Las comparaciones entre el muestreo previo a la aplicación de herbicidas de post-emergencia y el muestreo posterior a dicha administración, se analizaron a través de la prueba de rangos de Wilcoxon, para datos pareados, con un alfa de 0,05. Para el análisis de las diferencias entre los apiarios de los distintos lotes se utilizó la prueba de Friedman, también para datos pareados. Además, las comparaciones a posteriori entre lotes se analizaron con la prueba de Conover, utilizando la corrección de Bonferroni. Todas las pruebas no paramétricas, fueron llevadas a cabo utilizando el paquete “PMCMRplus” (Pohlert, 2020) del programa R v3.5.1. (R Score Team, 2018).

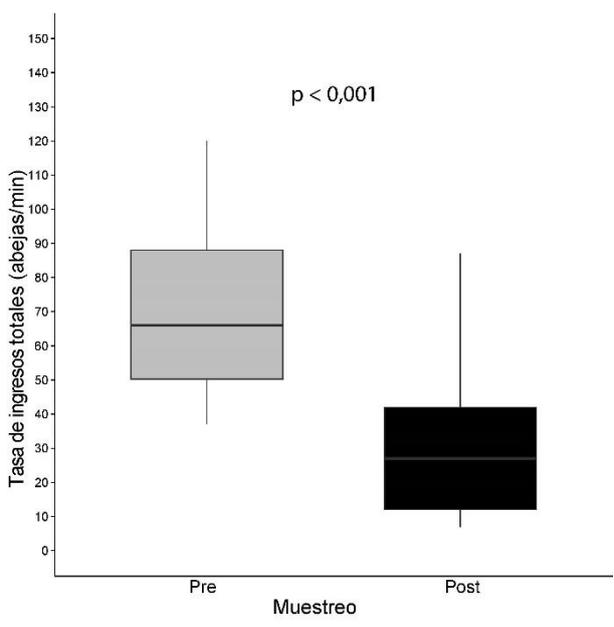
El ACP y la prueba no paramétrica de Kendall para el análisis de correlación entre las variables estudiadas se realizaron utilizando las librerías “ade4” y “psych”, respectivamente. Finalmente, los gráficos del ACP fueron realizados con el paquete “FactoMineR” (Le et al., 2008).

3.3 Resultados

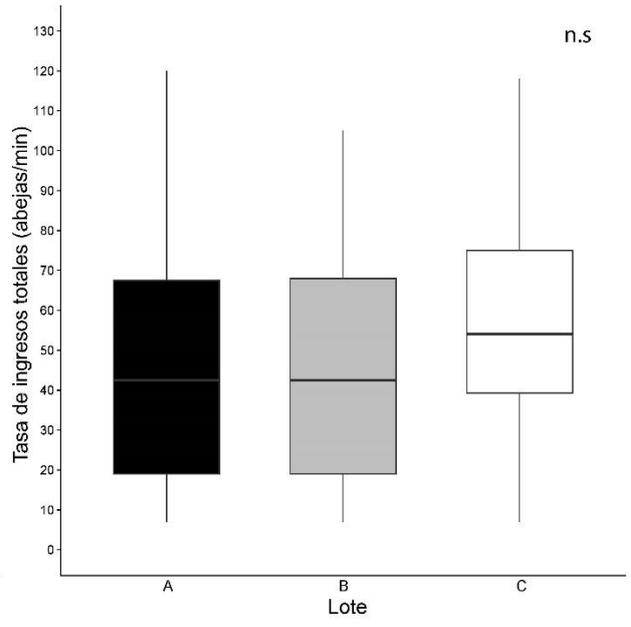
3.3.1 Abordaje comportamental: actividad recolectora

Con el objetivo de estimar la actividad recolectora antes y después de la aplicación de herbicidas de post-emergencia, se evaluó tanto la tasa de ingreso de abejas recolectoras totales como de abejas con polen en sus corbículas (abejas/minuto), en los tres apiarios estudiados. Además, se analizó una tercera variable, calculada como la proporción de abejas con polen en sus corbículas, sobre el total de abejas ingresantes por minuto (Figura 3.8).

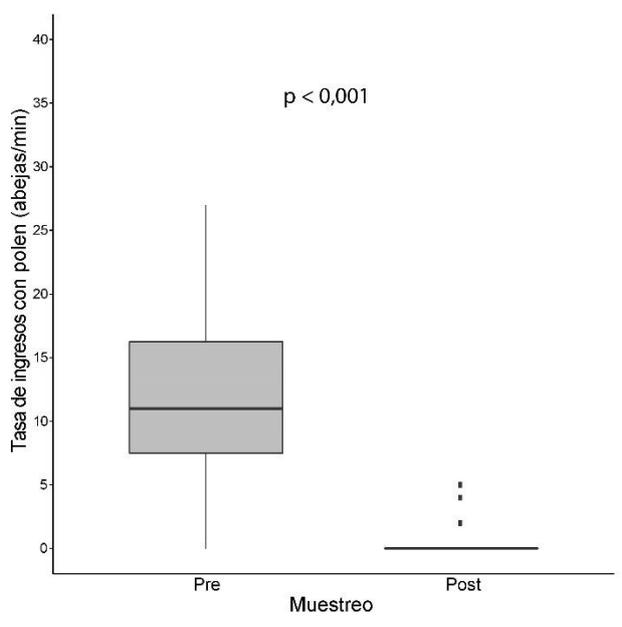
A



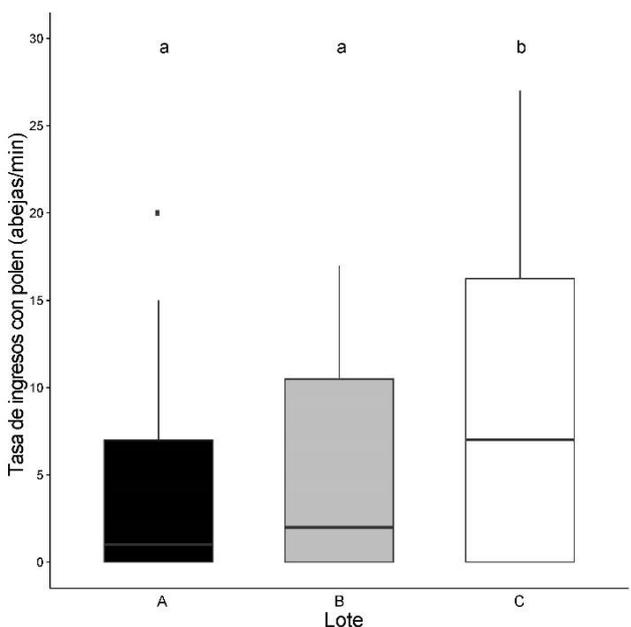
B



C



D



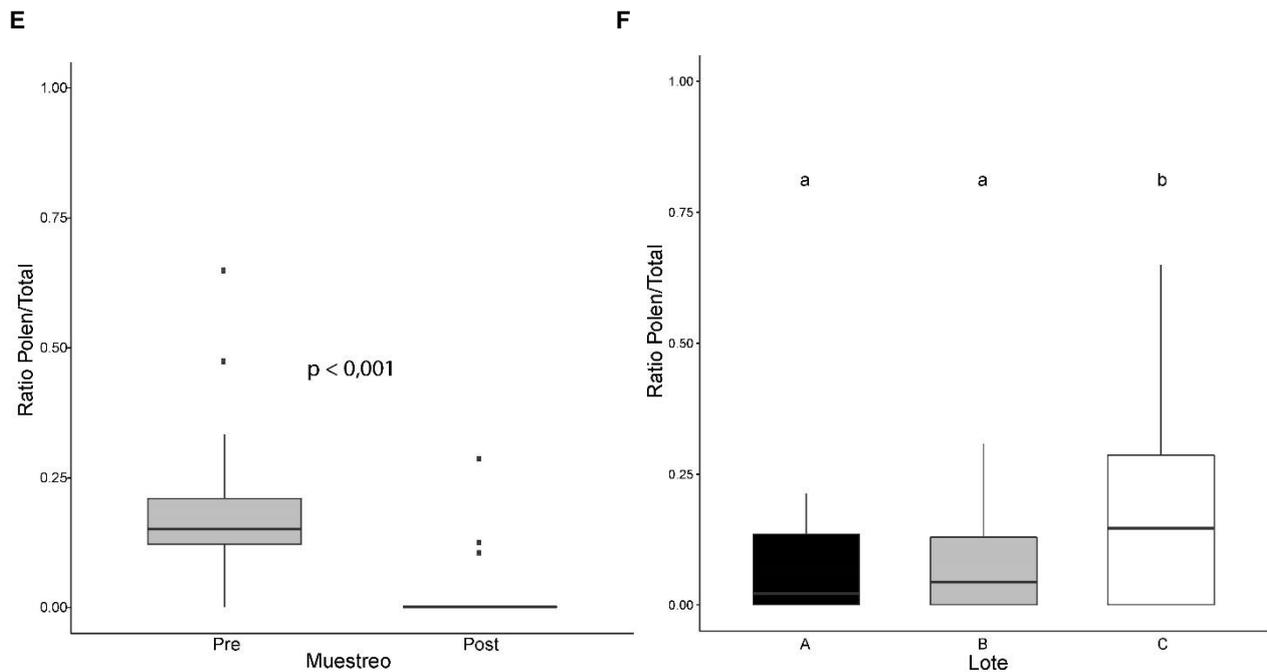


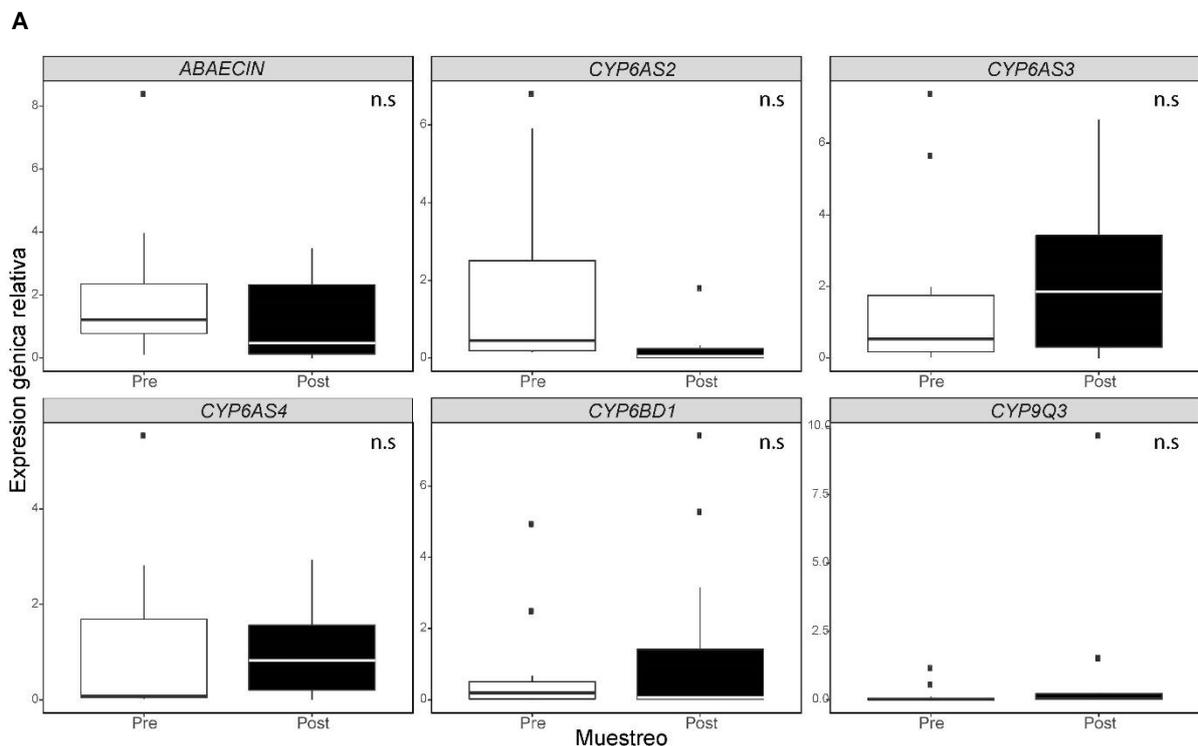
Figura 3.8. Actividad recolectora. A-C-E) Antes y después de la administración de herbicidas de post-emergencia. **B-D-F)** Para cada apiario. **A-B)** Número total de abejas que ingresan a la colmena por minuto, **C-D)** número de abejas que ingresan a la colmena con polen en sus corbículas por minuto y **E-F)** ratio de ingresos con polen sobre ingresos totales. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. El p valor corresponde a diferencias entre muestreos (N = 24; Prueba de Wilcoxon). Letras diferentes señalan diferencias significativas entre los apiarios ubicados en los diferentes lotes ($p < 0,001$; N = 16; Prueba de Friedman), (n.s: $p > 0,05$).

El análisis estadístico reveló que, en el caso de las tres variables, la recolección fue significativamente menor en el muestreo posterior a la aplicación de herbicidas de post-emergencia (Prueba de Wilcoxon; N = 24; $p < 0,001$; Tabla A3.1), a pesar de que la disponibilidad de recursos florales fue mayor en el segundo muestreo, debido a la floración del cultivo. Además, el ingreso de polen varió significativamente entre apiarios, siendo mayor, tanto la recolección de polen como la proporción de ingresos de abejas con polen en sus corbículas sobre el total de abejas entrantes, en el apiario del lote C (Prueba de Friedman; N = 16; $p < 0,001$; Tabla A3.1). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre apiarios para la recolección total (Tabla A3.1).

3.3.2 Abordaje molecular: Análisis de expresión de genes asociados a detoxificación de xenobióticos

Los niveles de expresión relativa del péptido antimicrobiano *AB* y los citocromos *P450 CYP6AS2*, *CYP6AS3*, *CYP6AS4*, *CYP6BD1* y *CYP9Q3* fueron medidos para evaluar los estados fisiológicos de las colonias de cada apiario, localizados en lotes con diferentes características en cuanto al cultivo

sembrado y el porcentaje de flora silvestre, y en cada momento de muestreo, pre y post aplicación de herbicidas de post-emergencia. Dichos niveles de expresión fueron estudiados en intestinos de abejas jóvenes de interior de colmena y en larvas en el estadio cinco. En el caso de abejas adultas, no se observaron diferencias significativas entre muestreos (Figura 3.9, Tabla A3.2). Por el contrario, en el caso de las larvas, se registraron diferencias significativas entre muestreos para los niveles de expresión de *CYP6AS4* (Prueba de Wilcoxon; N = 12; p = 0,012; Tabla A3.2) y *CYP6BD1* (Prueba de Wilcoxon; N = 12; p = 0,034; Tabla A3.2). En ambos casos, la expresión relativa fue menor luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas (Figura 3.10). Sin embargo, en relación a la expresión relativa en larvas, no se observaron diferencias significativas entre los apiarios (Figura 3.10, Tabla A3.2). Contrariamente, sí se registraron diferencias significativas entre los colmenares de los distintos lotes para los niveles de expresión relativa de *CYP6AS4* y *CYP9Q3* en el caso de abejas jóvenes de interior de colmena (Figura 3.9). La expresión relativa del citocromo *CYP6AS4*, fue significativamente menor en el apiario del lote A en comparación con los apiarios de los lotes B y C (Prueba de Friedman; N = 8; p < 0,001; Tabla A3.2), mientras que la expresión relativa del citocromo *CYP9Q3* fue significativamente mayor en el colmenar del apiario C en comparación con los colmenares de los lotes A y B (Prueba de Friedman; N = 8; p < 0,001; Tabla A3.2).



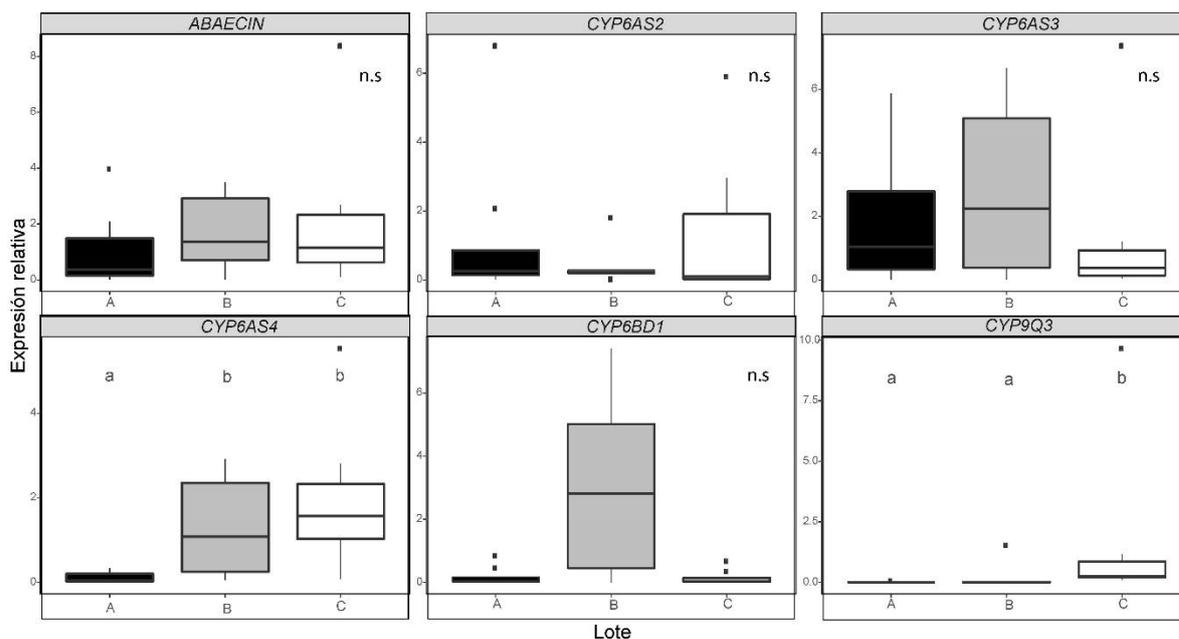
B

Figura 3.9. Expresión génica relativa en abejas adultas jóvenes de interior de colmena, A) pre y post aplicación de herbicidas de post emergencia y B) en los apiarios de los diferentes lotes. Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. El gen constitutivo *Rp18* fue utilizado como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de herbicidas de post-emergencia, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha aplicación. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. Letras diferentes señalan diferencias significativas entre los apiarios ubicados en los diferentes lotes ($p < 0,001$; $N = 8$; Prueba de Friedman). No se encontraron diferencias significativas (n.s: $p > 0,05$) entre muestreos para ninguno de los genes de interés ($N = 12$; Prueba de Wilcoxon).

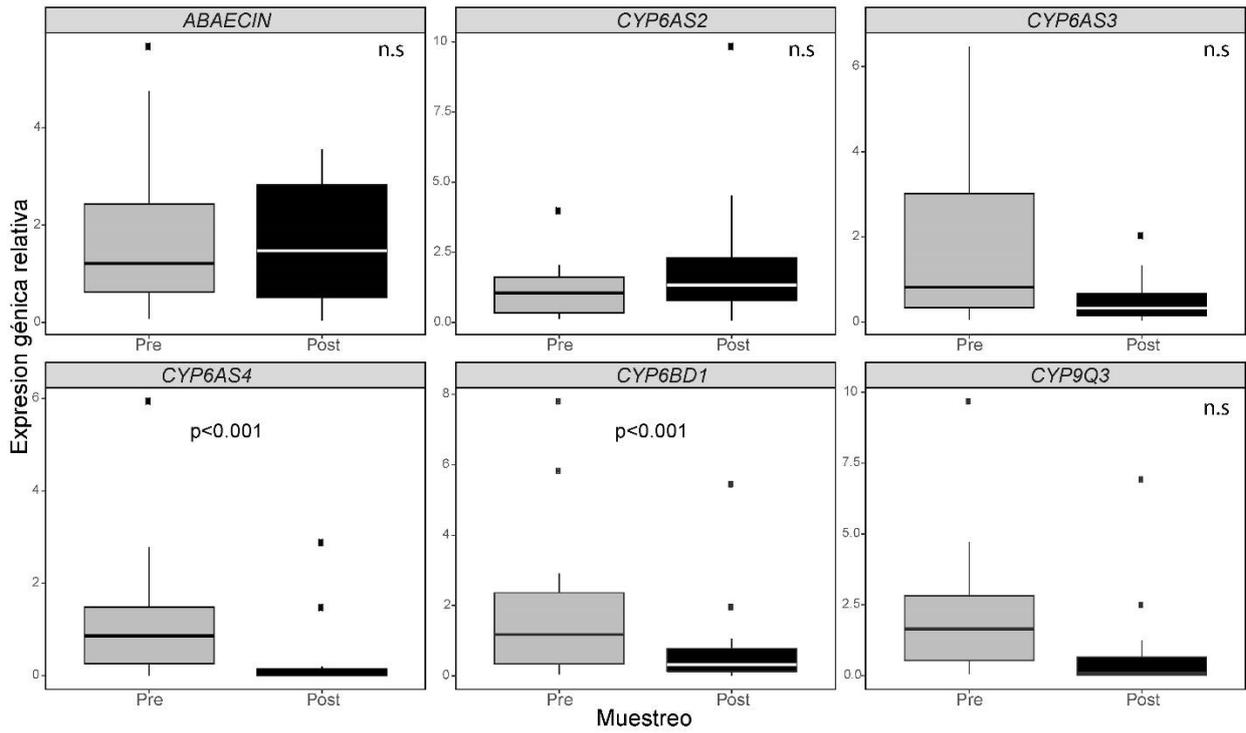
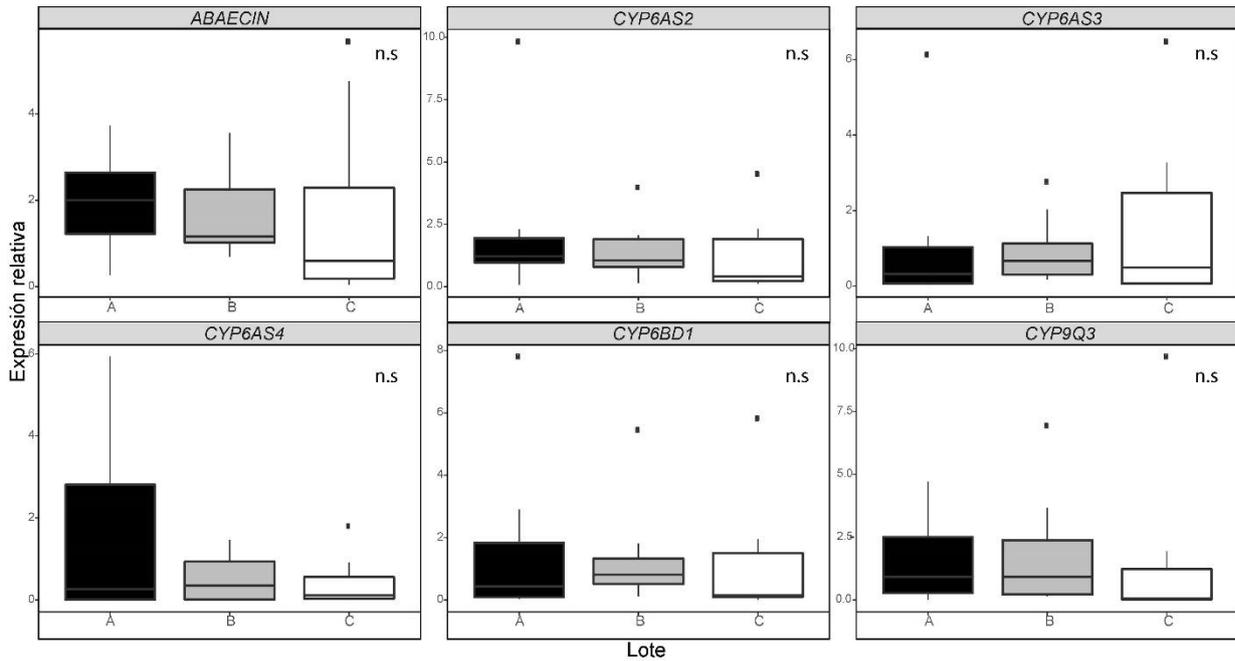
A**B**

Figura 3.10. Expresión génica en larvas, A) pre y post aplicación de herbicidas de post emergencia y B) en los apiarios de los diferentes lotes. Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El gen constitutivo *Rpl8* fue utilizado como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de herbicidas de post-emergencia, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha aplicación. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. El p valor indica diferencias significativas entre muestreos (N = 12;

Prueba de Wilcoxon). No se encontraron diferencias significativas (n.s: $p > 0,05$) entre los apiarios ubicados en los distintos lotes para ninguno de los genes de interés (N = 8; Prueba de Friedman).

3.3.3 Abordaje multivariado: Análisis de correlaciones y Análisis de Componentes Principales (ACP)

La prueba de correlación no paramétrica de Kendall, utilizada para datos que no se distribuyen de manera normal, muestra -en el caso de abejas jóvenes de interior de colmena- una correlación fuerte y positiva entre las expresiones relativas del citocromo *CYP6BD2* y los citocromos *CYP6AS2* (Tau = 0,779; $z = 3,506$; $p < 0,001$), *CYP6AS4* (Tau = 0,657; $z = 2,956$; $p = 0,003$) y *CYP9Q3* (Tau = 0,748; $z = 3,368$; $p < 0,001$) luego de la aplicación de herbicidas de post-emergencia (Tabla A3.3). Además, *CYP6AS2* correlacionó positiva y significativamente con *CYP6AS4* (Tau = 0,515; $z = 2,501$; $p = 0,021$) y *CYP9Q3* (Tau = 0,667; $z = 3,155$; $p = 0,002$). Finalmente, *CYP6AS4* y *CYP9Q3* mostraron una correlación positiva y significativa (Tau = 0,848; $z = 4,132$; $p < 0,001$). Por otro lado, en el caso de las muestras de larvas en el quinto estadio, solo los citocromos *CYP6AS3* y *CYP6AS4* mostraron una correlación positiva y significativa (Tau = 0,461; $z = 2$; $p = 0,046$; Tabla A3.4).

También se analizó la correlación entre la expresión relativa del mismo gen biomarcador para ambos tipos de tejido: abejas jóvenes de interior de colmena y larvas (Tabla A3.5). Solo se observó una correlación positiva y significativa para el citocromo *CYP9Q3* (Tau = 0,504; $z = 2,268$; $p = 0,023$). Al momento de analizar las correlaciones entre variables de actividad recolectora y variables de expresión génica, encontramos que la recolección de polen correlacionó positiva y significativamente tanto con *CYP6AS2* (Tau = 0,328; $z = 2,121$; $p = 0,034$) como con *CYP6AS4* (Tau = 0,349; $z = 2,251$; $p = 0,024$; Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Correlación entre las variables de actividad recolectora y la expresión relativa de los diferentes genes estudiados en abejas jóvenes de interior de colmena, luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia. Valores de Tau, z y p, obtenidos de la Prueba de correlación de Kendall, (en negrita $p < 0,05$).

Variables correlacionadas	Tau	Valor z	p valor
Tasa de ingresos totales - <i>AB</i>	0,099	0,671	0,502
Tasa de ingresos totales - <i>CYP9Q3</i>	-0,153	-1,024	0,306
Tasa de ingresos totales - <i>CYP6BD1</i>	-0,073	0,497	0,619
Tasa de ingresos totales - <i>CYP6AS2</i>	0,080	0,546	0,585
Tasa de ingresos totales - <i>CYP6AS3</i>	0,077	0,522	0,602
Tasa de ingresos totales - <i>CYP6AS4</i>	0,077	0,522	0,602
Tasa de ingresos con polen - <i>AB</i>	0,273	1,759	0,078
Tasa de ingresos con polen - <i>CYP9Q3</i>	0,037	0,234	0,815
Tasa de ingresos con polen - <i>CYP6BD1</i>	-0,004	-0,026	0,979
Tasa de ingresos con polen - <i>CYP6AS2</i>	0,328	2,121	0,034
Tasa de ingresos con polen - <i>CYP6AS3</i>	0,124	0,802	0,422
Tasa de ingresos con polen - <i>CYP6AS4</i>	0,349	2,251	0,024
Ratio polen/totales - <i>AB</i>	0,369	2,402	0,016
Ratio polen/totales - <i>CYP9Q3</i>	0,057	0,363	0,716
Ratio polen/totales - <i>CYP6BD1</i>	-0,008	0,052	0,959
Ratio polen/totales - <i>CYP6AS2</i>	0,242	1,575	0,115
Ratio polen/totales - <i>CYP6AS3</i>	0,079	0,516	0,605
Ratio polen/totales - <i>CYP6AS4</i>	0,206	1,342	0,179

Con la finalidad de entender los perfiles de expresión relativa teniendo en cuenta la totalidad de los genes, para larvas y abejas de interior de colmenas por separado, se realizó un análisis de componentes principales teniendo en cuenta las variables de expresión génica relativa en el muestreo posterior a la aplicación de la mezcla de herbicidas. Por un lado, los primeros tres componentes principales del análisis multivariado de abejas jóvenes de interior de colmena explican el 85,60% de la proporción de variabilidad acumulada (Tabla A3.6). Los citocromos *CYP6AS4*, *CYP9Q3* y *CYP6BD1* son los que mejor explican el primer componente principal (CP1), mientras que *CYP6AS2* es el citocromo que mejor explica el segundo componente principal (CP2). A su vez, *AB* es el gen que mejor explica el tercer componente principal (CP3), (Tabla A3.7). La dimensión limitada por los CP1 y CP2 discrimina las observaciones individuales en dos grupos, por un lado, queda determinado el apiario del lote B, y por el otro, los apiarios de los lotes A y C. Estos dos componentes

principales absorben el 47,1% y el 19,9% de la variabilidad, respectivamente (Figura 3.11). De esta manera, la expresión relativa de los citocromos *CYP6AS2*, *CYP6AS4*, *CYP9Q3* y *CYP6BD1* luego de la aplicación de herbicidas de post-emergencia son las variables que diferencian el estado fisiológico de las abejas jóvenes de interior de colmena de las colonias presentes en los distintos lotes. Por otro lado, los tres primeros componentes principales del análisis multivariado de las larvas explican el 85,5% de la proporción de variabilidad acumulada (Tabla A3.6). *CYP6AS4* es el gen que mejor explica el primer componente principal (CP1), mientras que los citocromos *CYP9Q3* y *CYP6BD1* son los que mejor explican el segundo componente principal (CP2). A su vez, *AB* es el gen que mejor explica el tercer componente principal (CP3), (Tabla A3.7). Sin embargo, el análisis multivariado para las expresiones génicas relativas de las muestras de larvas no muestra ninguna discriminación entre apiarios (Figura 3.12).

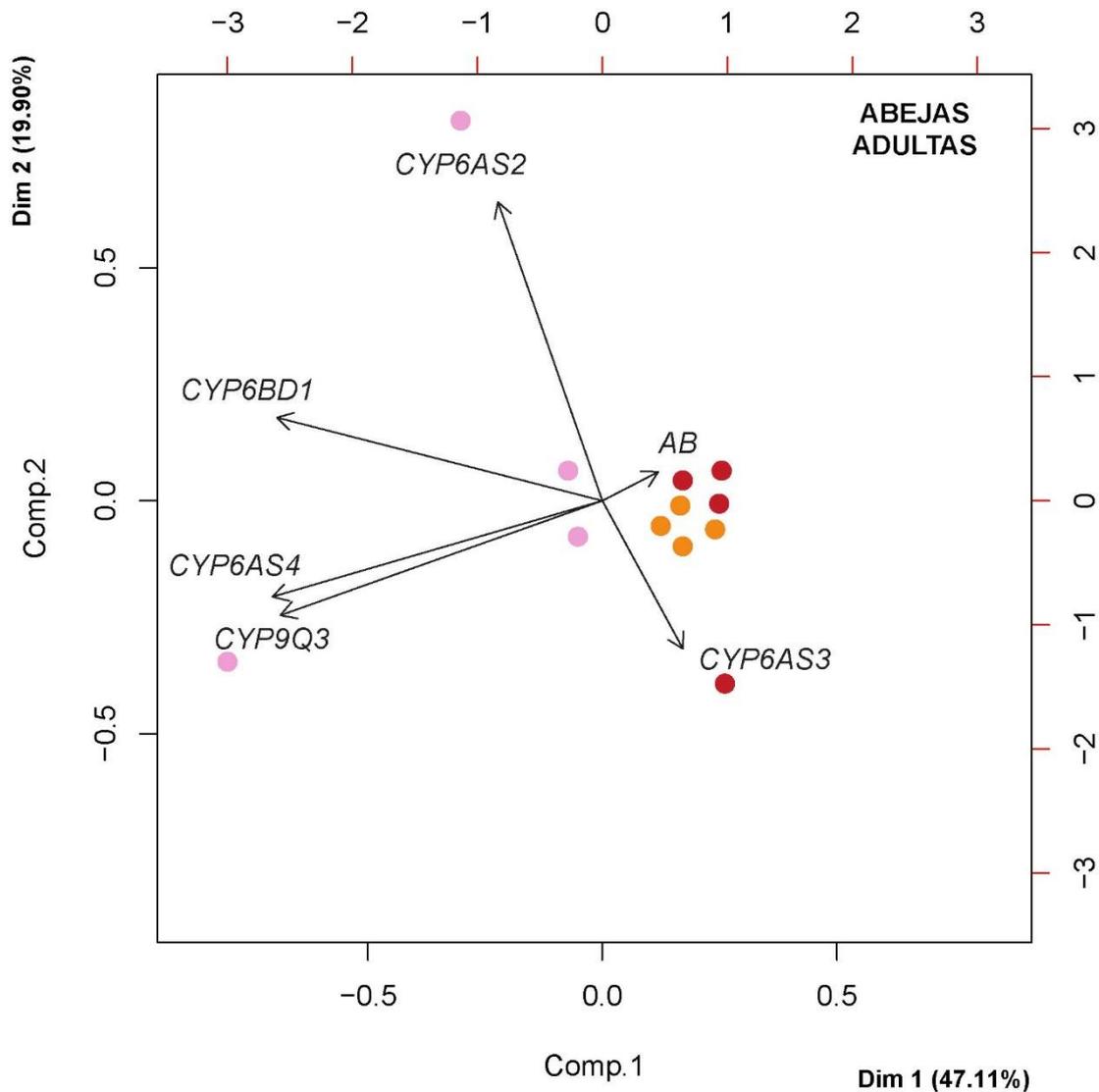


Figura 3.11. Análisis de componentes principales (ACP) del perfil de expresión génica luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia de abejas adultas jóvenes de interior de colmena. Las variables están expresadas en los Comp. 1 y 2 (ver Tabla A3.7). El mapa de observaciones individuales muestra la diferenciación del apiario del lote B (círculos rosas) con respecto a los apiarios de los lotes A (círculos naranjas) y C (círculos rojos). Los CP1 y CP2 explican el 47,10% y el 19,90% de la variabilidad, respectivamente.

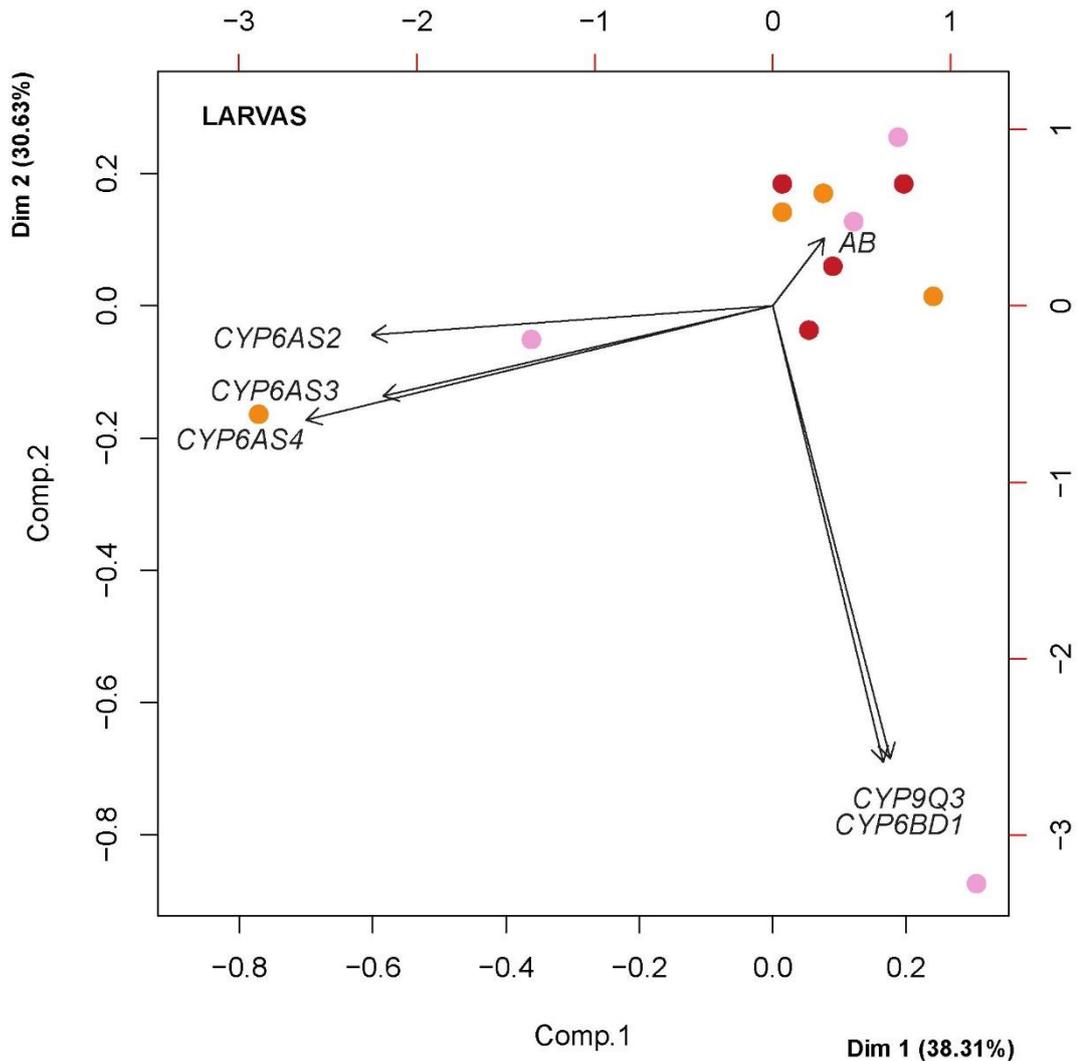


Figura 3.12. Análisis de componentes principales (ACP) del perfil de expresión génica luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia de las larvas. Las variables están expresadas en los Comp. 1 y 2 (ver Tabla A3.7). El mapa de observaciones individuales no revela ninguna diferenciación entre apiarios. Los CP1 y CP2 explican el 38,31% y el 30,63% de la variabilidad, respectivamente.

3.4 Discusión

Los resultados obtenidos muestran una disminución en las tres variables de actividad recolectora estudiadas (tasa de ingresos totales, tasa de ingresos con polen y el ratio polen/total) en el muestreo realizado veinte días después de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia. A su vez, en el caso de las larvas se observó una disminución en los niveles de expresión relativa de varios de los genes biomarcadores de estrés analizados, en el muestreo posterior a la administración de herbicidas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre muestreos en el caso de las muestras de intestinos de abejas jóvenes de interior de colmena. Esto podría indicar la existencia de diferentes niveles de susceptibilidad, exposición o ambos, entre larvas y obreras, reflejados en sus diferentes respuestas detoxificantes. Además, los resultados muestran diferencias significativas en la expresión relativa de los genes biomarcadores de estrés entre los apiarios de los diferentes lotes para las muestras de intestinos de abejas. Por el contrario, estas diferencias no se observaron en el caso de las larvas. Adicionalmente, se registraron correlaciones positivas entre la recolección de polen y la expresión relativa de los citocromos *P450* en abejas adultas. A su vez, para este mismo tejido, el ACP revela una discriminación entre apiarios para el perfil de expresión génica en el muestreo posterior a la aplicación de herbicidas. En este sentido, los genes biomarcadores de respuesta a la exposición de pesticidas que discriminan a los apiarios de los diferentes lotes en el ACP, son los mismos que correlacionan con la recolección de polen. Por un lado, estos resultados sugieren que la recolección de polen y las diferencias en la composición del entorno de los diferentes apiarios presentes en los distintos lotes, en cuanto a la proporción de flora silvestre y el tipo de cultivo sembrado, podrían influenciar la respuesta detoxificante de las obreras. Por otro lado, el efecto de la mezcla de herbicidas sobre la respuesta detoxificante de las larvas parecería no estar influenciada por dicha composición del entorno de las colonias.

En el caso de las larvas, se encontraron diferencias significativas entre muestreos para la expresión relativa de los citocromos *CYP6BD1* y *CYP6AS4*, exhibiendo ambos una disminución en el nivel de expresión luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas. En concordancia con este resultado, se observó una sub-expresión de *CYP6AS4* luego de la exposición a GLI en larvas criadas *in vitro* (Vázquez et al., 2018). Además, se ha observado una consistente modulación del metabolismo de xenobióticos y la inmunidad por la ingesta de GLI por parte de la cría de abejas melíferas en diferentes experimentos *in vitro* (Gregorc et al., 2012; Vázquez et al., 2020). Por otra parte, se observó que colonias de abejas melíferas alimentadas con 2,4-D redujo la producción de cría a una concentración de 100 ppm y falló la eclosión de los huevos cuando la colonia se vio expuesta a una concentración de 1000 ppm (Morton et al., 1972). Otro factor a considerar es la alteración de la microbiota intestinal en abejas melíferas luego de la ingesta de GLI, efecto evidenciado en múltiples trabajos previos (Dai et al., 2018; Motta et al., 2018; Blot et al., 2019). Por ejemplo, la presencia de ciertas bacterias colonizadoras tempranas durante el desarrollo, tales como

Snodgrassella alvi, pueden modular las vías de detoxificación de la Fase I al afectar la expresión de los citocromos *P450* (Schwarz et al., 2016), claves para la metabolización de agroquímicos (Claudianos et al., 2006). Cuando las abejas recolectoras vuelven a la colonia luego de sus vuelos de forrajeo, pueden transferir alimento contaminado a sus compañeras jóvenes que realizan tareas en el interior de la colmena al compartir con ellas el néctar directamente, a través de la trofalaxia, o al entrar éstas en contacto con el alimento contaminado que ha sido almacenado (DeGrandi-Hoffman y Martin, 1993; Grüter y Farina, 2007). A su vez, por medio de las obreras que realizan tareas de cuidado y alimentación de las crías, ese alimento puede llegar también a las larvas. De esta forma, los resultados obtenidos con respecto a la modulación de la transcripción del set de biomarcadores de respuesta detoxificante elegidos sugieren algún nivel de exposición química a herbicidas residuales a mediano plazo.

En relación a las obreras jóvenes de interior de colmena, el análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los apiarios ubicados en diferentes lotes para la expresión relativa de los citocromos *CYP6AS4* y *CYP9Q3*. Las colonias del lote C, aquel con el mayor porcentaje de flora silvestre en su entorno, exhibieron una sobre-expresión de estos genes en comparación con las colonias del lote A, aquel con la menor proporción de flora silvestre en su entorno. A su vez, el colmenar del lote B mostró un perfil de expresión similar a las colonias del lote A en el caso de *CYP9Q3*, pero similar al perfil de expresión del apiario del lote C en el caso de *CYP6AS4*. Las abejas recién emergidas y las obreras nodrizas consumen polen para poder desarrollar sus glándulas hipofaríngeas y mandibulares y poder producir el alimento para las larvas (Rotais et al., 2005). En este sentido, las colonias ubicadas en el lote C registraron una significativa mayor recolección de polen en comparación con las colonias ubicadas en los otros dos lotes. Adicionalmente, la prueba de Kendall mostró una correlación positiva y significativa entre la recolección de polen y la expresión relativa de *CYP6AS4* en abejas adultas. Consistentemente, estudios previos evidenciaron que la ingesta de polen afecta los niveles de transcripción de los citocromos *P450* (Alaux et al., 2011; Corby-Harris et al., 2014). En efecto, una de las principales características de la intensificación agrícola a nivel mundial, que incluye un mayor uso de pesticidas, es la reducción de la diversidad floral, resultando en un viraje desde hábitats heterogéneos a unos más homogéneos (Decourtye et al., 2010). Por lo tanto, los hábitats naturales o semi-naturales proporcionan áreas de forrajeo menos disturbadas para las abejas, lo que podría ayudar a mantener la biodiversidad general al amortiguar la variación temporal de los recursos (Ricketts et al., 2008). Como resultado, estas áreas podrían actuar como estabilizadores, ofreciendo fuentes de néctar y polen más abundantes.

En general, las abejas adultas tienden a sobre-expresar los diferentes citocromos *P450* estudiados en el segundo muestreo post aplicación de herbicidas, mientras que la tendencia de las larvas es a sub-expresar estos genes luego de dicha administración. *CYP9Q3* fue el único gen biomarcador de respuesta a la exposición de agroquímicos que presentó una correlación positiva y significativa en ambos tejidos, en el muestreo posterior a la aplicación de la mezcla de herbicidas. Dado que la supervivencia de la colonia depende de tareas colectivas, es importante tener en cuenta la posible

exposición a agroquímicos por parte de las abejas pre-recolectoras que permanecen cumpliendo su rol dentro de la colmena (Farina et al., 2019). Estas abejas jóvenes se alimentan de los recursos alimenticios que ingresan a la colonia a través de las abejas recolectoras, así como también, de las reservas almacenadas en los cuadros y realizan tareas dentro de la colmena que garantizan el cuidado y mantenimiento de la colonia (Seeley, 1995). Estudios previos han demostrado que las abejas adultas expuestas a agroquímicos sobre-expresan los genes detoxificantes (Mao et al., 2011; Boncristiani et al., 2012; Schmehl et al., 2014). Tomé y colaboradores observaron que múltiples genes relacionados a la detoxificación de xenobióticos se sobre-expresaron en abejas recién emergidas expuestas a glifosato y otros agroquímicos, incluso cuando esta exposición se dio casi dos semanas antes, durante el desarrollo del estadio larval (Tomé et al., 2020). Por el contrario, estos mismos autores observaron una sub-expresión de los genes detoxificantes en el caso de las larvas que fueron expuestas a estos mismos pesticidas. En el caso de los resultados obtenidos en esta temporada, observamos una tendencia similar en la regulación de las vías de detoxificación en larvas y abejas jóvenes de interior de colmena colectadas en una situación real de campo. La sub-expresión de los citocromos *P450* durante el estadio larval podría estar relacionado a otros trastornos tales como una baja supervivencia, una pobre regulación del desarrollo y diversos trastornos morfológicos (Tomé et al., 2020).

Con respecto a la actividad recolectora, se encontraron diferencias significativas entre muestreos para la recolección total, la recolección de polen y la relación entre la recolección de polen y la recolección total, siendo menores estas variables recolectoras luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas. Este comportamiento es opuesto al que hubiésemos esperado sin el efecto negativo del tratamiento contra las malezas, debido a que en el primer muestreo, y en los tres lotes, solo estaba en flor parte de la vegetación silvestre dentro del área de forrajeo, mientras que en el caso del segundo muestreo- post aplicación de herbicidas- en los tres lotes las abejas contaban tanto con los recursos florales de la vegetación silvestre en las zonas buffer, como la de los cultivos sembrados en sus entornos. A su vez, como se mencionó previamente, las colonias establecidas en el lote C mostraron una mayor recolección de polen y una mayor proporción de polen colectado en relación a la recolección total, en comparación a los apiarios de los otros dos lotes, ambos con menor proporción de vegetación silvestre que el lote C.

Teniendo en cuenta el perfil de expresión relativa de todos los genes estudiados para las muestras de intestinos de abejas jóvenes de interior de colmena, el ACP también reveló una discriminación entre los apiarios ubicados en los diferentes lotes. Hubiésemos esperado que las colonias del lote C se distinguieran del apiario del lote A, debido a que son los que presentan los porcentajes de flora silvestre más extremos - mayor y menor - respectivamente. Sin embargo, la dimensión limitada por los CP1 y CP2 separan las observaciones individuales en dos grupos, las colmenas de los lotes B por un lado y las colmenas de los lotes A y C por el otro. Entre los genes que mejor explican los CP1 y CP2 se encuentran *CYP6AS4* y *CYP6AS2*, respectivamente. Estos son justamente los citocromos cuyas expresiones relativas exhibieron una correlación positiva y significativa con la recolección de

polen. Esto indicaría que la recolección de polen podría influir sobre los perfiles de expresión de estos dos genes relacionados a la detoxificación de xenobióticos, al menos en el caso de las abejas adultas. En estudios previos, se observó una fuerte superposición entre la expresión de genes de respuesta a pesticidas y genes de respuesta a la dieta (Schmehl et al., 2014), registrándose, además, que la expresión de varios miembros de las familias *CYP4* y *CYP6* de los citocromos *P450* disminuye debido a una dieta empobrecida en abejas nodrizas (Corby-Harris et al., 2014). En este sentido, teniendo en cuenta los cultivos sembrados en el campo de estudio, la calidad de polen es pobre en el caso del girasol y maíz, con niveles de proteína cruda por debajo del 20% necesario para alcanzar los requerimientos básicos de la nutrición de las abejas melíferas (Somerville, 2001). En el caso del cultivo de soja, sus flores son visitadas principalmente para la recolección de néctar (Chiari et al., 2005). De esta forma, la composición floral del entorno de los apiarios localizados en los diferentes lotes podría contribuir a las diferencias en la respuesta de detoxificación de las abejas melíferas. Así, una interrelación subyacente entre las variables, que incluye el perfil de expresión relativa de todos los genes de detoxificación estudiados y los niveles de recolección de polen en el muestreo posterior a la aplicación de herbicidas, sumado a las características del tipo de cultivo sembrado y las especies y proporción de vegetación silvestre presentes en el entorno del lote B, podría diferenciar la respuesta detoxificante de las colonias de su apiario, en comparación a las colonias ubicadas en los otros dos lotes. Por el contrario, no se encontró una distinción entre apiarios en el ACP analizado para las muestras de larvas en el muestreo posterior a la aplicación de la mezcla de herbicidas. La mayor parte del polen disponible en la colmena es consumida por las obreras y, en menor medida, por las larvas (Rortais et al., 2005). El alto contenido proteico de las jaleas con las que se alimenta a las larvas derivan de las secreciones de las glándulas hipofaríngeas de las abejas nodrizas (Keller et al., 2005), por lo que estas pueden llegar a consumir hasta 65 mg de polen en diez días para el desarrollo de dichas glándulas (Rortais et al., 2005).

Teniendo en consideración todo lo mencionado, la heterogeneidad del entorno en los diferentes apiarios influencia la respuesta de detoxificación de las abejas jóvenes de interior de colmena, sugiriendo que la nutrición podría modular el impacto de los agroquímicos -en este caso los herbicidas- sobre las obreras. Por otro lado, el estrés ambiental luego del tratamiento contra las malezas tiene un impacto sobre las vías de detoxificación en el caso de las larvas, independientemente del entorno de las colonias. El costo energético del desarrollo, combinado con la protección social a través de los mecanismos de amortiguación a nivel de colonia, podría explicar las diferencias en los patrones de expresión génica entre las larvas y los adultos expuestos a la mezcla de herbicidas (Tomé et al., 2020).

SITUACIÓN DE CAMPO 2: Exposición a mezcla de insecticidas y fungicidas por aplicación aérea. Evaluación de actividad recolectora, de residuos de pesticidas en productos de colmena y de perfiles de expresión de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos en larvas

4.1 Introducción

La agricultura mundial se ha expandido sustancialmente en las últimas décadas, con un importante aumento de la extensión de los cultivos altamente dependientes de los polinizadores (Aizen et al., 2008; Aizen et al., 2019). Sin embargo, aunque la dependencia mundial de los polinizadores es cada vez mayor, muchas prácticas agrícolas modernas siguen amenazando a las abejas y los servicios de polinización (Aizen et al., 2019). La exposición a los agroquímicos por parte de las abejas puede tomar múltiples vías (Sgolastra et al., 2018). Una de ellas es por ingesta, ya sea al encontrarse con recursos contaminados recogidos durante el forrajeo en el caso de las obreras recolectoras como al consumir miel, jalea real o polen contaminados dentro de la colmena, en el caso de abejas jóvenes o larvas (Martínez-Domínguez et al. 2014, Sánchez-Bayo y Goka 2014). Además, puede producirse exposición por contacto, en el exterior de la colmena, cuando las abejas son fumigadas mientras buscan alimento o en el interior de ella, cuando se desarrollan en celdas de cera contaminadas (Johnson et al., 2009; Traynor et al., 2016). La mayoría de los estudios se centran en las abejas adultas, siendo que la exposición de las larvas a los pesticidas es igual o hasta quizás más importante, dado que el éxito de las colonias depende del desarrollo y la salud de las mismas (Tomé et al., 2020).

Los granos, los cereales, las semillas oleaginosas, las frutas y las hortalizas dependen de los fungicidas para controlar las infestaciones fúngicas y favorecer el rendimiento (Zubrod et al., 2019). Estos compuestos representan más del 35% del mercado mundial de plaguicidas y se prevé que su uso siga aumentando en el futuro (Research and Markets, 2015; Zubrod et al., 2019). El Difenconazol (DIFENO) es un fungicida triazol, perteneciente a la familia de los azoles, que actúan como inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (fungicidas EBI), alterando la estructura de la membrana celular fúngica (Guo et al., 2010). A su vez, el DIFENO está autorizado para ser aplicado durante el periodo de floración de los cultivos (Almasri et al., 2020). En el caso de los insecticidas, la lambda-cialotrina (LC), es un tipo de piretroide que altera el funcionamiento normal del sistema nervioso de los insectos al actuar sobre los canales de sodio activados por voltaje y, además, sobre

los canales de calcio y cloro (Burr y Ray, 2004), lo que provoca hiperactividad, descoordinación, parálisis y, finalmente, la muerte (Du et al., 2009). A su vez, el clorantraniliprole (CLOR) es un insecticida del tipo de las diamidas, el cual induce una liberación de calcio dependiente de la dosis de los almacenes internos de las células musculares de los insectos, pero también un bloqueo dependiente de la dosis de la corriente de calcio activada por voltaje que participa en los músculos y la excitabilidad del cerebro (Kadala et al., 2019).

La exposición a múltiples pesticidas por parte de los polinizadores puede ocurrir debido a la aplicación de mezclas de productos en simultáneo, pero también, puede darse cuando diferentes agroquímicos son aplicados secuencialmente (Martins et al., 2022). Al considerarse de baja toxicidad para las abejas, como se mencionó para el caso particular del DIFENO, los fungicidas en general pueden pulverizarse cuando los cultivos atractivos para los insectos están en flor (Xavier et al. 2020; Almasri et al. 2021). De esta manera, los polinizadores experimentan una exposición crónica a concentraciones residuales de insecticidas sistémicos y una exposición aguda a altas concentraciones de fungicidas (Martins et al., 2022). De hecho, se han encontrado residuos de cialotrina en polen, cera y abejas de diferentes apiarios norteamericanos, incluidos las celdas de cría donde las abejas ponen los huevos y se desarrollan las larvas (Mullin et al., 2010). Además, se han encontrado trazas de LC en néctar y granos de polen (Abdel razik, 2019) y residuos de CLOR en el pan de abeja y la miel de *Apis cerana cerana* (Wang et al., 2022).

Varios estudios han demostrado que algunas combinaciones de insecticidas y fungicidas inducen efectos tóxicos sinérgicos en las abejas (Pilling et al. 1995; Thompson y Wilkins 2003; Johnson et al. 2013; Thompson et al. 2014; Wang et al. 2020). Esta interacción se produce porque los fungicidas SBI modifican los procesos metabólicos de detoxificación en las abejas al inhibir la acción de los citocromos *P450* (Berenbaum y Johnson 2015; Carnesecchi et al. 2019). Debido a esto, los perfiles de expresión de estos biomarcadores de respuesta a pesticidas pueden utilizarse para evaluar el estado fisiológico de las larvas, dado que revelan signos de estrés incluso cuando no se registran síntomas conspicuos evidentes (Vázquez et al., 2020). Por último, meta-análisis recientes sugieren que los efectos subletales de los fungicidas sobre las abejas han sido relativamente poco estudiados, especialmente en condiciones de campo (Cullen et al., 2019; Noi et al., 2021).

Teniendo todo esto en consideración, el objetivo para esta temporada de muestreos fue evaluar el impacto a medio término de la aplicación de una mezcla de herbicidas, fungicidas e insecticidas aplicados de manera seriada, sobre las vías de detoxificación de las larvas y la actividad recolectora de colonias de abejas melíferas ubicadas en diferentes cultivos de verano. Además, analizar la presencia de pesticidas en matrices apícolas, tales como cera y miel, en esas mismas colonias, así como también, evaluar si las concentraciones de agroquímicos encontradas correlacionan con los perfiles de expresión registrados. A su vez, analizar si dicho impacto depende de las características de los cultivos y la proporción de parches de flora silvestre presentes en los entornos de los diferentes apiarios estudiados.

4.2 Metodología

4.2.1 Sitio de estudio, cultivos y aplicación de agroquímicos

Esta segunda temporada de muestreos se realizó durante el verano del 2019, en la misma estancia San Claudio, descripta en la sección 2.1 (Figura 4.1). Los cultivos sembrados este verano fueron mayoritariamente soja (Nidera 4611) y, en menor medida, maíz (GL Stack 4500). Ambos cultivos GM, tolerantes a herbicidas.

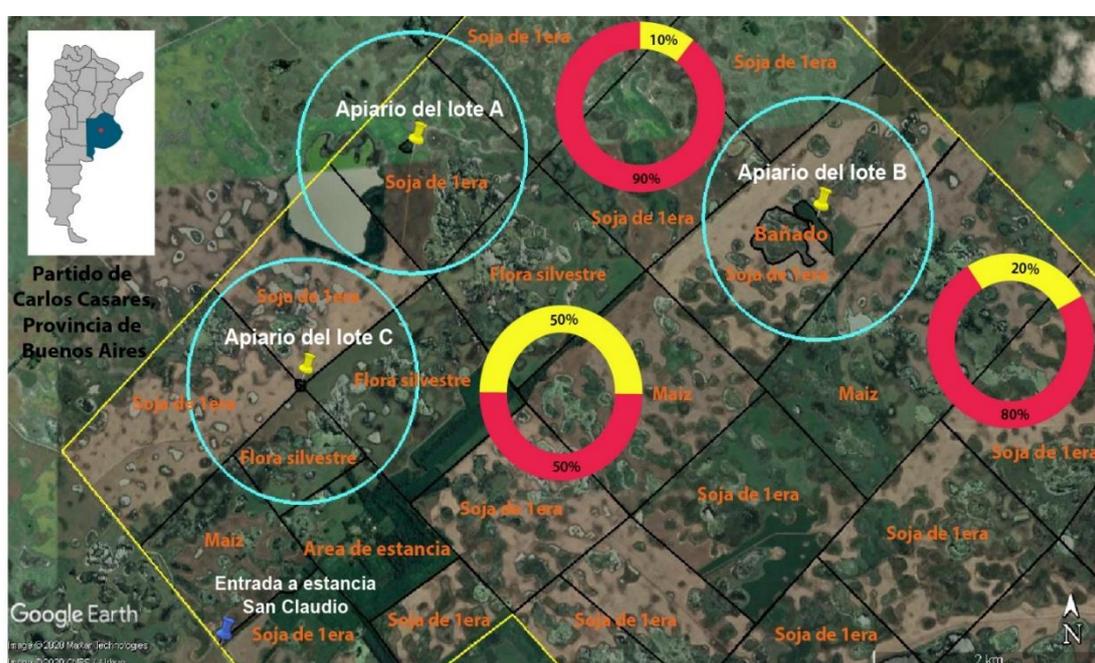
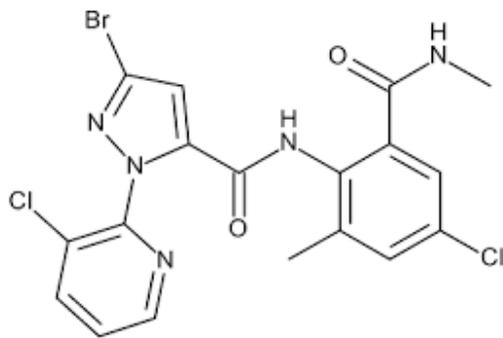


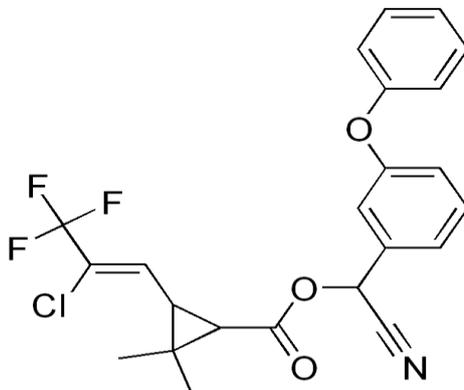
Figura 4.1. Ubicación geográfica de los tres apiarios estudiados. Estancia San Claudio, Carlos Casares, provincia de Buenos Aires, Argentina. Temporada 2019. Las circunferencias de color celeste muestran un radio de 1 km desde cada apiario, indicando el área potencial de recolección. Los círculos que presentan la clasificación por color en cultivo (rosa) y flora silvestre (amarillo), indican el porcentaje de cada tipo de vegetación. En color naranja se especifica el tipo de vegetación presente en cada lote. Mapa y delimitación de áreas de navegación realizados en Google Earth.

Ambos cultivos fueron sembrados durante el mes de octubre de 2018. La aplicación del herbicida de post emergencia GLI (Figura 3.1) se realizó en todos los cultivos a principios de enero de 2019, a través de pulverizadora terrestre (1,5 L/ha), antes de su floración. A su vez, se administró en simultáneo el insecticida comercial AMPLIGO®, cuyos compuestos activos son el CLOR y la LC (Figura 4.2) y el fungicida (MIRAVIS DUO®), cuyo compuesto activo es el DIFENO (Figura 4.2). Esta mezcla de insecticida y fungicida se aplicó de manera aérea (40 cc/ha), con avión, a principios de

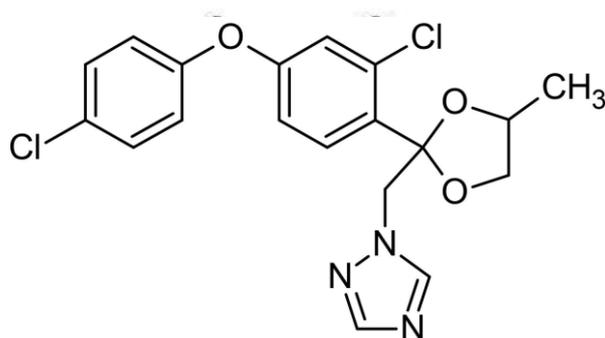
febrero, cuando el cultivo ya estaba en flor (Figura 4.3). El primer muestreo se realizó a principios de enero de 2019, tres días antes de la administración de herbicidas, mientras que el segundo muestreo fue llevado a cabo a mediados de febrero, treinta días después de la administración del herbicida y diez días después de la aplicación aérea de la mezcla de fungicida e insecticida. Durante los periodos de muestreo los apicultores no trataron a las colmenas con antibióticos o acaricidas. Al igual que en las campañas anteriores, los cultivos estaban en su etapa vegetativa al momento del primer muestreo y durante la aplicación de herbicidas, sin flores disponibles para el forrajeo de las abejas (Fehr et al., 1971; Schneiter y Miller, 1981; Ritchie y Hanway, 1982). Por el contrario, al momento del segundo muestreo, todos los cultivos estaban en flor.



CLORANTANILIPROLE



LAMDACIALOTRINA



DIFENOCONAZOLE

Figura 4.2. Esquema de las moléculas de los componentes activos de la mezcla de insecticidas (Clorantniliprole y lambdacialotrina) y fungicida (Difenoconazole) aplicados de manera aérea en esta temporada.



Figura 4.3. Aplicación aérea sobre cultivo de maíz. Crédito fotográfico: INSSOC.

Las condiciones climáticas fueron similares en ambos muestreos y óptimas para la actividad de recolección de las abejas, con un promedio de temperatura de 29 y 30 °C y de humedad relativa de 56 y 57%, respectivamente. Además, ambos muestreos fueron en días soleados, sin vientos fuertes ni lluvias.

La disposición de los apiarios y las características del campo ya fueron detalladas en la sección 2.1. Para el caso particular de esta temporada, y en orden creciente de proporción de flora silvestre, el primer apiario contaba con 25 colmenas, localizadas en un parche de monte ubicado en el que denominamos lote A, sembrado con soja (Figura 4.4). El porcentaje de flora silvestre calculada para este lote, dentro del área de navegación del correspondiente apiario, fue del 10%. Para mayor detalle de la delimitación de estas circunferencias de navegación y del cálculo de porcentajes de cultivo y flora silvestre, ver sección 2.1. El segundo apiario, por su parte, contaba con 32 colmenas, localizadas en un parche de monte y con presencia de una zona de bañado, en el lote denominado B, el cual estaba sembrado con soja (Figura 4.4). A su vez, contaba con la presencia de maíz en el lote contiguo. En este caso, el porcentaje de flora silvestre fue del 25%. Por último, el tercer apiario presentaba 42 colmenas, situadas en un parche de monte localizado en el denominado lote C, con presencia de soja en el propio lote y en el contiguo, por un lado y flora silvestre por el otro. De esta forma, el lote C contaba con un porcentaje de flora no cultivo del 50%. La vegetación silvestre fue la única fuente de alimento para las abejas durante el primer muestreo, en todos los lotes estudiados.



A



B



Figura 4.4. A) Cultivo de soja en el primer muestreo, previo a la aplicación de herbicidas y sin floración. **B)** Apiario del lote A frente a cultivo de soja, en segundo muestreo, posterior a la aplicación de pesticidas. **C)** Cultivo de soja en diferentes lotes de la estancia, en el segundo muestreo, posterior a la aplicación de pesticidas. Crédito fotográfico: INSSOC.

4.2.2 Variables analizadas

En esta temporada, se estudiaron cuatro enfoques diferentes. En primer lugar, dentro del abordaje comportamental, se estudió la actividad recolectora de las colonias, de la misma manera que en la temporada anterior. Se registró la actividad en piquera a través de los ingresos de abejas recolectoras totales y de abejas con polen en sus corbículas por unidad de tiempo, así como también, analizando la relación entre los ingresos de polen y los ingresos totales, tal como se detalló en la sección 2.2.1.1.

En segundo lugar, dentro del abordaje molecular, se evaluó el mismo set de biomarcadores moleculares de detoxificación y respuesta inmune que en la primera temporada, pero haciendo foco en las larvas. Teniendo en cuenta que en este verano las prácticas agronómicas fueron más intensivas que en el año precedente, con aplicaciones aéreas de insecticidas y fungicidas en simultáneo. En este caso, nos centramos en los citocromos *P450 CYP6AS2*, *CYP6AS3*, *CYP6AS4*, *CYP6BD1* y *CYP9Q3*, involucrados en la Fase I de la detoxificación de xenobióticos en *A. mellifera*. Como se mencionó anteriormente, todos estos genes han registrado cambios de expresión ante la exposición a diferentes agroquímicos en trabajos previos (Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2020).

Adicionalmente, en esta temporada se sumó el análisis de pesticidas en matrices apícolas como parte de un abordaje ecotoxicológico. Particularmente, en muestras de cera y miel colectadas en las mismas colonias estudiadas para el caso de expresión génica relativa de biomarcadores de respuesta a la exposición, pre y post aplicación de la mezcla de agroquímicos.

Por último, se estudió un abordaje multivariado, con el objetivo de entender las relaciones subyacentes dadas por los perfiles de expresión génica y de actividad recolectora, así como también, por la presencia de trazas de pesticidas en matrices apícolas, luego de la aplicación de pesticidas. Para ello, se realizó un análisis de correlación entre variables y un Análisis de Componentes Principales (ACP).

4.2.3 Colecta de muestras

Las muestras de larvas fueron colectadas en cuatro de las ocho colmenas seleccionadas al azar para las mediciones de actividad recolectora, en cada uno de los colmenares. En cada una de estas cuatro colmenas, se tomaron muestras de cinco larvas en el quinto estadio larval. Cada pool de cinco larvas por colmena, se guardó en un único criovial que fue colocado inmediatamente en un termo de nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN a realizarse en laboratorio. A su vez, en esas mismas colmenas, se colectaron muestras de cera nueva y miel operculada (Figura 4.5). Éstas fueron refrigeradas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis posterior. Esta metodología de muestreo se desarrolló en un muestreo previo a la aplicación de agroquímicos y luego se repitió en las mismas colmenas, en un muestreo posterior a dicha administración. De esta forma, al igual que en la temporada anterior, al finalizar los muestreos contamos con cuatro réplicas biológicas para cada apiario, y en cada momento, pre y post aplicación de agroquímicos.



Figura 4.5. Cuadro de colmena donde puede observarse cera nueva y miel operculada como la colectada para los análisis de pesticidas. Crédito: grupo INSSOC.

4.2.4 Análisis de expresión génica

En el caso de esta temporada, la extracción de ARN y los análisis de expresión génica por qPCR se realizaron en el Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-UBA-CONICET). El ARN total fue extraído de cada pool de larvas en el quinto estadio siguiendo el protocolo de extracción con TRIzol® (Invitrogen) del proveedor. El ARN obtenido fue tratado con DNase (Promega), previo a la reacción de la transcriptasa reversa (RT). La síntesis de ADNc se realizó a partir de 2 µg de ARN tratado por muestra (cuantificación realizada mediante Thermo Scientific™ NanoDrop 2000) utilizando la RT M-MLV (Promega).

Para obtener los niveles de expresión relativa de los citocromos *CYP6AS2*, *CYP6AS3*, *CYP6AS4*, *CYP6BD1*, cada reacción de qPCR se realizó en triplicado para cada réplica biológica, utilizando los mismos primers que en la sección anterior (Tabla 3.1). El análisis comparativo de qPCR, se basó en el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y se realizó utilizando el software del equipo ABI StepOne Plus, siguiendo el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, 2014). Se calculó la eficiencia de los primers, tanto para los genes de interés como para los genes de referencia (Tabla 3.2). Además, se analizó la curva de melting de cada par de primers para corroborar la especificidad de la amplificación. En esta oportunidad se utilizaron dos genes de referencia, *Rp49s* y *Rpl8*. Ambos fueron previamente descritos como genes de referencia estables en *A. mellifera* (Collins et al., 2004; Lourenço et al. 2008; Scharlaken et al. 2008; Grosso et al., 2018). Las muestras obtenidas en la primera campaña fueron tomadas como control, para comparar cuan diferente fue la expresión relativa de los genes de interés, luego de la aplicación de agroquímicos. En todas las corridas de qPCR se incluyeron controles negativos para cada primer por duplicado.

4.2.5 Análisis de pesticidas en cera y miel

El análisis de pesticidas se realizó en el Instituto de Tecnología en Alimentos (ITA) del Centro de Investigaciones de Agroindustria (CIA) del Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria (INTA). Hasta el momento del análisis, las muestras de cera y miel fueron almacenadas en freezer, a -20 °C.

Por un lado, se determinaron los residuos de GLI y AMPA en 1g de muestra previamente homogeneizada y centrifugada, con la adición de 4,3 mL de solvente, el cual estaba compuesto por 50mM de ácido acético y 10 Mm de EDTA. Por otro lado, se determinaron los residuos de los insecticidas y fungicidas utilizando el método de extracción de QuEChERS (sus siglas en inglés para: rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro), (Anastassiades et al., 2007), también en un 1g de muestra. La cual fue agitada, homogeneizada y centrifugada, con el agregado de 5mL de acetonitrilo y 3g de sulfato de magnesio (MgSO₄) y 0,75g de Acetato de Sodio (NaOAc), (Phenomenex). En el siguiente paso de limpieza, 1mL de alícuota de la muestra fue transferida a un tubo de centrifuga conteniendo 150 mg de MgSO₄ y 50 mg del sorbente amina primaria y secundaria (PSA). Este fue

agitado y centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante fue colectado y transferido a viales de cromatografía.

Los extractos obtenidos se analizaron mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas y cromatografía de líquidos/espectrometría de masas tal como se describe a continuación:

- Para la determinación de GLI y su principal metabolito, el Ácido aminometilfosfónico (AMPA), se utilizó un método sin derivatización, el QuPPE-Method 1,3 "Glyphosate & Co. Hypercarb" de la UE. Los análisis de cromatografía líquida se realizaron utilizando un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UHPLC) Waters Acquity equipado con un detector de masas de cuadrupolo único (waters SQD) utilizando una columna HiperCarb Thermo 3um 100x2.1mm con una fase móvil de 0,1% ácido acético en agua: 0,1% ácido acético en acetonitrilo con el siguiente gradiente (95:5)-(95:5) 0-2 min, (95:5)-(0:100) 2-15 min, (95:5)-(95:5) 15-20 min. La lectura en el espectrómetro de masas se realizó con los criterios de identificación mediante tiempo de retención y la abundancia del ion de confirmación (ion C) en relación con la del ion de cuantificación (ion Q). la fuente de ionización utilizada fue ESI en modo positivo. El límite de detección (DL) fue de 20 ng/g y el límite de cuantificación (QL) fue de 40 ng/g.
- Los análisis de cromatografía líquida para el fungicida DIFENO se realizaron utilizando el mismo equipamiento mencionado para el caso de los herbicidas, utilizando una columna XBridge BEH C18 2,5 um 2,1x150 mm con una fase móvil de 0,1% de ácido acético en agua: metanol con el siguiente gradiente: (95:5)-(95:5) 0-2 min, (95:5)-(80:20) 2-5 min, (80:20)-(20:80) 5-10 min, (20:80)-(0:100) 10-11 min, (0:100)-(0:100) 11-13 min, (0:100)-(95:5) 13-14 min, (95:5) 14-20 min. En el análisis de cuantificación se utilizó el modo de monitorización de iones seleccionados. Los ajustes de adquisición del espectrómetro de masas fueron: ESI positivo y se utilizaron como criterios de identificación el tiempo de retención y la abundancia del ion de confirmación (ion C) en relación con la del ion de cuantificación (ion Q). El límite de detección (DL) fue de 2 ng/g y el límite de cuantificación (QL) fue de 5 ng/g.
- Los análisis por cromatografía de gases para la determinación de los insecticidas CLOR y LC y el resto de los pesticidas se realizaron con un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 600 equipado con un detector de masas cuadrupolar simple. Se inyectaron volúmenes de muestra de 2,0 ul en el inyector programable split/splitless, en modo splitless con la salida split abierta después de 1,5 min y con la temperatura del puerto del inyector a 250°C. La columna capilar utilizada fue DB-5MS (30 m 0,25 um I.D.; 0,25 mm de espesor de película), (Agilent Technologies). El gas portador helio se programó con un flujo constante de 1 ml/min. El programa de temperatura del horno se fijó inicialmente a 80 °C con 5 minutos de mantenimiento y se incrementó (80-178) °C a 25 °C/min, (178-205) °C a 2 °C/min, (205-300) °C a 30 °C/min con un mantenimiento de 5 minutos. Para el análisis de cuantificación se utilizó el modo de monitorización de iones seleccionados. Los ajustes

de adquisición del espectrómetro de masas fueron: ionización por impacto de electrones 70 eV, el tiempo de retención y la abundancia del ion de confirmación en relación con la del ion de cuantificación se utilizaron como criterios de identificación. El límite de detección (DL) fue de 2 ng/g y el límite de cuantificación (QL) fue de 5 ng/g.

Las curvas de calibración para determinar la concentración de los residuos de los diferentes agroquímicos en las distintas matrices fueron procesadas junto con las muestras, para asegurar un correcto desempeño del análisis y los cromatógrafos. Las concentraciones fueron calculadas por interpolación.

4.2.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con el programa R v3.5.1. (R Score Team, 2018), utilizando la función `glmer` para los modelos mixtos (GLMM), del paquete `lme4` (Bates et al., 2009). Además, se utilizó el paquete `glmmTMB` (Brooks et al., 2017) para los errores con distribución Binomial.

Para la actividad recolectora, se planteó un GLMM con distribución Poisson en el caso de las variables recolectoras totales y recolectoras con polen. Por otro lado, se planteó un GLMM con distribución Binomial para la relación entre la recolección de polen y la recolección total. Finalmente, los datos de expresión génica se analizaron con modelo GLMM con distribución gamma del error. En aquellos genes donde los datos de expresión relativa no cumplieron los supuestos para plantear una distribución gamma del error, se utilizaron métodos no paramétricos como en el caso de la temporada anterior. La prueba de rangos de Wilcoxon se utilizó para las comparaciones entre muestreos, mientras que, para las comparaciones entre los apiarios de los distintos lotes, se utilizó la prueba de rangos de Friedman, con un alfa de 0,05. A su vez, para las comparaciones *post hoc* se empleó la prueba de Conover, con corrección de Bonferroni. Las pruebas de Wilcoxon y Friedman son las recomendadas para datos pareados cuyos errores no siguen una distribución normal (Dalgaard, 2008). Estos mismos métodos fueron utilizados en el caso de las concentraciones de pesticidas encontrados en matrices apícolas. Todos estos métodos no paramétricos se llevaron a cabo usando el paquete “PMCMRplus” (Pohlert, 2020).

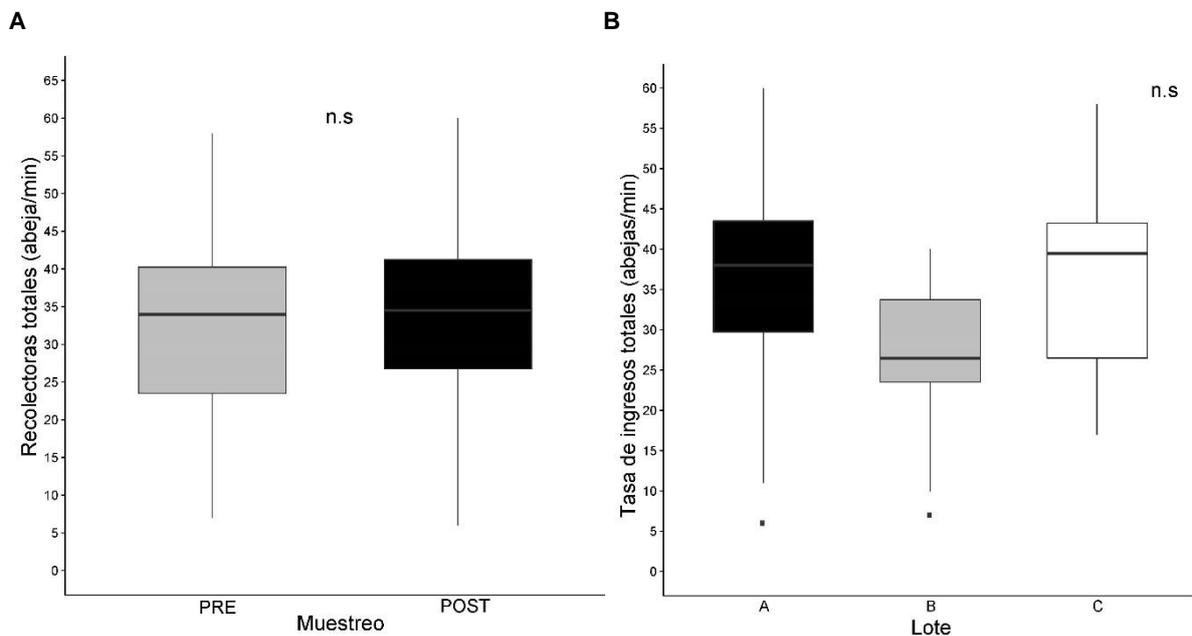
En todos los modelos generalizados se evaluó la sub/sobre dispersión y el ajuste del modelo utilizando el paquete DHARMA (Hartig, 2020). A su vez, todos los modelos generalizados incluyeron a la colmena como variable aleatoria. La significancia de las variables explicativas incluidas en los modelos fue puesta a prueba con la función `anova` para comparar modelos anidados (Chambers y Hastie, 1992). Aquellas variables no significativas ($p > 0,05$) fueron removidas del modelo. Además, todas las comparaciones a posteriori fueron realizadas con el paquete `emmeans` (Lenth, 2020). En todos los casos, se evaluaron los supuestos de homocedasticidad y normalidad con la prueba de Levene y Shapiro–Wilk, respectivamente.

Para el análisis de componentes principales (PCA) y la prueba de correlación de Spearman se utilizaron las librerías “ade4” (Thioulouse et al., 2018) y “psych” (Clark, 2020), respectivamente. A su vez, se utilizó el paquete “FactoMineR” (Le et al., 2008) para los gráficos del PCA.

4.3 Resultados

4.3.1 Abordaje comportamental: actividad recolectora

Al igual que en la primera temporada analizada, y con el objetivo de estimar la actividad recolectora antes y después de la aplicación de pesticidas, se evaluó tanto la tasa de ingreso de abejas recolectoras totales como de abejas con polen en sus corbículas (abejas/minuto), en los tres apiarios estudiados. Además, se calculó una tercera variable, calculada como la proporción de abejas con polen en sus corbículas, sobre el total de abejas ingresantes por minuto (Figura 4.6).



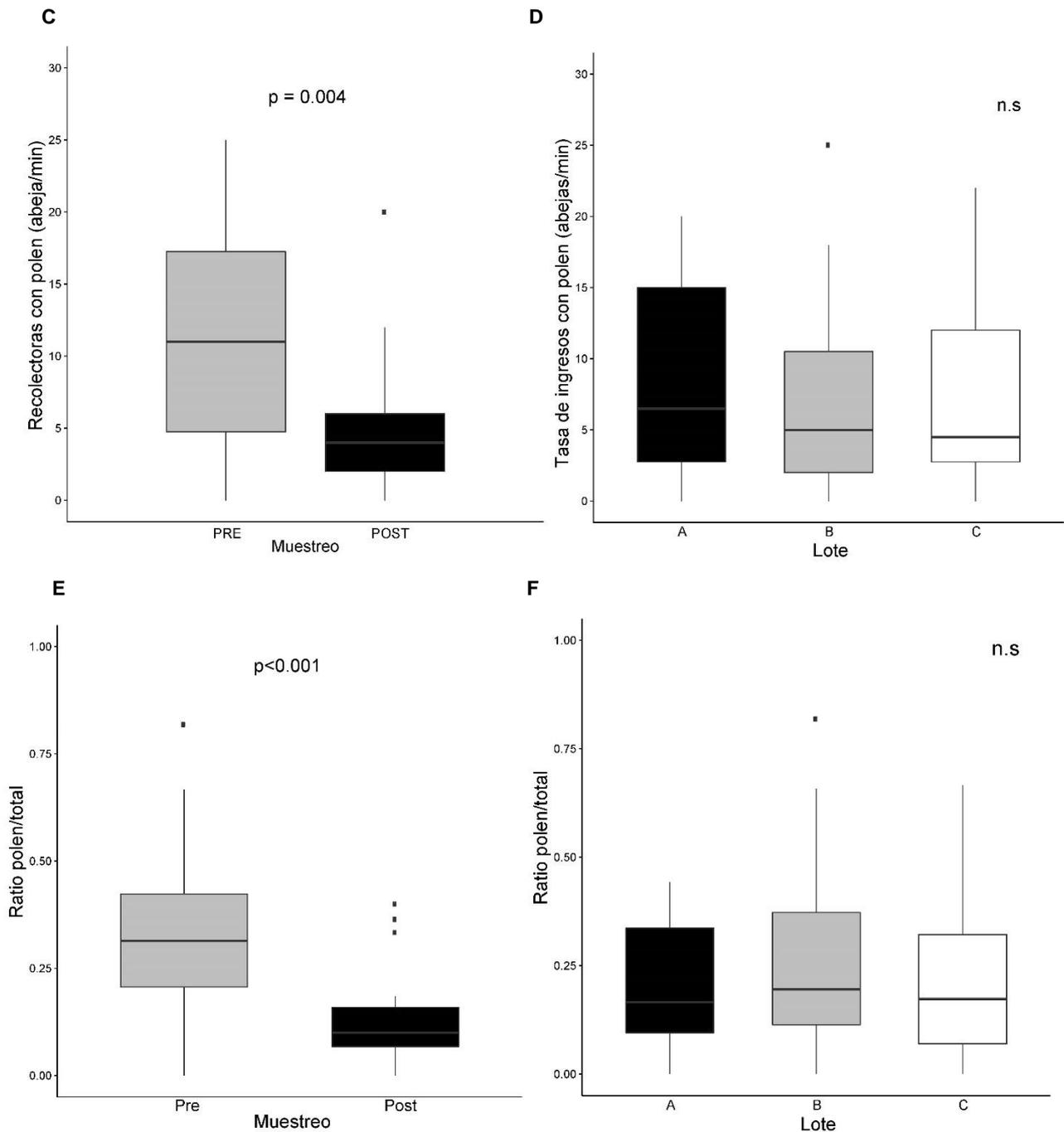


Figura 4.6. Actividad recolectora. A-C-E) Antes y después de la administración de pesticidas (N=24). **B-D-F)** Para cada apiario (N=16). **A-B)** Número total de abejas que ingresan a la colmena por minuto, **C-D)** número de abejas que ingresan a la colmena con polen en sus corbículas por minuto (Modelo Poisson: tasa de ingresos con polen ~ Muestreo + (1|Colmena)) y **E-F)** ratio recolección polen/total (Modelo Poisson: Ratio polen/total ~ Muestreo + (1|Colmena)). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. El p valor corresponde a diferencias entre muestreos (n.s: $p > 0,05$).

El análisis estadístico reveló que, la recolección de polen (Modelo Poisson: tasa de ingresos con polen ~ Muestreo + (1|Colmena); LRT = 63,929; $p < 0,001$; Tabla A4.1) y el ratio polen/total (Modelo

Poisson: Ratio polen/total ~ Muestreo + (1|Colmena); LRT = 105,535; $p < 0,001$; Tabla A4.1) fueron significativamente menor en el muestro posterior a la aplicación de la mezcla de pesticidas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre muestreos en el caso de las recolectoras totales (Tabla A4.1). Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre los apiarios de los diferentes lotes para ninguna de las variables de actividad recolectora (Tabla A4.1).

4.3.2 Abordaje molecular: Análisis de expresión de genes asociados a detoxificación de xenobióticos

Al igual que en la temporada anterior, se midieron los niveles de expresión relativa de los citocromos *P450 CYP6AS2*, *CYP6AS3*, *CYP6AS4*, *CYP6BD1* y *CYP9Q3* para evaluar el estado fisiológico de las colonias de cada apiario y para cada muestreo, pre y post aplicación de pesticidas. En el caso de esta temporada, ya contando con los resultados de la temporada anterior, donde las larvas se vieron más vulnerables que las abejas jóvenes de interior de colmena ante la presencia de herbicidas y los cambios en la disponibilidad de recursos florales entre muestreos, se estudiaron los niveles de expresión de estos citocromos en larvas en el quinto estadio.

El análisis estadístico reveló un aumento significativo en los niveles de expresión de *CYP6AS2* (Modelo Gamma: *CYP6AS2* ~ Muestreo + (1|Colmena); LRT = 31,192; $p < 0,001$; Tabla A4.2; Figura 4.7) y *CYP6AS4* (Modelo Gamma: *CYP6AS4* ~ Muestreo + (1|Colmena); LRT = 6,491; $p = 0,011$; Tabla A4.2; Figura 4.7) en larvas, en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas. Sin embargo, no se registraron diferencias significativas entre los apiarios de los distintos lotes para la expresión relativa de estos genes biomarcadores (Tabla A4.2). Por otro lado, el resto de los citocromos estudiados no mostraron diferencias significativas en su expresión relativa, ni entre muestreos ni entre los apiarios ubicados en los distintos lotes (Tabla A4.2; Figura 4.7).

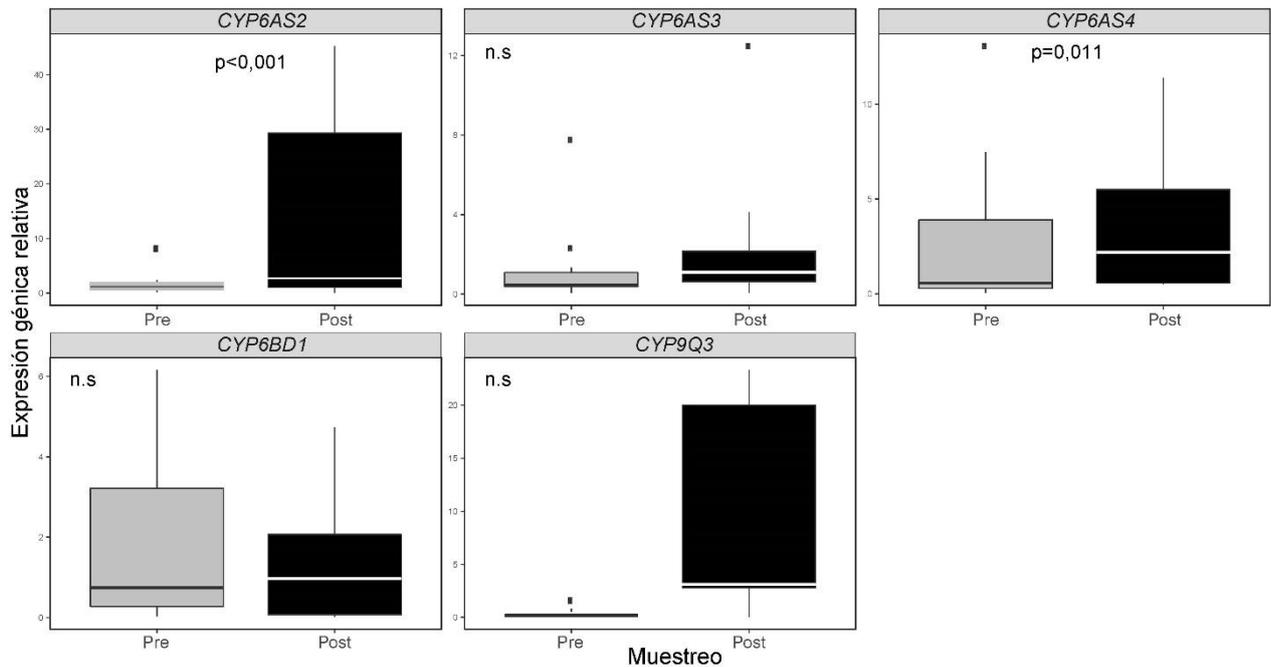
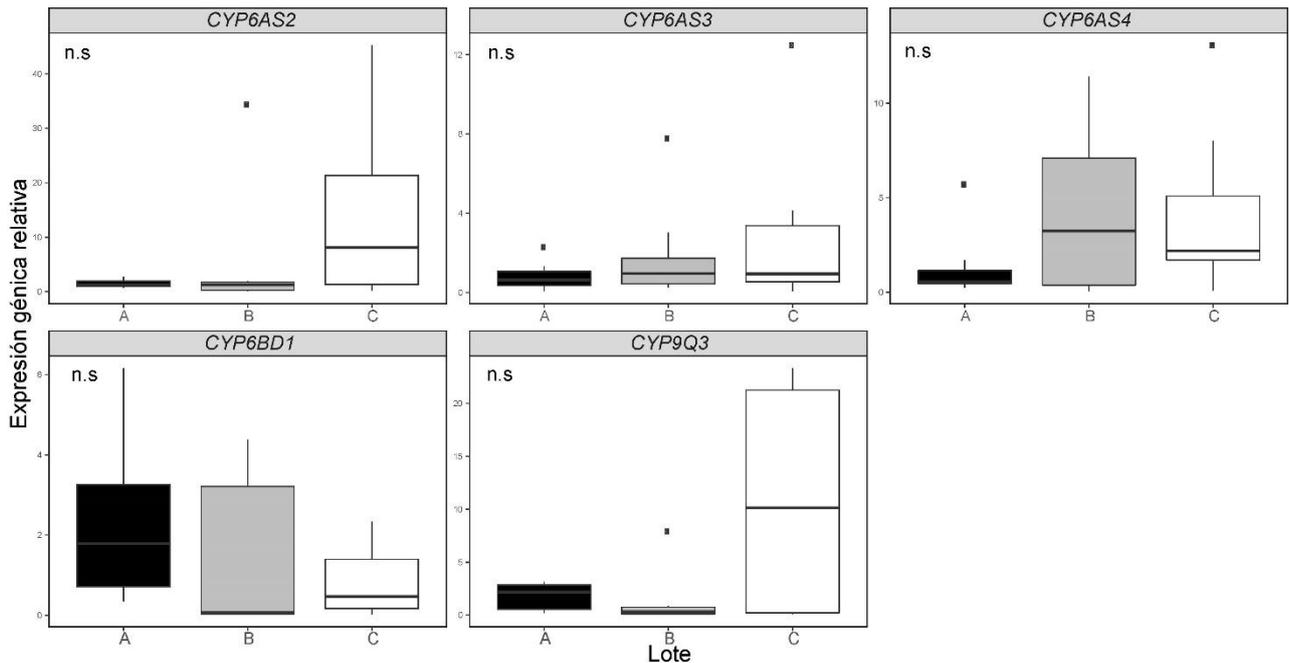
A**B**

Figura 4.7. Expresión génica en larvas, A) pre y post aplicación de herbicidas de post emergencia y B) en los apiarios de los diferentes lotes. Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los genes constitutivos *Rpl8* y *Rp49s* fueron utilizados como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de pesticidas, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha administración. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. El p valor corresponde a diferencias entre muestreos ($N = 12$; Modelo Gamma: Expresión relativa \sim Muestreo + (1|Colmena)). No se encontraron diferencias

significativas (n.s: $p > 0,05$) entre los apiarios ubicados en los distintos lotes para ninguno de los genes de interés ($N = 8$).

4.3.3 Abordaje ecotoxicológico: Análisis de pesticidas en muestras de miel y cera

En cuanto al análisis de pesticidas, se evaluó la presencia de trazas en muestras de miel y cera colectadas en las colmenas estudiadas, pre y post aplicación de agroquímicos y en los tres apiarios ubicados en los diferentes lotes. Tal como se mencionó previamente, en esta temporada los agroquímicos de post-emergencia se administraron de manera sucesiva. En primera instancia, un herbicida con GLI como principio activo -a través de pulverizadora terrestre- y luego, una mezcla de fungicida e insecticidas mediante pulverización aérea. Los principios activos de esta mezcla fueron DIFENO y CLOR y LC, respectivamente.

Se registró la presencia de GLI tanto en muestras de miel del muestreo pre-aplicación de pesticidas, como las del muestreo post (Figura 4.8, Tabla 4.1). La concentración de este compuesto fue mayor en las muestras de miel del muestreo posterior a la aplicación del herbicida, pero esta diferencia no fue significativa (Prueba de Wilcoxon; $V = 26$; $p = 0,308$; Tabla A4.3). Por otro lado, se registró una concentración mayor a la máxima permitida por la Unión Europea (50 ng/g), en dos de las muestras colectadas en el apiario del lote B (Tabla 4.1). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre apiarios (Test de Friedman, $\chi^2 = 1,333$, $p = 0,513$, Tabla A4.3). Adicionalmente, se midió la presencia de AMPA, principal metabolito de la degradación del GLI. Sin embargo, no fue detectable su presencia en ninguna de las muestras de miel analizadas.

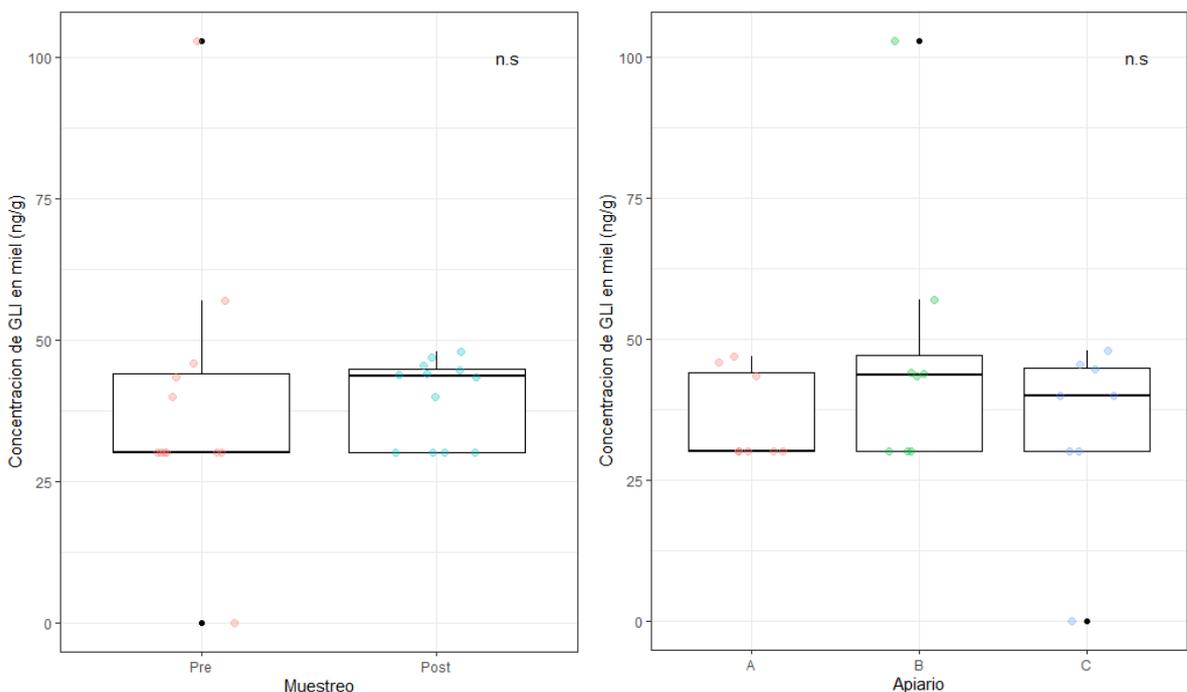


Figura 4.8. Concentración de GLI en miel. A) Pre y post aplicación de pesticidas (Prueba de Wilcoxon; n.s: $p > 0,05$; $N = 12$). **B)** En los apiarios de los diferentes lotes (Prueba de Friedman; n.s: $p > 0,05$; $N = 8$). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango.

Tabla 4.1. Concentración de GLI encontrada en las muestras de miel analizadas. En negrita se indica las concentraciones mayores a los máximos permitidos por la Unión Europea (50ng/g). ND corresponde a valores por debajo del LD = 20 ng/g y MLC corresponde a valores por debajo del LC = 40 ng/g.

GLI MIEL			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
1	Lote A	Pre	45,918
2	Lote A	Pre	43,474
3	Lote A	Pre	MLC
4	Lote A	Pre	MLC
1	Lote A	Post	MLC
2	Lote A	Post	46,905
3	Lote A	Post	MLC
4	Lote A	Post	MLC
5	Lote B	Pre	102,836
6	Lote B	Pre	MLC
7	Lote B	Pre	MLC
8	Lote B	Pre	56,983
5	Lote B	Post	43,892
6	Lote B	Post	43,331
7	Lote B	Post	MLC
8	Lote B	Post	43,927
9	Lote C	Pre	MLC
10	Lote C	Pre	MLC
11	Lote C	Pre	ND
12	Lote C	Pre	40
9	Lote C	Post	44,654
10	Lote C	Post	47,972
11	Lote C	Post	45,373
12	Lote C	Post	40

En el caso de las muestras de cera, no se registraron valores mayores al límite de cuantificación (LC) ni para GLI ni para AMPA. Por otro lado, se encontraron residuos de ATZ, tanto en mieles como en cera. Este herbicida no estaba notificado como aplicado en las administraciones de post-emergencia. Es posible que se haya aplicado de manera pre-emergente, cuando el cultivo todavía no había germinado, y que haya llegado a las matrices por deriva, a través de la recolección de

recursos en flores de plantas no cultivo, ya que aparece en todas las muestras, incluso en las del muestreo pre-aplicación de pesticidas de post-emergencia. En el caso de las muestras de miel, las concentraciones registradas son altas, casi todas mayores a los niveles permitidos por la Unión Europea (50 ng/g), (Tabla 4.2, Figura 4.9). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la concentración de ATZ en miel, ni entre muestreos (Prueba de Wilcoxon; $V = 15$; $p = 0,374$; Tabla A4.3) ni entre los apiarios de los distintos lotes (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 0,963$; $p = 0,618$; Tabla A4.3).

Tabla 4.2. Concentración de ATZ encontrada en muestras de miel. En negrita se indican las concentraciones mayores a las máximas permitidas por la Unión Europea (50ng/g). ND corresponde a valores por debajo del LD = 2 ng/g.

ATZ MIEL			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
1	Lote A	Pre	187,3
2	Lote A	Pre	ND
3	Lote A	Pre	47,3
4	Lote A	Pre	ND
1	Lote A	Post	242,1
2	Lote A	Post	274,2
3	Lote A	Post	ND
4	Lote A	Post	ND
5	Lote B	Pre	ND
6	Lote B	Pre	279,9
7	Lote B	Pre	ND
8	Lote B	Pre	ND
5	Lote B	Post	ND
6	Lote B	Post	292,8
7	Lote B	Post	ND
8	Lote B	Post	511,8
9	Lote C	Pre	221,7
10	Lote C	Pre	214,3
11	Lote C	Pre	246,6
12	Lote C	Pre	250,4
9	Lote C	Post	189,6
10	Lote C	Post	252,9
11	Lote C	Post	ND
12	Lote C	Post	253,2

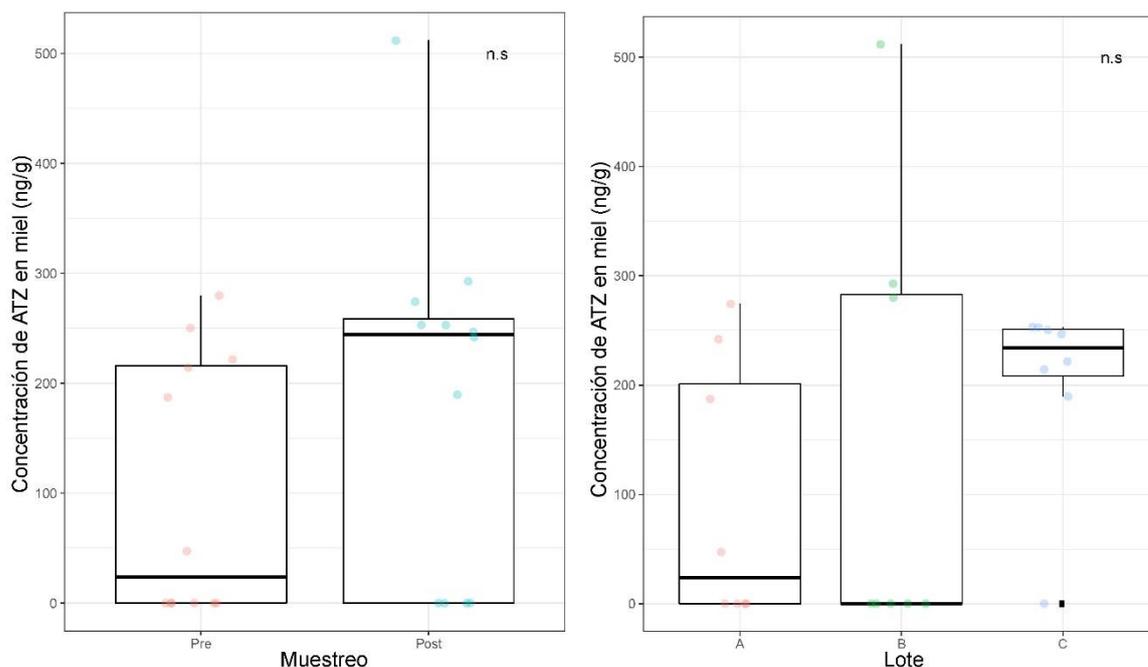


Figura 4.9. Concentración de ATZ en miel. A) Pre y post aplicación de pesticidas (Prueba de Wilcoxon; n.s: $p > 0,05$; $N = 12$). **B)** En los apiarios de los diferentes lotes (Prueba de Friedman; n.s: $p > 0,05$; $N = 8$). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango.

En el caso de la cera, dado que con las muestras del momento pre-aplicación no se alcanzó el peso mínimo de muestra necesaria para llevar a cabo el protocolo de procesamiento de las mismas, se analizó un pool de muestras por apiario, compuesto por la suma de las muestras de cera de todas las colmenas estudiadas por colmenar, en ese muestreo. De esta forma, podemos registrar de manera descriptiva si los pesticidas estaban presentes en la cera antes de la aplicación de pesticidas. En relación a las muestras del momento post-aplicación de pesticidas, estas se analizaron de manera individual por colmena y se pudieron comparar entre los apiarios de los diferentes lotes a través de un método no paramétrico, así como también, realizar las subsiguientes correlaciones con las otras variables analizadas en dicho muestreo. Se registraron residuos de ATZ en todas las muestras de cera y, en todos los casos, se encontraron concentraciones mayores a las permitidas por la Unión Europea (50 ng/g), (Tabla 4.3). La concentración de ATZ en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas fue significativamente diferente en los tres apiarios (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 8$; $p = 0,018$; Tabla A4.4), presentando una concentración creciente desde el lote A hasta el C (Figura 4.10).

Tabla 4.3. Concentración de ATZ encontrada en muestras de cera. En negrita concentraciones mayores a los máximos permitidos por la Unión Europea (50ng/g).

ATZ en cera			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
Pool	Lote A	Pre	147,7
1	Lote A	Post	52,9
2	Lote A	Post	75,3
3	Lote A	Post	85,4
4	Lote A	Post	110,1
Pool	Lote B	Pre	89,4
5	Lote B	Post	65,1
6	Lote B	Post	92,7
7	Lote B	Post	110,1
8	Lote B	Post	114,0
Pool	Lote C	Pre	343,6
9	Lote C	Post	171,0
10	Lote C	Post	129,5
11	Lote C	Post	138,2
12	Lote C	Post	142,3

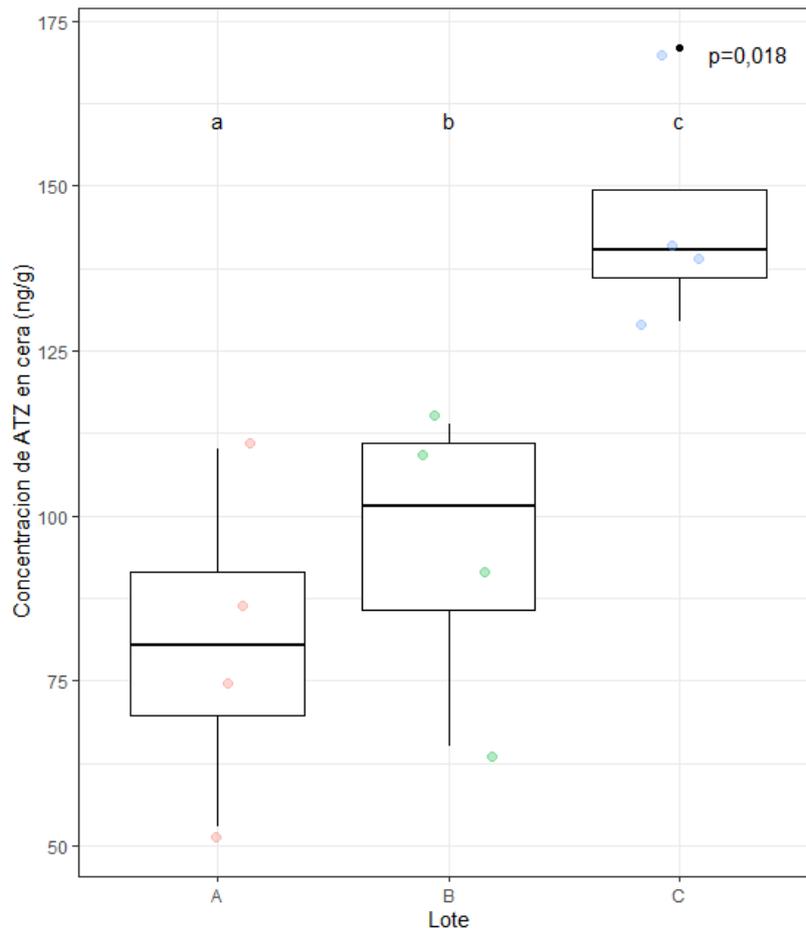


Figura 4.10. Concentración de ATZ en cera en los apiarios de los diferentes lotes, en el momento posterior a la aplicación de pesticidas (Prueba de Friedman; $p = 0,018$; $N = 4$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los apiarios de los distintos lotes ($p < 0,05$). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango.

Con respecto al fungicida DIFENO, este compuesto no fue detectable en ninguna de las muestras de miel y cera. Para finalizar, se analizó la presencia de los principios activos de los insecticidas aplicados. No se detectaron residuos de LC en ninguna de las muestras de cera y miel analizadas. En el caso de CLOR, se registró su presencia tanto en miel (Tabla 4.4) como en cera (Tabla 4.5). El análisis estadístico reveló una concentración de CLOR en muestras de miel significativamente mayor en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas (Prueba de Wilcoxon; $V = 1$; $p = 0,028$; Tabla A4.3; Figura 4.11). Sin embargo, esta concentración no difirió significativamente entre los apiarios de los distintos lotes (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 3$; $p = 0,223$; Tabla A4.3; Figura 4.11). Las muestras de cera se analizaron de la misma forma que los demás pesticidas, con un pool de muestras por apiario en el momento pre y con muestras individuales por colmena en el momento post aplicación de agroquímicos. No se observaron diferencias significativas entre los apiarios de los diferentes lotes

en el momento posterior a la administración (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 5,733$; $p = 0,057$; Tabla A4.4, Figura 4.12).

Tabla 4.4. Concentración de CLOR encontrada en muestras de miel. En negrita concentraciones mayores a los máximos permitidos por la Unión Europea (50ng/g). ND corresponde a valores por debajo del LD = 2 ng/g.

CLOR EN MIEL			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
1	Lote A	Pre	ND
2	Lote A	Pre	ND
3	Lote A	Pre	ND
4	Lote A	Pre	ND
1	Lote A	Post	28,2
2	Lote A	Post	ND
3	Lote A	Post	19,1
4	Lote A	Post	ND
5	Lote B	Pre	ND
6	Lote B	Pre	ND
7	Lote B	Pre	ND
8	Lote B	Pre	ND
5	Lote B	Post	ND
6	Lote B	Post	52,6
7	Lote B	Post	60,6
8	Lote B	Post	74,7
9	Lote C	Pre	ND
10	Lote C	Pre	19,2
11	Lote C	Pre	ND
12	Lote C	Pre	ND
9	Lote C	Post	ND
10	Lote C	Post	ND
11	Lote C	Post	ND
12	Lote C	Post	ND

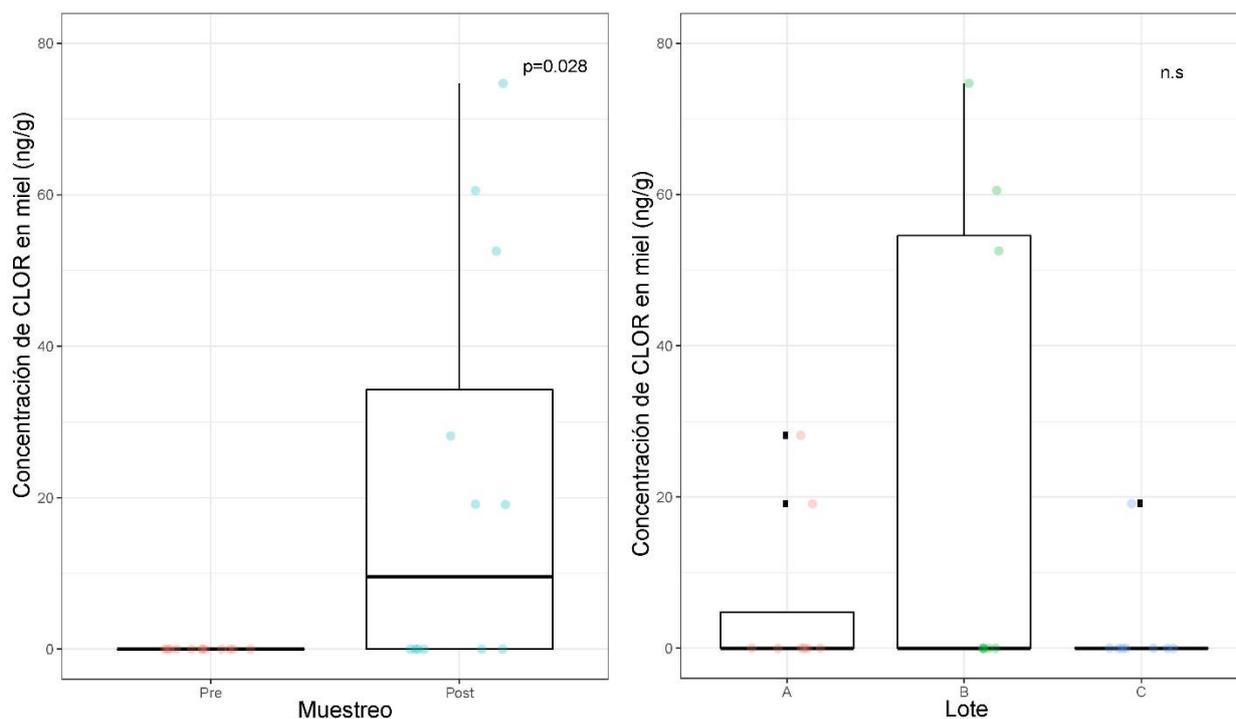


Figura 4.11. Concentración de CLOR en miel. A) Pre y post aplicación de pesticidas (Prueba de Wilcoxon; $p = 0,028$; $N = 12$). **B)** En los apiarios de los diferentes lotes (Prueba de Friedman; $n.s. : p > 0,05$; $N = 8$). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango.

Tabla 4.5. Concentración de CLOR encontrada en muestras de cera. En negrita se indican las concentraciones mayores a los máximos permitidos por la Unión Europea (50ng/g). ND corresponde a valores por debajo del LD = 2 ng/g.

CLOR EN CERA			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
Pool	Lote A	Pre	ND
1	Lote A	Post	ND
2	Lote A	Post	132
3	Lote A	Post	6,6
4	Lote A	Post	44,1
Pool	Lote B	Pre	77,1
5	Lote B	Post	16,7
6	Lote B	Post	41,4
7	Lote B	Post	29,4
8	Lote B	Post	44,8
Pool	Lote C	Pre	ND
9	Lote C	Post	ND
10	Lote C	Post	ND
11	Lote C	Post	ND
12	Lote C	Post	ND

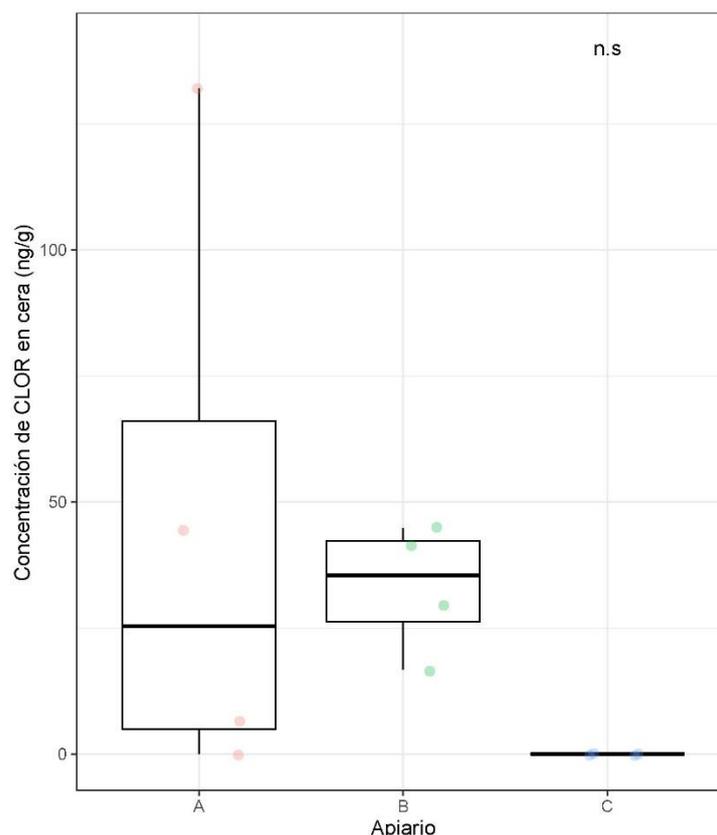


Figura 4.12. Concentración de CLOR en cera en los apiarios de los diferentes lotes, en el momento posterior a la aplicación de pesticidas (Prueba de Friedman; n.s: $p > 0,05$; $N=4$). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango.

4.3.4 Abordaje multivariado: Análisis de correlaciones y de componentes principales

Con la finalidad de entender las relaciones subyacentes entre los perfiles de expresión relativa teniendo en cuenta la totalidad de los genes, la presencia de pesticidas en mieles y ceras y la actividad en la entrada de las colmenas en el momento posterior a la administración de agroquímicos, se realizó un análisis multivariado. Por un lado, se evaluó la correlación entre variables de actividad en piquera con respecto a las variables de expresión génica en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas. A su vez, en ese momento post, también se estudió la correlación entre los residuos de pesticidas en matrices apícolas y los perfiles de expresión génica.

El análisis de correlación entre variables, utilizando el coeficiente de Spearman para datos cuyos residuos no siguen una distribución normal, reveló una correlación negativa y significativa entre la concentración de CLOR en miel y la expresión relativa del citocromo *CYP6BD1* ($Rho = -0,593$; $p = 0,042$; Tabla 4.6). A su vez, la expresión relativa de *CYP6AS3* correlacionó positiva y

significativamente con las concentraciones de ATZ en muestras de cera (Rho = 0,697; p = 0,012; Tabla 4.6), mientras que la expresión relativa de *CYP6AS2* correlacionó negativa y significativamente con las concentraciones de CLOR en cera (Rho = -0,584; p = 0,048; Tabla 4.6). Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre las variables de actividad en piquera y la expresión relativa de estos genes en larvas (Tabla A4.5).

Tabla 4.6. Correlación entre la concentración de los diferentes pesticidas en matrices apícolas y la expresión relativa de los genes biomarcadores de exposición en larvas, en el muestreo posterior a la administración de los mismos. Valores de Rho, S y p obtenidos a través de la prueba de correlación de Spearman (en negrita p < 0,05).

Prueba de correlación de Spearman			
Variables correlacionadas	Rho	S	p valor
ATZ en miel – <i>CYP6AS2</i>	-0,109	317,11	0,736
ATZ en miel – <i>CYP6AS3</i>	0,217	223,79	0,497
ATZ en miel – <i>CYP6AS4</i>	0,094	259,04	0,771
ATZ en miel – <i>CYP6BD1</i>	-0,471	420,8	0,122
ATZ en miel – <i>CYP9Q3</i>	-0,232	352,36	0,468
CLOR en miel – <i>CYP6AS2</i>	-0,460	417,58	0,132
CLOR en miel – <i>CYP6AS3</i>	0,078	263,7	0,810
CLOR en miel – <i>CYP6AS4</i>	0,109	254,78	0,736
CLOR en miel – <i>CYP6BD1</i>	-0,593	455,5	0,042
CLOR en miel – <i>CYP9Q3</i>	-0,569	448,81	0,053
GLI en miel – <i>CYP6AS2</i>	-0,014	290	0,974
GLI en miel – <i>CYP6AS3</i>	0,280	206	0,379
GLI en miel – <i>CYP6AS4</i>	-0,132	324	0,683
GLI en miel – <i>CYP6BD1</i>	-0,259	360	0,417
GLI en miel – <i>CYP9Q3</i>	0,049	272	0,886
ATZ en cera – <i>CYP6AS2</i>	0,088	260,96	0,787
ATZ en cera – <i>CYP6AS3</i>	0,697	86,651	0,012
ATZ en cera – <i>CYP6AS4</i>	0,063	267,97	0,846
ATZ en cera – <i>CYP6BD1</i>	-0,385	396,19	0,216
ATZ en cera – <i>CYP9Q3</i>	0,207	226,9	0,519
CLOR en cera – <i>CYP6AS2</i>	-0,584	451,54	0,048
CLOR en cera – <i>CYP6AS3</i>	-0,457	416,65	0,135
CLOR en cera – <i>CYP6AS4</i>	-0,123	321,26	0,703

CLOR en cera – <i>CYP6BD1</i>	-0,101	315,03	0,754
CLOR en cera – <i>CYP9Q3</i>	-0,486	424,95	0,109

Se realizó un ACP con el objetivo de entender las relaciones subyacentes entre los perfiles de expresión de los genes biomarcadores de exposición en larvas y la presencia de pesticidas en las diferentes matrices apícolas, en el muestreo posterior a la aplicación de los diferentes agroquímicos (Figura 4.13). Los primeros tres componentes principales del análisis explican el 64,94% de la proporción de variabilidad acumulada (Tabla A4.6). La expresión relativa de los citocromos *CYP6AS2* y *CYP6AS3* son las variables que mejor explican el primer componente principal (CP1). Por otro lado, la concentración de ATZ en miel es la variable que mejor explica el segundo componente principal (CP2). Por último, la concentración de GLI y CLOR en miel, son las variables que mejor explican el tercer componente principal (CP3), (Tabla A4.7). La dimensión limitada por los CP1 y CP2 discrimina las observaciones individuales del apiario del lote C (círculos rojos), quedando concentradas en el lado negativo del CP1. Estos dos componentes principales absorben el 27,90% y el 21,50% de la variabilidad, respectivamente (Figura 4.13). De esta manera, la discriminación de las colonias del lote C con respecto a las de los lotes A (círculos naranjas) y B (círculos rosas), queda explicada por una mayor expresión relativa de los citocromos *CYP6AS2* y *CYP6AS3* y una menor concentración de CLOR en cera y miel, luego de la aplicación de pesticidas.

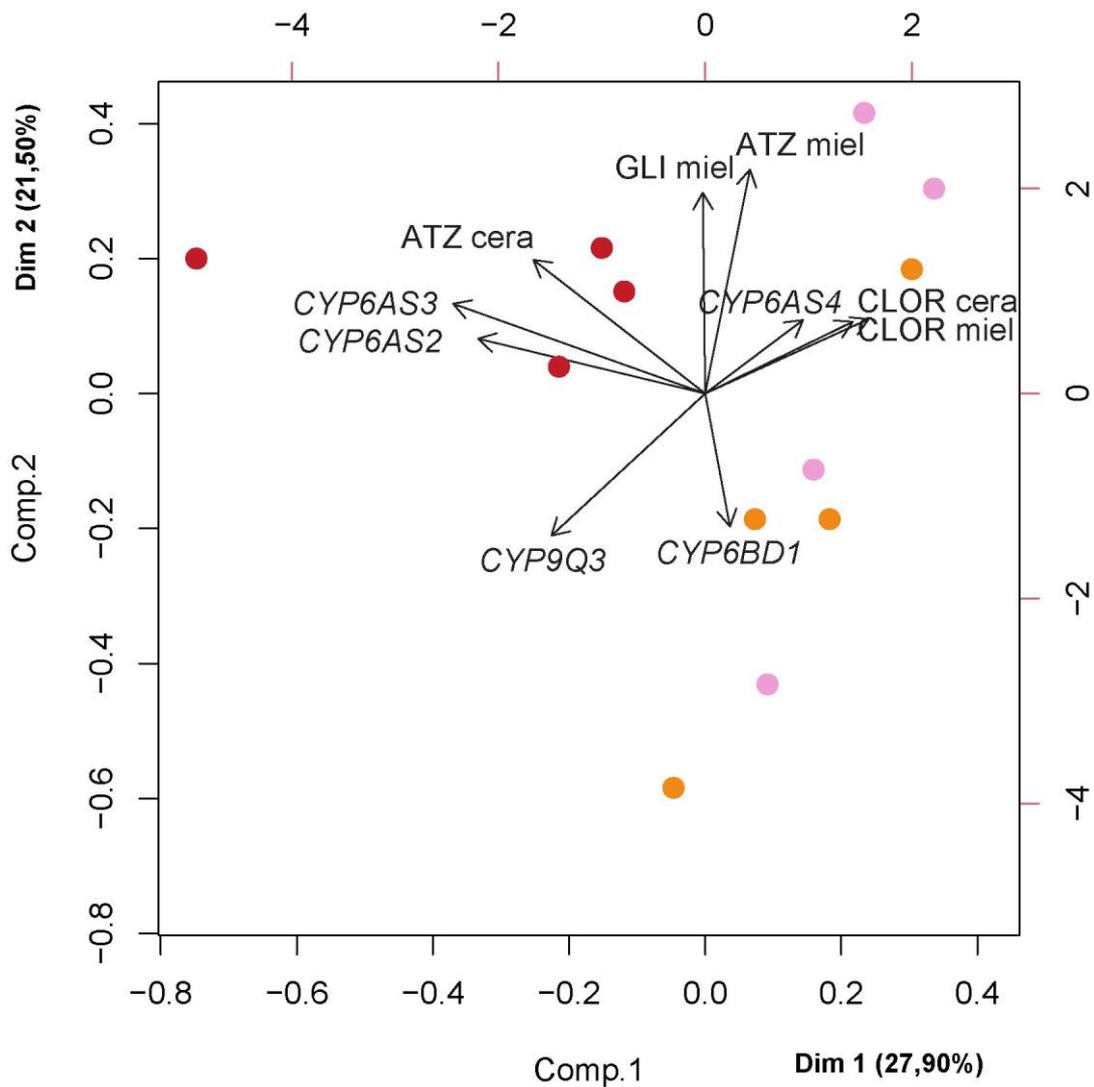


Figura 4.13. Análisis de componentes principales (ACP) del perfil de expresión génica en larvas y la presencia de pesticidas en cera y miel, en el muestreo posterior a la aplicación de agroquímicos. Mapa de observaciones individuales de las colonias estudiadas. Las variables están expresadas en los Comp. 1 y 2 (ver Tabla A4.7). El mapa de observaciones individuales muestra la diferenciación del apiario del lote C (círculos rojos) con respecto a los apiarios de los lotes A (círculos naranjas) y B (círculos rosas). Los CP1 y CP2 explican el 27,90% y el 21,50% de la variabilidad, respectivamente.

4.4 Discusión

Los resultados obtenidos muestran una disminución en la recolección de polen y el ratio polen/total en el muestreo realizado después de la aplicación de la mezcla de herbicidas, insecticidas y fungicidas. A su vez, se observó un aumento en los niveles de expresión relativa de varios de los genes biomarcadores de exposición analizados en larvas, en el muestreo posterior a la

administración de agroquímicos. Sin embargo, no se registraron diferencias significativas en la expresión relativa de estos genes entre los apiarios de los diferentes lotes. En el caso de la presencia de pesticidas en matrices apícolas, se encontraron residuos del herbicida ATZ y del insecticida CLOR, tanto en cera como en miel. A su vez, se detectó la presencia de GLI en altas concentraciones en las muestras de miel. Adicionalmente, se registraron correlaciones significativas entre la concentración de pesticidas en matrices apícolas y la expresión relativa de algunos de los citocromos *P450* estudiados. A su vez, el ACP revela una discriminación entre apiarios para el perfil de expresión génica y concentración de pesticidas en cera y miel, en el muestreo posterior a la aplicación de agroquímicos. En este sentido, parte de los genes biomarcadores de respuesta a la exposición de pesticidas que discriminan a los apiarios de los diferentes lotes en el ACP, son los mismos que correlacionan con la concentración de los pesticidas encontrados en las muestras de cera. Estos resultados confirman la presencia de pesticidas dentro de la colmena y sugieren que la presencia de pesticidas en cera y miel, modifican la respuesta detoxificante de las larvas.

Se encontraron diferencias significativas entre muestreos para la expresión relativa de los citocromos *CYP6AS2* y *CYP6AS4*, exhibiendo ambos un aumento en el nivel de expresión luego de la aplicación de la mezcla de pesticidas. Esta tendencia es opuesta a la encontrada en la temporada anterior para el caso de las larvas, donde solo se aplicaron herbicidas de post emergencia. El CLOR es metabolizado por los *P450* de la familia *CYP9*, principalmente el *P9Q3* (Wade et al., 2019). Se ha estudiado que moscas transgénicas (*Drosophila*) para la expresión de *P9Q2* y *P9Q3* fueron menos susceptibles al CLOR, en comparación a las moscas control (Wade et al., 2019). Además, se ha evidenciado un efecto sinérgico entre el insecticida CLOR y los fungicidas triazoles, tales como el DIFENO, en bioensayos de toxicidad de contacto aguda, induciendo la actividad de los *P450* (Hass et al., 2022). Por otro lado, se ha estudiado que los fungicidas de esta familia, son inhibidores de la actividad de los *P450* (Iwasa et al., 2004; Egbuta et al., 2014; Berenbaum y Johnson, 2015; Gong y Diao, 2017). Por lo tanto, estos fungicidas, incluyendo al DIFENO, no son solo potenciales inhibidores de los *P450*, si no también inductores (Pal et al., 2022). De esta forma, las acciones antagónicas de esta mezcla de pesticidas pueden ser explicadas por la inducción de las enzimas de detoxificación, lo cual resulta en un aumento del metabolismo de estos compuestos y una disminución en la toxicidad (Johnson et al., 2013). Esto sugeriría que una exposición prolongada a dosis subletales de insecticidas y de fungicidas de esta familia podría provocar la inducción de genes que codifican a los *P450*, los cuales actúan como genes biomarcadores de la respuesta a la exposición (Grozinger y Zayed, 2020; Pal et al., 2022). A su vez, hay evidencias de que la ATZ incrementa significativamente la actividad de los citocromos *P450* en abejas (Fellows et al., 2022).

Con respecto a la actividad recolectora, se encontraron diferencias significativas entre muestreos para la recolección de polen y la relación entre la recolección de polen y la recolección total, siendo menores estas luego de la aplicación de pesticidas. Esto se observó en todos los apiarios, independientemente del entorno de cada uno. Tal como se mencionó en la temporada anterior, este comportamiento es opuesto al que hubiésemos esperado sin el efecto negativo del tratamiento contra

las malezas, debido a que, en el primer muestreo, y en los tres lotes, solo estaba en flor parte de la vegetación silvestre dentro del área de forrajeo, mientras que en el caso del segundo muestreo posterior a la aplicación de agroquímicos- el cultivo de los tres lotes, así como también el de los alrededores, ya estaba florecido.

El análisis de pesticidas reveló la presencia de residuos de los agroquímicos administrados, tanto en cera como en miel. Incluso, en el caso de GLI, ATZ y CLOR, las muestras registraron concentraciones mayores a las máximas permitidas por la Unión Europea en miel (50ng/g). Además, se encontraron trazas de pesticidas en las muestras colectadas antes de la administración de agroquímicos de post-emergencia. Por otro lado, el herbicida ATZ no había sido informado como utilizado en dicha administración. Se puede inferir, entonces, que estos compuestos pudieron haber sido aplicados en la etapa de pre-emergencia o barbecho químico y que hayan derivado hacia la flora silvestre, única floración disponible en el muestreo previo a la aplicación de post-emergencia. En síntesis, estos pesticidas están, efectivamente, ingresando a las colonias y entrando en contacto con todos sus miembros, tanto larvas como abejas adultas. Se han registrado efectos subletales de los herbicidas ATZ y GLI sobre las abejas melíferas a diferentes niveles, promoviendo la peroxidación lipídica (Jumarie et al., 2017), alterando la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Boily et al., 2013) y el sistema carotinoides-retinoides en las abejas melíferas (Helmer et al., 2015). Por otra parte, en el caso de los insecticidas, los primeros síntomas de intoxicación de las abejas melíferas con CLOR incluyen muerte, letargo, movimientos lentos y descoordinados (Kadala et al., 2019). A su vez, la exposición a corto plazo a LC en abejas obreras redujo la longevidad y afectó al rendimiento del aprendizaje y la memoria (Liao et al., 2018). En comparación, actualmente se sabe relativamente poco sobre si los fungicidas, cuyas aplicaciones superan a las de los insecticidas y herbicidas a escala mundial (Rondeau y Raine, 2022), suponen un riesgo para las abejas y otros insectos polinizadores.

La prueba de Spearman mostró una correlación positiva y significativa entre la concentración del herbicida ATZ en ceras y la expresión del citocromo *CYP6AS3*. Adicionalmente, este gen correlacionó negativa y significativamente con la concentración del insecticida CLOR en cera. A su vez, la expresión relativa de *CYP6BD1* correlacionó negativa y significativamente con la concentración de CLOR en miel. Sin embargo, no se observaron correlaciones significativas entre la expresión de estos genes biomarcadores de respuesta a la exposición de pesticidas en larvas y las variables de recolección de recursos en piquera. Esto también se registró en la temporada anterior, donde la expresión relativa de estos genes correlacionaba con las variables de recolección de recursos solo en el caso de las abejas jóvenes de interior de colmena. En ese caso, la entrada de recursos y el consecuente estado nutricional de las obreras de interior de colmena, parecería palear el efecto de los pesticidas, lo que no ocurriría en el caso de las larvas, donde, además, vemos una relación directa entre las trazas de agroquímicos en matrices apícolas y dos de estos genes biomarcadores de respuesta a la exposición. En este sentido, se ha observado una consistente modulación del metabolismo de xenobióticos y de la inmunidad por la ingesta de GLI por parte de las larvas en

diferentes experimentos *in vitro* (Gregorc et al., 2012; Dai et al., 2017; Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2020). A su vez, además de lo observado en la temporada anterior con relación a los herbicidas, se ha reportado en varios estudios previos que los insecticidas, en sus diferentes variedades, son más tóxicos para las larvas que para las abejas adultas (Atkin y Kellum, 1986; Davis, 1989; Tasei, 2001; Rortais et al., 2005; Heylen et al., 2011), siendo entonces factible que este impacto en la fase larvaria pueda potencialmente conducir a un debilitamiento de la estructura de la colonia (Zhu et al., 2014).

Teniendo en cuenta el perfil de expresión relativa de todos los genes estudiados y la concentración de pesticidas en cera y miel, el ACP reveló una discriminación entre los apiarios ubicados en los diferentes lotes. La dimensión limitada por los CP1 y CP2 distinguió a las observaciones individuales de las colmenas del lote C de aquellas de los lotes A y B. Entre las variables que mejor explican el CP1 se encuentran la expresión relativa de los citocromos *CYP6AS2* y *CYP6AS3*. Estos citocromos son justamente, los que presentan correlaciones significativas con la presencia de pesticidas en cera. La cera de abeja es esencial para la colonia. Dentro de la colmena, la cera es utilizada por las abejas obreras para construir las celdas que servirán para almacenar recursos alimenticios, como el pan de abeja y la miel, y para albergar a la cría (huevos, larvas y pupas) durante su desarrollo (Michener, 2000). Es importante tener en cuenta los residuos de plaguicidas en la cera porque representan una vía de exposición por contacto directo para las larvas de abeja, que pasan semanas desarrollándose en celdas de cría (Rondeau y Raine, 2022). No solo por un contacto directo entre las larvas y la cera de las celdas, sino porque también los pesticidas pueden migrar desde la cera a la dieta de las larvas e ingresar a su organismo a través de la ingesta (Kast y Kilchenman, 2022). Adicionalmente, la cera de abejas tiene una baja tasa de reposición y puede permanecer en la colmena durante muchos años, lo que conlleva una mayor acumulación de pesticidas liposolubles persistentes a lo largo del tiempo (Rondeau y Raine, 2022). Por otro lado, las observaciones individuales del apiario del lote C quedan definidas también por una menor concentración del insecticida CLOR en ambas matrices. Este colmenar es aquel ubicado en el lote con mayor proporción de flora silvestre. Tal como se mencionó en la sección anterior, la presencia de parches de vegetación no cultivo podría proveer tanto recursos florales mas diversos como reducir la posibilidad de deriva y la consecuente exposición a los pesticidas por parte de los polinizadores (Ucar y Hall, 2001; IPBES, 2016).

El estrés ambiental luego de la aplicación de pesticidas tiene un impacto sobre las vías de detoxificación de las larvas, en todos los apiarios, independientemente de las diferencias en sus entornos. La supervivencia de las colonias de abejas melíferas depende del correcto desarrollo larvario, y los niveles de exposición de las crías a residuos químicos que pueden causar daños irreversibles a nivel celular, fisiológico y morfológico, pueden poner en peligro el desarrollo de la abeja adulta (Morales et al., 2020).

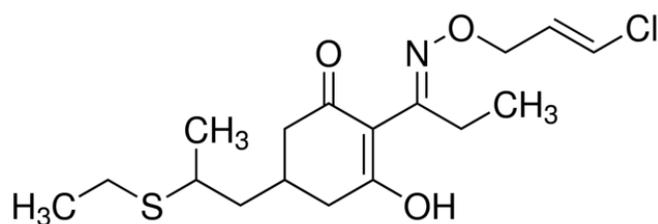
SITUACIÓN DE CAMPO 3: Exposición a herbicidas e insecticidas por aplicación terrestre. Evaluación de actividad recolectora, residuos de pesticidas en polen y de perfiles de expresión de genes asociados a las bases genéticas de la sociabilidad en abejas

5.1 Introducción

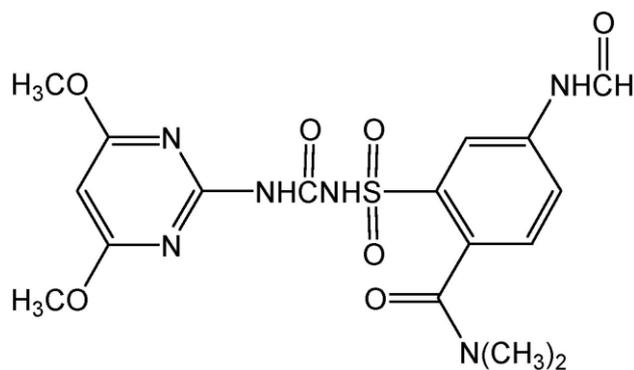
En las últimas décadas se ha registrado una pérdida de colmenas en muchos países, la cual se ha atribuido a múltiples factores, como patógenos, parásitos, la intensificación en el uso de pesticidas y la consecuente pérdida de hábitat y la fragmentación (Potts et al., 2010; Williams et al., 2010; Sgolastra et al., 2011; González-Varo et al., 2013). Una de las manifestaciones del fenómeno de despoblamiento de colmenas es la desorganización de la estructura social de la colmena, lo que desencadena la muerte de la población adulta (vanEngelsdorp et al., 2008; 2009; vanEngelsdorp y Meixner, 2010). Esta disrupción de la organización social podría ser explicada por exposiciones crónicas de las colmenas a insecticidas, las cuales promoverían déficits quimiosensoriales y cognitivos en los polinizadores (Farooqui, 2013).

Argentina es uno de los mayores exportadores mundiales de maíz, soja, trigo, cebada y sorgo, y el principal exportador a nivel mundial de aceite y harina de soja (FAO, 2019). Actualmente, la intensificación agrícola ha generado en el país la reducción de hábitats naturales y semi-naturales, lo que ha provocado la fragmentación del hábitat y la disminución de la abundancia y la diversidad floral (Galletto y Torres 2020). Esto ha provocado un impacto neto en la abundancia y la salud de las abejas silvestres y domesticadas (Dolezal et al. 2019; St Clair et al. 2020). Además, los pesticidas se consideran uno de los principales estresores abióticos para los polinizadores (IPBES 2016). Como ya se mencionó en los capítulos anteriores, el GLI es el agroquímico más utilizado en el mundo (CASAFE, 2014; Sanchez-Bayo y Goka, 2014) y actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual es parte de la vía del shikimato en plantas superiores, algas y bacterias (Cheremisinoff y Rosenfeld, 2007). Por otro lado, el Cletodim es un herbicida perteneciente a la clase de las Ciclohexanodionas, utilizado principalmente en cultivos de soja, algodón, girasol y otros cultivos de hoja ancha, en su estado de post-emergencia (Brinson Conerly, 1990; Edwards, 2005). Este herbicida inhibe la actividad de la Acetil-CoA carboxilasa, enzima importante en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos (Wenger y Niderman, 2007). Se han observado severas alteraciones morfológicas en abejas expuestas a este producto, así como también, una

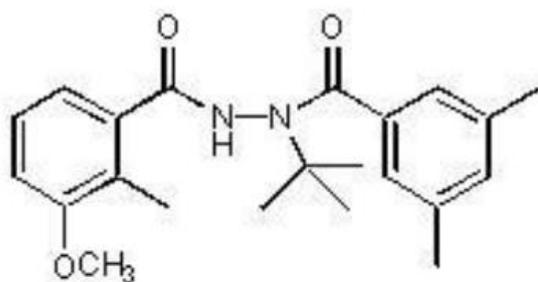
reducción en su peso y supervivencia (Mohamed et al., 2023). A su vez, el Foramsulfuron es un herbicida del grupo de las Sulfonilureas, que actúa inhibiendo la acetolactato sintasa (ALS), una enzima clave en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada (Ashton y Monaco, 1991). En el caso de los insecticidas, los piretroides como la lambda-cialotrina (LC), se utilizan en una amplia gama de plantas de cultivo (Liao et al., 2018), (Figura 4.2). Estos insecticidas neurotóxicos actúan sobre los canales de sodio, prolongando la entrada de iones Na^+ en la célula (Soderlund y Bloomquist, 1989; Ray y Fry, 2006; Martínez et al., 2019), especialmente en las neuronas. A su vez, el clorraniliprole (CLOR) es el primer miembro comercializado de los insecticidas del tipo de las diaminas, el cual induce una liberación de calcio dependiente de la dosis de los almacenes internos de las células musculares de los insectos, pero también un bloqueo dependiente de la dosis de la corriente de calcio activada por voltaje que participa en los músculos y la excitabilidad del cerebro (Kadala et al., 2019), (Figura 4.2). Aunque no se ha demostrado que el CLOR sea agudamente tóxico para las abejas, su creciente uso en entornos agrícolas aumenta la probabilidad de exposición de los insectos polinizadores benéficos (Williams et al., 2020). Por otra parte, la metoxifenocida (MF) es un regulador del crecimiento de los insectos (IGR) que se utiliza habitualmente en la agricultura para controlar simultáneamente las plagas y preservar las poblaciones de insectos beneficiosos (Figura 5.1). Actúa como un agonista del receptor de ecdisona que se une al receptor de ecdisteroides y activa la vía de señalización de ecdisteroides (Dhadialla et al., 1998; Smagghe et al., 2012). La MF tiene acción específica sobre los lepidópteros, dado que tiene una alta afinidad por el receptor de ecdisteroides de los lepidópteros que no se observa en otros órdenes de insectos (Dhadialla et al., 1998; Smagghe et al., 2012); sin embargo, la exposición a concentraciones subletales de MF altera la actividad y la termorregulación de las colonias de abejas (Meikle et al., 2019).



CLETODIM



FORAMSULFURON



METOXIFENOCIDA

Figura 5.1. Esquema de las moléculas de los componentes activos de los herbicidas utilizados en la temporada 2021 (Cletodim y Foramsulfuron) y del insecticida utilizado en la temporada 2020 (Metoxifenocida) y que no habían sido administrados en las temporadas anteriores. Todos ellos fueron aplicados de manera terrestre.

La ecología cognitiva evalúa cómo el entorno moldea la forma en que los animales toman decisiones en función de sus capacidades perceptivas y de aprendizaje (Dukas 1998; Chittka y Thomson 2001). En este sentido, el impacto de los efectos crónicos subletales es especialmente importante para los insectos sociales, ya que podrían afectar a toda la colonia de abejas (Farina et al., 2019). La exposición a GLI deteriora las capacidades cognitivas que podrían afectar a la eficiencia de la búsqueda de alimento y a la coordinación de las actividades colectivas en la colmena (Herbert et al., 2014; Balbuena et al., 2015; Mengoni Goñalons y Farina, 2018). Además, se observó que la exposición a corto plazo a LC en abejas obreras afectó al rendimiento del aprendizaje y la memoria y la capacidad de orientarse en el vuelo de retorno a la colonia (Liao et al., 2018). En este sentido, entre los factores que afectan al aprendizaje asociativo y la memoria en las abejas melíferas se encuentran los neurotransmisores y las proteínas sinápticas (Gauthier y Grünewald, 2011). La

acetilcolina (ACh) es uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central y se ha demostrado que participa en los procesos de aprendizaje de las abejas melíferas (Gauthier et al., 1992, 2006). Así, la expresión del gen de la *acetilcolinesterasa (AChE)*, que codifica la enzima para la descomposición catalítica de la *ACh*, podría tener un papel importante en el aprendizaje y la memoria de las abejas melíferas (Silman y Sussman, 2008). De esta forma, los procesos fisiológicos que subyacen a estas respuestas complejas de los polinizadores podrían verse alterados por la exposición a la intensificación agrícola, pudiendo visualizarse, por ejemplo, al analizar las vías genéticas vinculadas al desarrollo y conectividad neural en abejas adultas (Boily et al. 2013; Samson-Robert et al. 2015).

La eusocialidad ha surgido de forma independiente al menos 11 veces en los insectos (Wilson y Hölldobler, 2005). Aunque la evolución de la eusocialidad se ha estudiado ampliamente, los cambios genéticos implicados en la evolución de la eusocialidad siguen siendo relativamente desconocidos. Los genes implicados en la transducción de señales, el desarrollo de las glándulas y el metabolismo de los carbohidratos se encuentran entre los genes más destacados que evolucionan rápidamente en los linajes eusociales (Woodard et al., 2011). A su vez, los niveles de expresión de los genes involucrados se correlacionan con diferencias interindividuales en el grado de sociabilidad, tanto en especies de abejas sociales facultativas (Kocher et al. 2018) como en abejas eusociales (Woodard et al. 2011; Shpigler et al. 2017a). En este sentido, resulta importante estudiar estas vías genéticas involucradas en las bases de la sociabilidad en insectos, dado que, además, muestran una profunda conservación dentro del reino animal (Rittschof et al., 2014; Shpigler et al., 2017b).

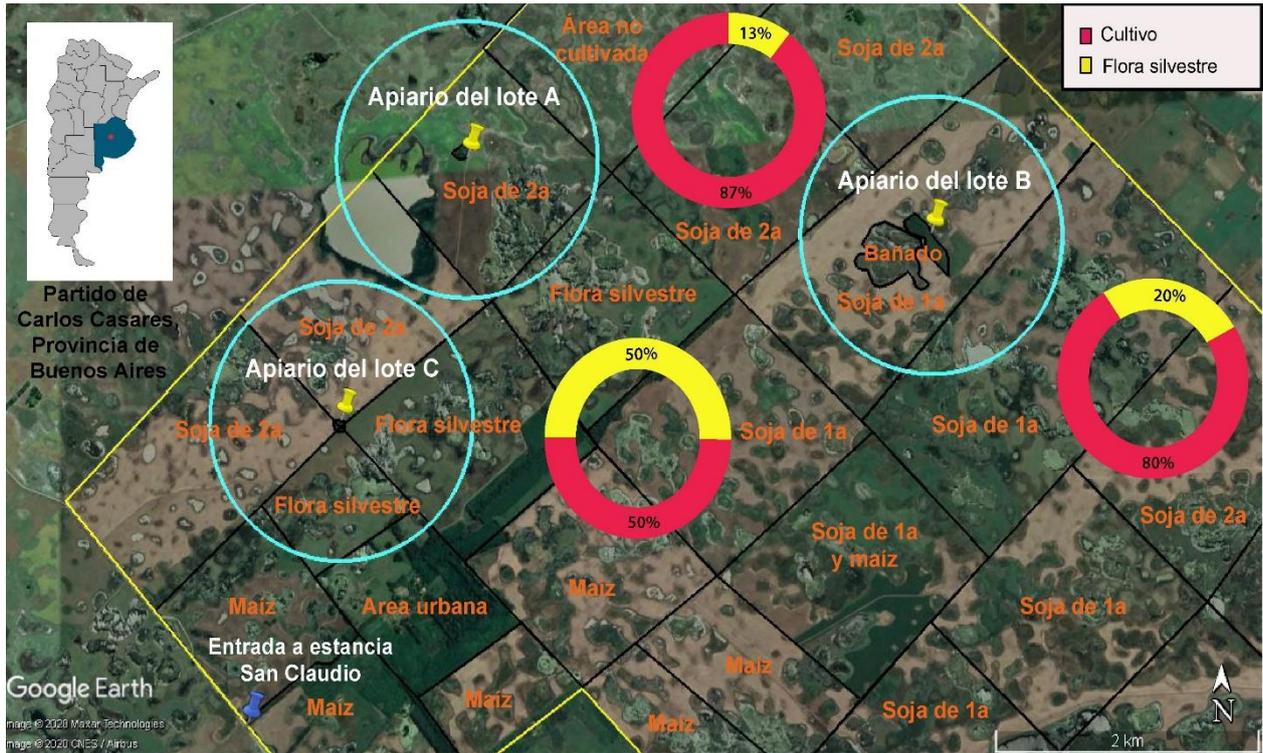
Con todo esto en mente, el objetivo para estas dos temporadas de muestreos fue evaluar el impacto a medio término de la aplicación de una mezcla de herbicidas e insecticidas sobre las capacidades cognitivas, la actividad recolectora y la expresión de genes relacionados con la sociabilidad en las abejas melíferas, en colmenas emplazadas en un agroecosistema. Además, analizar las correlaciones entre estas variables y la presencia de residuos de agroquímicos en el polen colectado en trampas de polen, y en última instancia, si los resultados obtenidos dependen de las características del cultivo y de las zonas de amortiguación con flora silvestre alrededor de los apiarios.

5.2 Metodología

5.2.1 Sitio de estudio, cultivos y aplicación de agroquímicos

Las últimas dos temporadas de muestreos se realizaron durante los veranos de los años 2020 y 2021 (Figura 5.2). Los muestreos se realizaron en el campo descrito en la metodología general del capítulo 2, donde también se efectuaron las campañas de las temporadas anteriores.

A



B

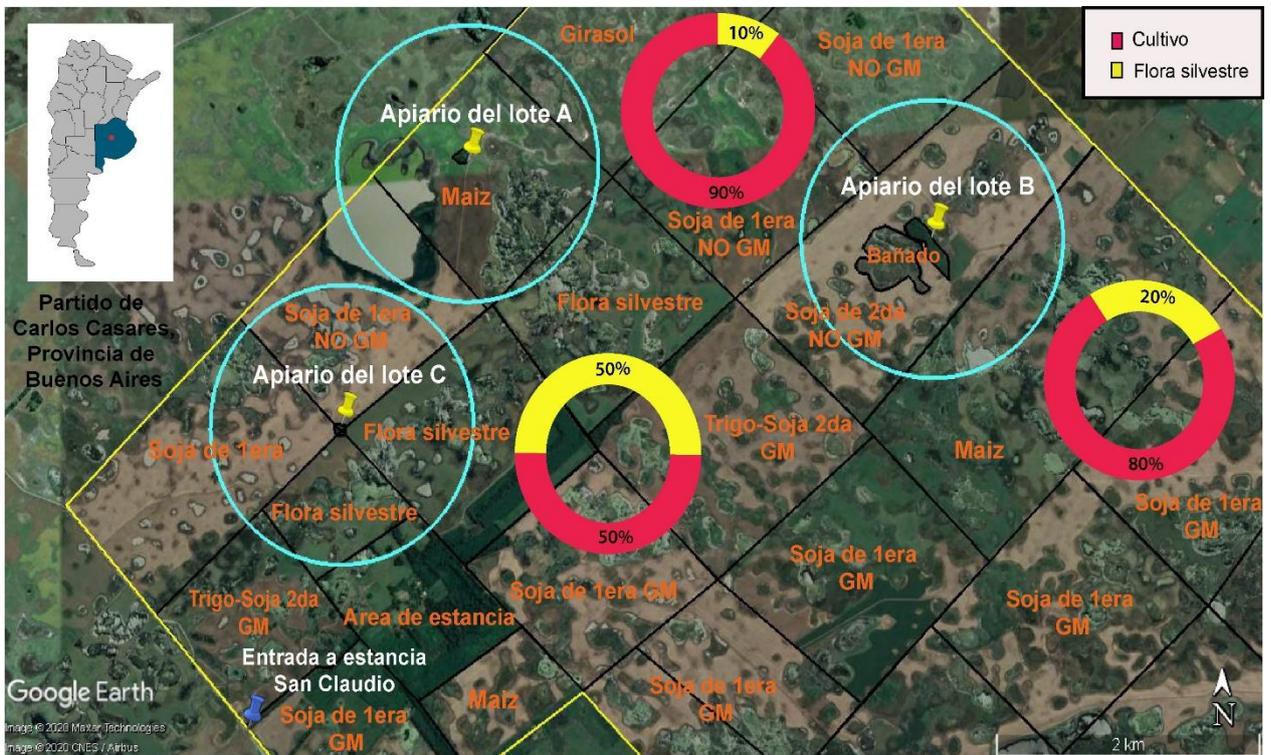


Figura 5.2. Ubicación geográfica de los tres apiarios estudiados. Estancia San Claudio, Carlos Casares, provincia de Buenos Aires, Argentina. **A)** Primera temporada (2020) y **B)** segunda temporada (2021) de muestreos. Las circunferencias de color celeste muestran un radio de 1 km desde cada apiario, indicando el área potencial de recolección. Los círculos que presentan la clasificación por color en cultivo (rosa) y flora silvestre (amarillo), indican el

porcentaje de cada tipo de vegetación. En color naranja se especifica el tipo de vegetación presente en cada lote. Mapa y delimitación de áreas de navegación realizados en Google Earth.

En el caso de la primera temporada, los cultivos sembrados fueron soja y maíz. La soja (Nidera 4611 y Don Mario 4615) fue sembrada en octubre del 2019 (siembra de primera) y en diciembre del 2019 (siembra de segunda) con semillas de ciclo de desarrollo corto, mientras que el maíz (KWS KM 4500 GL Stack) se sembró en octubre del mismo año. Ambos cultivos modificados genéticamente, tolerantes a herbicidas. El control de malezas de post emergencia se realizó a mediados del mes de enero del 2020 con una pulverizadora terrestre (1,5 L/ha). Además, se aplicó una mezcla de insecticidas a principios del mes de febrero, también con pulverizadora terrestre (40 cc/ha). El primer muestreo se realizó diez días antes de la aplicación de herbicidas y veinte días antes de la aplicación de insecticidas, mientras que el segundo muestreo se realizó treinta días después de la administración de herbicidas y veinte días después de la administración de insecticidas. El control de plagas se realizó con un herbicida comercial cuyo componente activo es el GLI (SUL-157 FOSATO TOUCHDOWN ®SYNGENTA) y con una mezcla de dos insecticidas comerciales: uno cuyos compuestos activos son el CLOR y la LC (AMPLIGO®) y otro cuyo compuesto activo es el MF (INTREPID®). La disposición de los apiarios y las características del campo ya fueron detalladas en la sección 2.1. Para el caso particular de esta temporada, y en orden creciente de proporción de flora silvestre, el primer apiario conto con 23 colmenas, localizadas en un parche de monte ubicado en el que denominamos lote A. Este lote fue sembrado con soja de segunda (Figura 5.3). Además, en el lote vecino, también se sembró soja de segunda, cultivo incluido dentro del área de navegación delimitada para este apiario. Por otro lado, en esta temporada, las colonias de este colmenar contaron con una porción extra de área no sembrada, incluida dentro de dicha circunferencia de navegación. El porcentaje de flora silvestre calculada para este lote, dentro del área de navegación del correspondiente apiario, fue entonces del 13%. Para mayor detalle de la delimitación de estas circunferencias de navegación y del cálculo de porcentajes de cultivo y flora silvestre, ver sección 2.1. El segundo apiario, por su parte, contaba con 33 colmenas, localizadas en un parche de monte y con presencia de una zona de bañado, en el lote denominado B. Este lote fue sembrado con soja de segunda, y estuvo rodeado a su vez, por soja de primera hacia un lado y soja de segunda hacia el otro. En este caso, el porcentaje de flora silvestre fue del 20%. Por último, el tercer apiario presentaba 44 colmenas, situadas en un parche de monte localizado en el denominado lote C. Este lote y el contiguo, fueron sembrados con soja de segunda y se mantuvo el área no cultivada hacia el otro lado del apiario. De esta forma, dentro del área de navegación, se incluyó un 50% de flora silvestre. Las condiciones climáticas fueron similares en ambos muestreos y óptimas para la actividad de recolección de las abejas, con un promedio de temperatura de 30 y 32 °C y de humedad relativa de 40 y 42%, respectivamente. Además, ambos muestreos fueron en días soleados sin vientos fuertes ni lluvias.



Figura 5.3. Una de las colmenas ubicadas en el lote A, en el muestreo previo a la aplicación de agroquímicos del año 1 (2020), donde puede apreciarse que el cultivo de soja de segunda estaba recién sembrado. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

Con respecto a la segunda temporada, los cultivos sembrados fueron soja, maíz y girasol. La soja fue sembrada en octubre del año 2020 (siembra de primera) y a finales de noviembre (siembra de segunda), mientras que los cultivos de maíz y girasol se sembraron en el mes de octubre del mismo año. Tanto el girasol (Syngenta 3950) como el maíz (KWS KM 4500 GL Stack) fueron cultivos modificados genéticamente, tolerantes a los herbicidas, mientras que, en el caso de la soja, se sembró GM en algunos lotes (Nidera 4611) y GM free en otros (Figura 5.2B). El control de malezas de post emergencia se realizó a finales de diciembre del 2020 con una pulverizadora terrestre (1,5 L/ha). El primer muestreo se realizó quince días antes de la aplicación de herbicidas, mientras que el segundo muestreo se realizó quince días después de dicha administración. En aquellos cultivos modificados genéticamente, el control de malezas se realizó con un herbicida comercial cuyo componente activo es el GLI (SUL-157 FOSATO TOUCHDOWN® SYNGENTA). Por otro lado, con respecto a los cultivos no transgénicos, la administración se realizó con un herbicida comercial cuyo componente activo es el Cletodim (CLETODIM HD® YPF agro), en el caso de la soja, mientras que en los cultivos de maíz se aplicó un herbicida comercial con Foramsulfuron (EQUIP® BAYER). Durante los periodos de muestreo no se realizó ningún tratamiento con insecticidas ni fungicidas. En esta temporada, el primer apiario, ubicado en el lote A, conto con 25 colmenas. Este lote fue sembrado con maíz (Figura 5.4). Además, dentro del área de circunferencia de navegación de sus

colonias, se incluyó una porción de cultivo de soja de primera y otra de girasol, sembrados en lotes vecinos. El porcentaje de flora silvestre calculada para este lote, fue del 10%. El segundo apiario, ubicado en el lote B, incluyó 32 colmenas. Este lote fue sembrado con soja de segunda no transgénica, y estuvo rodeado a su vez, por soja de primera no transgénica y por maíz, cultivos sembrados en lotes vecinos. En este caso, el porcentaje de flora silvestre fue del 20%. Por último, el tercer apiario, ubicado en el lote C, presentaba 42 colmenas. Este lote fue sembrado con soja de primera no GM y el lote contiguo, con porción incluida dentro del área de navegación de este apiario, con soja de primera GM. De esta forma, el porcentaje de flora silvestre incluida dentro de dicha área, fue del 50%. Las condiciones climáticas fueron similares en ambos muestreos y óptimas para la actividad de recolección de las abejas, con un promedio de temperatura de 28 y 30 °C y de humedad relativa de 32 y 30%, respectivamente. Además, y al igual que en la primera temporada, ambos muestreos fueron en días soleados sin vientos fuertes ni lluvias.





Figura 5.4. A) Cultivo de maíz aledaño al apiario del lote A en la segunda temporada de muestreos del año 2 (2021). **B)** Detalle del cultivo en el muestreo pre, sin floración. **C)** Medición de actividad recolectora en la entrada de las colmenas. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

En ambas temporadas, durante los periodos de muestreo los apicultores no trataron a las colmenas con antibióticos o acaricidas. Por otro lado, todos los cultivos estaban en su etapa vegetativa al momento del primer muestreo, sin flores disponibles para el forrajeo de las abejas. Por el contrario, al momento del segundo muestreo, todos los cultivos estaban en flor. Por lo tanto, la floración de la vegetación no cultivo fue la única fuente de alimento para las abejas durante el primer muestreo, en todos los lotes estudiados.

5.2.2 Variables analizadas

Para estas dos temporadas, se realizó un análisis conjunto, desde cuatro enfoques diferentes. En el caso del abordaje comportamental, se estudiaron múltiples variables, tanto a nivel colonia, como a nivel de abeja recolectora individual. En primer lugar, se estudió la actividad recolectora de las colonias (Figura 5.5). En estos dos años, además de registrarse la tasa de recolectoras totales, la tasa de recolectoras con polen y el ratio polen/total, a través del conteo de ingresos de abejas recolectoras en la entrada de las colmenas, se sumó la colocación de trampas de polen según lo explicado en la sección 2.2.1.2. A diferencia de las temporadas anteriores, los muestreos se realizaron durante una mayor cantidad de días, de manera que las variables de actividad en piquera

se registraron dos veces al día, durante tres días consecutivos. Un registro durante la mañana (entre las 9 y 11hs) y otro por la tarde (entre las 15:30 y las 17:30hs). A su vez, en el caso de las trampas de polen, se colocaron durante la mañana y se colectó su contenido por la tarde, en tres días consecutivos. El tiempo de permanencia de las trampas en las colmenas fue de entre 3 y 6 horas.





Figura 5.5. Registro de actividad recolectora en las colmenas del lote B. A) Actividad en la entrada de las colmenas y **B-C)** en trampas de polen. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

Con la finalidad de evaluar si la sensibilidad gustativa y la capacidad de asociar una recompensa de sacarosa con una fragancia floral se ven afectadas por la administración de agroquímicos, se realizaron ensayos *in situ* de condicionamiento olfativo clásico y umbrales de respuesta al azúcar, adaptados para la condición de trabajo de campo según lo detallado en las secciones 2.2.2.1 y 2.2.2.2 (Figura 5.6). Ambas capacidades evaluadas son fundamentales para reconocer nuevas fuentes de alimentos, evaluar su productividad y aprender claves visuales y olfativas que les permitan orientarse y volver a visitar a las fuentes más ricas en los sucesivos vuelos de recolección. Estos procesos cognitivos requieren la integración de distintas modalidades sensoriales (visual, olfativa, gustativa, entre otras) para formar memorias que guiarán el comportamiento recolector y la toma de decisiones en un ambiente con recursos cambiantes.



Figura 5.6. Abejas encepadas para el desarrollo de los ensayos *in situ* de condicionamiento olfativo y umbrales de respuesta al azúcar, adaptados para la condición de trabajo de campo. Crédito fotográfico: grupo INSSOC.

Por otro lado, dentro del abordaje molecular, se analizó la expresión relativa de genes relacionados con las bases genéticas de la sociabilidad en abejas. Como se mencionó en la sección 1.5.2, los genes elegidos para evaluar el perfil de expresión antes y después de la aplicación de agroquímicos y los consecuentes cambios en la floración de los cultivos fueron *AChE*, *brahma*, *enolase*, *pelle*, *syx1a* y *syx7*. En este caso, los análisis se realizaron en muestras de abejas recolectoras, capturadas en la entrada de las diferentes colmenas escogidas al azar.

A su vez, desde un abordaje ecotoxicológico, se realizó un análisis de pesticidas en muestras de polen colectado en las trampas y en abejas recolectoras capturadas en su retorno a la colonia, en la piquera de las colmenas estudiadas. La metodología de procesamiento de las muestras, tanto para el análisis de expresión génica como para el análisis de pesticidas, será detallada en las próximas secciones.

Por último, se estudió un abordaje multivariado, con el objetivo de entender las relaciones subyacentes dadas por los perfiles de expresión génica, la presencia de residuos de pesticidas en polen y la actividad recolectora. Para ello, se realizó un análisis de correlación entre variables y un Análisis de Componentes Principales.

5.2.3 Colecta de muestras

Se capturaron, con el uso de tubos de ensayo, abejas recolectoras en la entrada de cuatro de las ocho colmenas seleccionadas al azar en cada apiario para las mediciones de actividad recolectora. Estas fueron colocadas inmediatamente en crioviales y almacenadas en nitrógeno líquido. Una parte de estas abejas fueron destinadas a la posterior disección de cerebros y extracción de ARN para el análisis de expresión génica, mientras que el resto fueron utilizadas posteriormente para el análisis de pesticidas. Por otro lado, las muestras de polen para el análisis de pesticidas fueron tomadas del polen colectado en las trampas ubicadas en tres de esas mismas ocho colmenas seleccionadas al azar en cada apiario. Estas colectas se realizaron en las mismas colmenas, antes y después de la aplicación de pesticidas en los cultivos aledaños, en ambas temporadas analizadas.

5.2.4 Análisis de expresión génica

La disección de cerebros, la extracción de ARN y los análisis de expresión génica en qPCR se realizaron en el Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-UBA-CONICET).

La disección de cerebros se realizó bajo estereomicroscopio óptico Leica M60, fijando a las abejas con cera fundida. Se diseccionaron diez cerebros de abejas recolectoras por colonia, utilizando bisturí, pinzas y tijeras de disección, los cuales fueron colocados inmediatamente en tubos eppendorf con TRIzol® (Invitrogen) para la subsiguiente extracción de ARN. De esta forma, contamos con cuatro réplicas biológicas por cada apiario. La extracción de ARN se realizó entonces para cada pool de diez cerebros, usando TRIzol®, según el protocolo del proveedor y luego resuspendido en 90 mL de agua DEPC. El ARN obtenido fue tratado con DNase (Promega), previo a la reacción de la transcriptasa reversa (RT). La síntesis de ADNc se realizó a partir de 2 µg de ARN tratado por muestra (cuantificación realizada mediante Thermo Scientific™ NanoDrop 2000), utilizando la RT M-MLV (Promega).

Para obtener los niveles de expresión relativa de *AChE*, *brahma*, *enolase*, *pelle*, *syx1a* y *syx7*, cada reacción de qPCR se realizó en triplicado para cada replica biológica (Tabla 5.1). El análisis comparativo de qPCR, se basó en el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y se realizó utilizando el software del equipo ABI StepOne Plus, siguiendo el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, 2014). A su vez, para asegurar el correcto uso de dicho método, se calculó y validó la eficiencia de los primers, tanto para los genes de interés como para los genes de referencia (Tabla 5.2). Además, se analizó la curva de melting de cada par de primers para corroborar la especificidad de la amplificación. *Rp49s* y *GAPDH* fueron utilizados como genes de referencia. Ambos fueron previamente descritos como genes de referencia estables en *A. mellifera* (Lourenço et al. 2008; Scharlaken et al., 2008). Las muestras

obtenidas en la primera campaña fueron tomadas como control, para comparar cuan diferente fue la expresión relativa de nuestros genes de interés, luego de la aplicación de agroquímicos. En todas las corridas de qPCR se incluyeron controles negativos para cada primer por duplicado.

Tabla 5.1. Modelos de primers. Secuencia, tamaño del producto amplificado y temperatura de melting para los genes constitutivos *GAPDH* y *Rp49S* y los genes de interés *AChE*, *brahma*, *enolase*, *pelle*, *syx1a*, *syx7*.

Gen	Secuencia	Tm
<i>GAPDH</i>	F: GATTCCCGATTGGTTTTTGA R: CCCAATAATGACGCAAACCT	60
<i>Rp49S</i>	F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT R: TTGAGCACGTTCAACAATGG	58
<i>AChE</i>	F: AACCGGCTTAAGGATTGAT R: CCCTCTCCCCTTCAATCTTC	58
<i>Brahma</i>	F: CTGGTCCACCTCAACAACCT R: CCTCCAGGAACCAATTGAGA	58
<i>Enolase</i>	F: GGTGATGAAGGTGGTTTTGC R: GATGCAGCAACATCCATACC	58
<i>Pelle</i>	F: TGGGAAGAAGCTTGCTGGAAT R: GATTGTGATGTCCCCATAATGTT	60
<i>Syx1a</i>	F: TTCAACTTATTGCTGAAAATACTGCT R: TCATCAATGGGGACAACCTC.	56
<i>Syx7</i>	F: GCGTAAGATGCAAAGAGAACG R: CGCTTTGGCTCTTCTAACCA	60

Tabla 5.2. Validación de primers. Valores de eficiencia y R^2 para los genes de interés y el constitutivo, obtenidos en la curva standard.

	Gen	Eficiencia (%)	R^2
GENES DE INTERES	<i>AChE</i>	100.37	0.96
	<i>brahma</i>	110	0.9
	<i>enolase</i>	99.32	0.93
	<i>pelle</i>	108.89	1
	<i>syx7</i>	96.85	0.93
	<i>syx1a</i>	90	0.99
CONSTITUTIVOS	<i>GAPDH</i>	95	0.99
	<i>Rp49S</i>	104.94	0.97

5.2.5 Análisis de pesticidas en polen y abejas recolectoras

Al igual que en el caso de la temporada 2019, el análisis de pesticidas se realizó en el Instituto de Tecnología en Alimentos (ITA) del Centro de Investigaciones de Agroindustria (CIA) del Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria (INTA). Hasta el momento del análisis, las muestras de cera y miel fueron almacenadas en freezer, a -20 °C.

La determinación de residuos en polen y abejas se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 4.2.5., utilizando un 1g de muestra. La determinación de GLI y AMPA se realizó mediante un análisis de cromatografía líquida/espectrometría de masas, mientras que la determinación de los insecticidas y el resto de los herbicidas se realizó mediante un análisis de cromatografía de gases/espectrometría de masas, con los mismos métodos y equipamiento mencionados en la sección 4.2.5.

5.2.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con el programa R v3.5.1. (R Core Team, 2018), utilizando la función `glm` para los modelos lineales generalizados (GLM) y la función `glmer` para los modelos mixtos (GLMM), ambas funciones del paquete `lme4` (Bates et al., 2009). Además, se utilizó el paquete `glmmTMB` (Brooks et al., 2017) para los errores con distribución Binomial.

Las variables de actividad recolectora en piquera fueron analizadas con GLMM. En el caso de las tasas de recolección, tanto de ingresos totales como con polen en sus corbículas, sus errores mostraron una distribución Binomial Negativa debido a la sobre dispersión de los datos. Por otro lado, el ratio polen/total se analizó con una distribución Beta binomial, también debido a la sobre dispersión de los datos. Para las variables medidas en las trampas de polen, se propuso un modelo mixto con distribución Normal del error para el peso total de polen colectado. En el caso de la proporción de colores de polen encontrada en cada trampa, se propuso un `glmm` con distribución Binomial del error. Además, para estas dos últimas variables relacionadas a la recolección de polen, se incluyó como `offset` la transformación `log` del tiempo durante el cual estuvieron colocadas las trampas en cada colmena, debido a que la distancia entre apiarios implicó un tiempo de traslado que sumó minutos a la presencia de las trampas colocadas en las últimas colonias visitadas.

Los datos de condicionamiento olfativo fueron analizados con un GLM con distribución Poisson del error, en el caso de la fase de adquisición, mientras que la fase de testeo y los datos de sensibilidad gustativa fueron analizados con un GLM con distribución Binomial del error. Por otro lado, para los datos de expresión génica se planteó un GLMM con distribución gamma del error.

Para el análisis de la concentración de pesticidas en polen se utilizaron métodos no paramétricos, usando el paquete “`PMCMRplus`” (Pohlert, 2020). La prueba de rangos de Wilcoxon se utilizó para las comparaciones entre muestreos, mientras que, para las comparaciones entre lotes, se utilizó la

prueba de rangos de Friedman. Estas dos pruebas son las recomendadas para datos pareados cuyos errores no siguen una distribución normal (Dalgaard, 2008). A su vez, para las comparaciones *post hoc* se empleó la prueba de Conover, con corrección de Bonferroni.

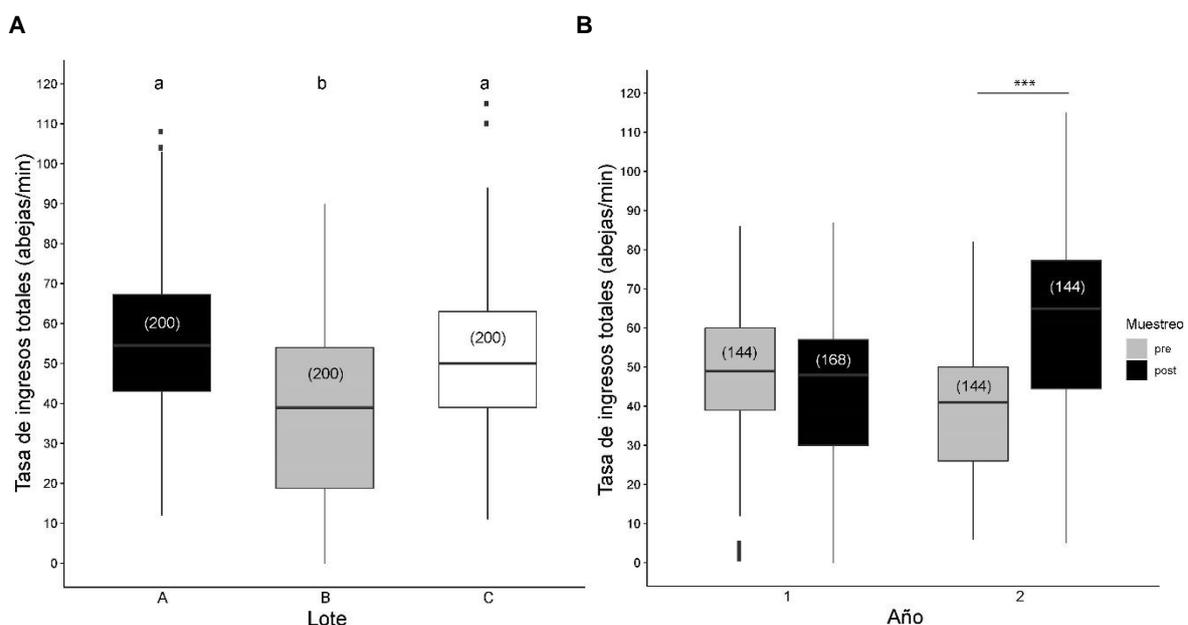
En todos los modelos generalizados se evaluó la sub/sobre dispersión y el ajuste del modelo utilizando el paquete DHARMA (Hartig, 2020). A su vez, todos los modelos generalizados incluyeron a la colmena como variable aleatoria. La significancia de las variables explicativas incluidas en los modelos fue puesta a prueba con la función anova para comparar modelos anidados (Chambers y Hastie, 1992). Aquellas variables no significativas ($p > 0,05$) fueron removidas del modelo. Además, todas las comparaciones a posteriori fueron realizadas con el paquete emmeans (Lenth, 2020).

Para el análisis de componentes principales (PCA) y la prueba de correlación de Kendall se utilizaron las librerías “ade4” (Thioulouse et al., 2018) y “psych” (Clark, 2020), respectivamente. A su vez, se utilizó el paquete “FactoMineR” (Le et al., 2008) para los gráficos del PCA.

5.3 Resultados

5.3.1 Abordaje comportamental: actividad recolectora, sensibilidad gustativa y condicionamiento olfativo

Al igual que en las temporadas anteriores, con la finalidad de estimar la actividad recolectora de las colonias, antes y después de la aplicación de agroquímicos, se evaluó tanto la tasa de ingreso de abejas recolectoras totales como de abejas con polen en sus corbículas (abejas/minuto), así como también, el ratio polen/total, en los tres apiarios estudiados y en ambos años (Figura 5.7).



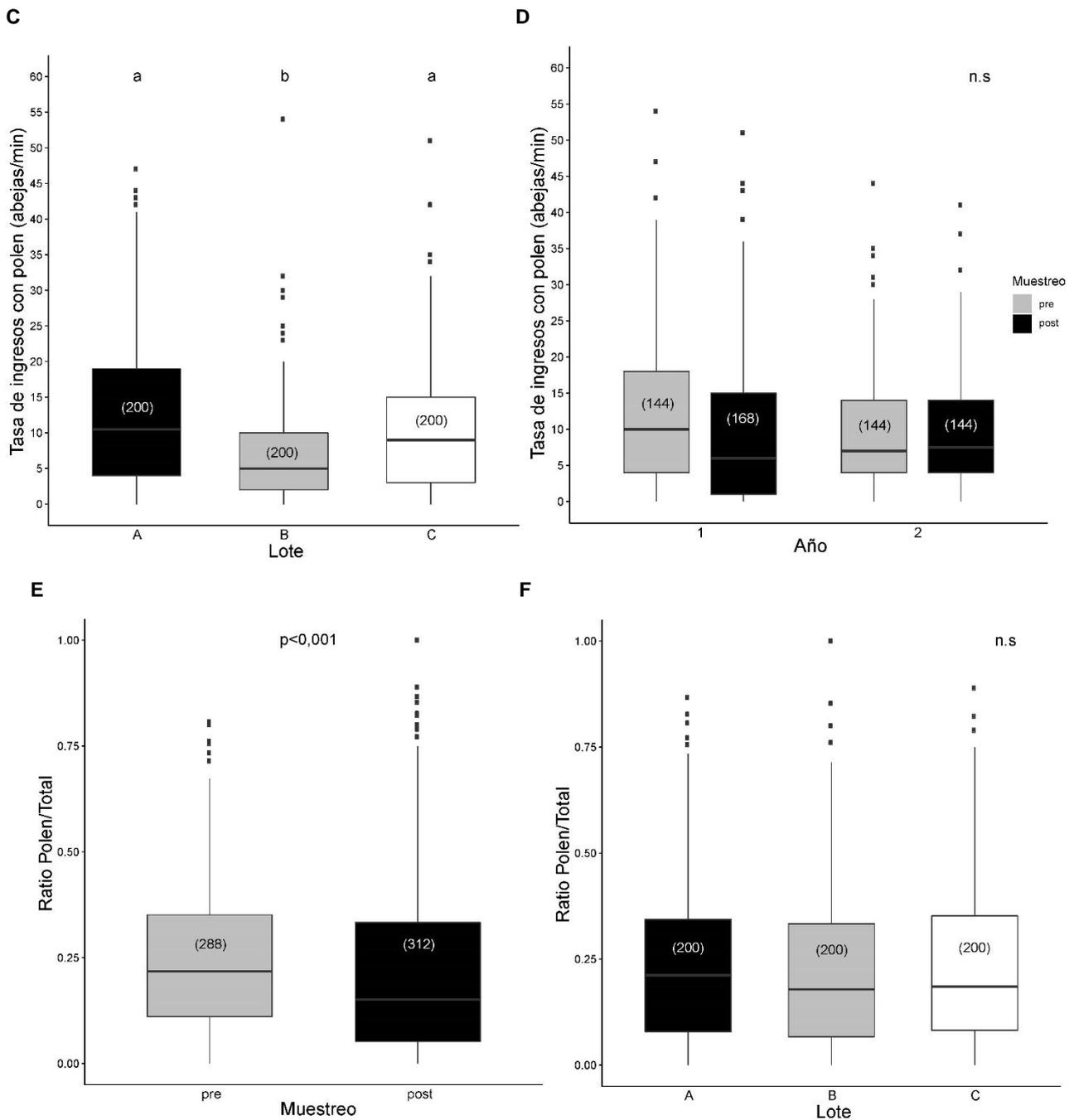


Figura 5.7. Actividad recolectora. **A-C-F)** En los apiarios de los diferentes lotes en ambos años. **B-D)** Pre y post aplicación de agroquímicos, para cada año. **E)** Pre y post aplicación de agroquímicos en ambos años. **A-B)** Número de abejas entrantes en piquera por minuto (Modelo binomial negativa: Recolectoras totales \sim muestreo* $\text{año} + \text{lote} + (1|\text{colmena})$; LRT interacción = 43,590; LRT lote = 30,174; $p < 0,001$). **C-D)** Número de abejas entrantes en piquera con polen en sus corbículas por minuto (Modelo binomial negativa: Recolectoras con polen \sim lote + $(1|\text{colmena})$; LRT = 23,214; $p < 0,001$). **E-F)** Ratio polen/total (Modelo beta binomial: Ratio polen/total \sim Muestreo + $(1|\text{colmena})$; LRT = 12,642; $p < 0,001$). Las cajas representan la mediana y el rango intercuartil (RIC), los bigotes muestran el valor máximo en el RIC 1.5 y los puntos individuales representan valores por fuera de este rango. El p valor corresponde a diferencias entre muestreos (n.s.: $p > 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los muestreos del año 2 (** $p < 0,001$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los apiarios de los distintos lotes ($p < 0,001$). Los números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

El análisis estadístico reveló que la tasa de ingresos totales (Modelo binomial negativa: Recolectoras totales ~ muestreo*año + lote + (1|colmena), Figura 5.7) fue significativamente mayor luego de la administración de herbicidas en el caso de la segunda temporada de muestreos (z.ratio = -7,601; p < 0,001; Tabla A5.1), mientras que no se registraron diferencias significativas entre muestreos para la primera temporada (z.ratio = 1,635; p = 0,102; Tabla A5.1). Además, la tasa de recolección total fue diferente entre apiarios, siendo significativamente menor en el apiario del lote B, comparado con los apiarios de los lotes A (z.ratio = 7,391; p < 0,001; Tabla A5.1) y C (z.ratio = 5,717; p < 0,001; Tabla A5.1), en ambas temporadas de muestreo (LRT 30,174; p < 0,001; Tabla A5.1). En el caso de la tasa de recolección de polen (Figura 5.7), se observaron diferencias significativas entre apiarios, para ambas temporadas (Modelo binomial negativa: Recolectoras con polen ~ lote + (1|colmena); LRT = 23,214; p < 0,001; Tabla A5.1), siendo significativamente menor la recolección en el apiario del lote B comparado con los apiarios de los lotes A (z.ratio = 5,993; p < 0,001, Tabla A5.1) y C (z.ratio = 4,112; p < 0,001; Tabla A5.1). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas entre momentos de muestreo en ninguna de las dos temporadas analizadas (Tabla A5.1). Cuando se analizó el ratio polen/total, se observó una disminución significativa luego de la aplicación de pesticidas, en ambos años (Modelo Beta binomial: Ratio/polen ~ muestreo + (1|colmena), LRT = 12,642; p < 0,001; Tabla A5.1; Figura 5.7). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los apiarios de los diferentes lotes (Tabla A5.1; Figura 5.7).

Estas dos temporadas se utilizaron trampas de polen como otra manera de medir el nivel de recolección en las colonias, particularmente de polen. Se evaluó el peso total de polen recolectado, por un lado, y el índice de variabilidad de polen, dado por el número de colores de polen encontrado en cada trampa, dividido el total de colores registrados para la totalidad de los apiarios en el muestreo determinado, por el otro (Figura 5.8). El análisis estadístico reveló que el peso total de polen recolectado fue significativamente mayor luego de la administración de pesticidas, en el caso de la segunda temporada analizada (t.ratio = -2,785; p = 0,005; Tabla A5.1), mientras que no se observaron diferencias significativas entre muestreos para la primera (t.ratio = 0,934; p = 0,353; Tabla A5.1). A su vez, no se registraron diferencias significativas entre los apiarios de los distintos lotes para ninguna de las dos temporadas estudiadas (Modelo normal: Peso polen ~ muestreo*año + (1|colmena); LRT = 7,540; p = 0,006; Tabla A5.1). En el caso del índice de variabilidad de polen recolectado, se registraron diferencias entre muestreos en ambas temporadas, siendo significativamente menor el índice de variabilidad luego de la aplicación de agroquímicos (Modelo normal: Prop. color polen ~ muestreo + (1|colmena); LRT = 7,709; p = 0,007; Tabla A5.1). Sin embargo, tal como ocurrió para el peso total de polen recolectado, no se observaron diferencias significativas entre apiarios en ninguna de las temporadas analizadas (Tabla A5.1).

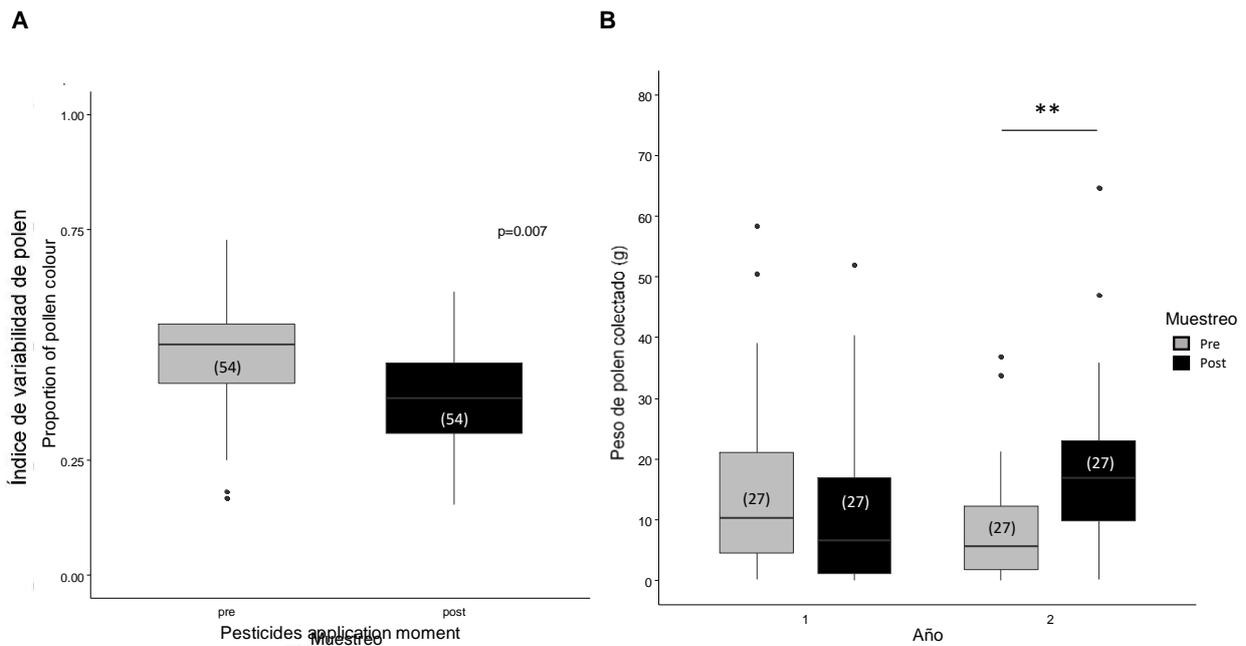


Figura 5.8. A) Índice de variabilidad de polen pre y post aplicación de agroquímicos en ambos años (Modelo binomial: Índice polen ~ muestreo + (1|colmena); LRT = 7,709; $p = 0,007$). **B) Peso de polen recolectado** pre y post administración, para cada año (Modelo normal: Peso polen ~ muestreo*año + (1|colmena); LRT = 7,540; $p = 0,006$). Las cajas representan la mediana y el rango intercuartil (RIQ), los bigotes muestran el valor máximo en el RIQ 1.5 y los puntos individuales representan valores por fuera de este rango. El p valor corresponde a diferencias entre muestreos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los muestreos del año 2 (** $p < 0,01$). Los números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

Pasando a los ensayos comportamentales *in situ*, se evaluó tanto la sensibilidad gustativa como la asociación olor-recompensa a través del condicionamiento olfativo clásico, ambos experimentos basados en el paradigma de extensión de probóscide explicado en la sección 1.2. Dado que, para el estudio de sensibilidad gustativa adaptado para las condiciones del trabajo de campo se obtiene una proporción de respuestas para cada concentración de solución de sacarosa evaluada (Figura 5.9), el análisis estadístico en este caso es independiente para cada concentración y representa una única medida por individuo, por lo cual, no se suma como variable explicativa aleatoria. Las soluciones de sacarosa para las cuales se observaron diferencias significativas fueron aquellas de menor concentración; 0,1 y 0,3% p/p. En ambos casos, la sensibilidad gustativa fue significativamente menor luego de la aplicación de agroquímicos, y esto se registró para las dos temporadas de muestreos analizadas (Modelo binomial: Respuesta ~ muestreo; LRT = 8,743; $p = 0,003$ y LRT = 5,131; $p = 0,023$ respectivamente; Tabla A5.2). Además, esta reducción en la sensibilidad gustativa posterior a la administración de pesticidas también se observó en la concentración más alta, 50% p/p (Modelo binomial: Respuesta ~ muestreo; LRT = 6,648; $p = 0,009$; Tabla A5.2).

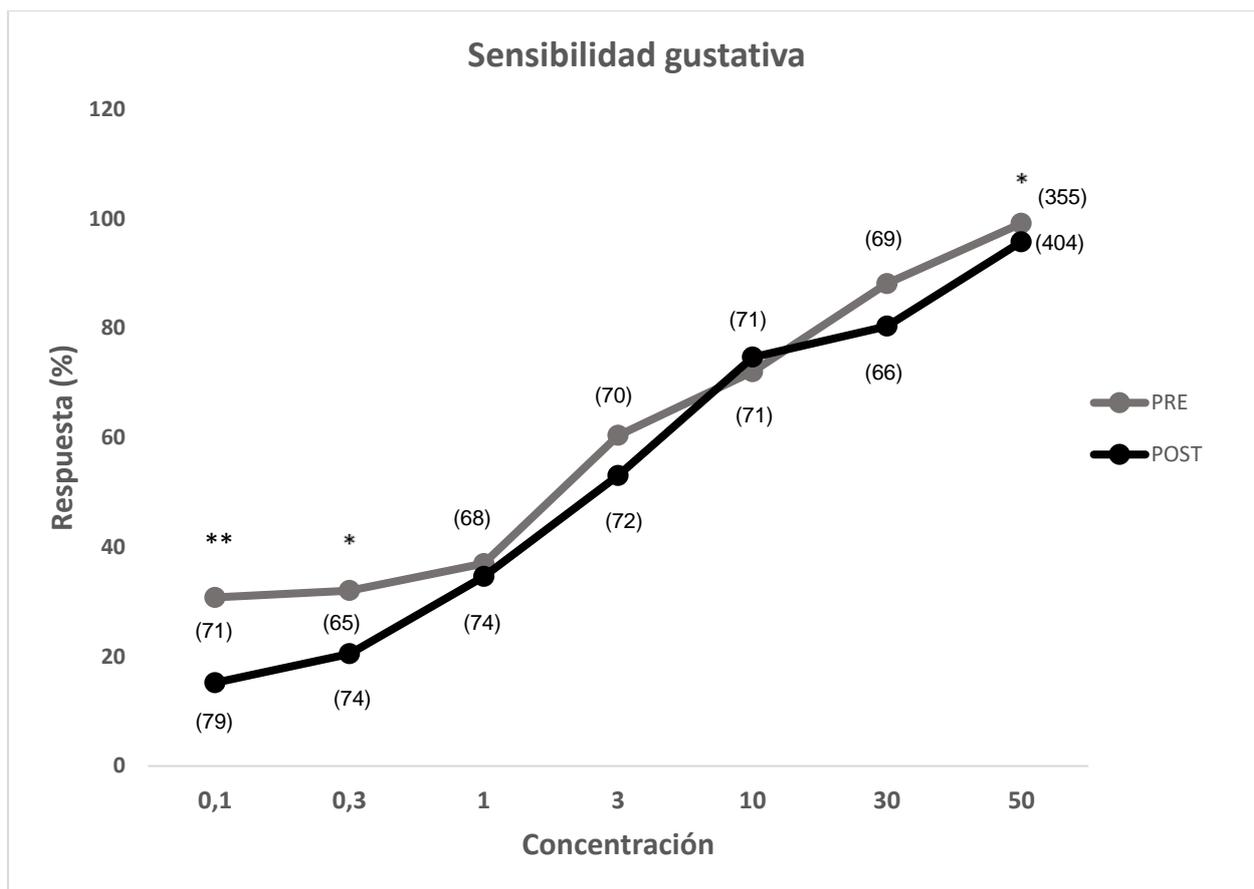


Figura 5.9. Sensibilidad gustativa. Porcentaje de respuesta pre y post administración de agroquímicos (Modelo binomial: Respuesta ~ muestreo). Asteriscos indican diferencias significativas entre muestreos para ambos años (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Números entre paréntesis indican el tamaño muestral por concentración y muestreo.

Con respecto a la asociación olor-recompensa, a través del condicionamiento olfativo, al finalizar el experimento obtenemos un score de respuesta por individuo, es decir, la sumatoria de eventos (de 0 a 3) en los cuales la abeja encephada responde a la presencia del olor, antes del contacto de la solución azucarada en sus antenas. De esta forma, también tenemos un dato por individuo y, por lo tanto, éste no se suma como variable explicativa aleatoria. Los resultados muestran que la respuesta condicionada (Modelo Poisson: Respuesta ~ muestreo + lote + año, Tabla A5.2, Figura 5.10) fue significativamente menor luego de la aplicación de agroquímicos (LRT = 20,840; $p < 0,001$; Tabla A5.2). A su vez, este efecto fue mayor en el caso de la segunda temporada de muestreos, donde se aplicó una mezcla de herbicidas, en comparación con la primera temporada estudiada (LRT = 22,442; $p < 0,001$; Tabla A5.2), donde se aplicaron tanto herbicidas como insecticidas. Además, se registraron diferencias significativas entre los apiarios de los distintos lotes (LRT = 13,608; $p = 0,0011$; Tabla A5.2), siendo menor la respuesta condicionada en el apiario del lote A con respecto al apiario del lote B (z.ratio = -3,119; $p = 0,005$) y al apiario del lote C (z.ratio = -3,276; $p = 0,003$). Por otro lado, en la fase de testeo (Modelo Binomial: Respuesta ~ muestreo + año + lote, Figura 5.10), donde se analiza el establecimiento de la memoria de las instancias evaluativas previas, también se observó

una respuesta significativamente menor luego de la aplicación de agroquímicos (LRT = 13,477; $p < 0,001$; Tabla A5.2) y en la segunda temporada de muestreos en comparación con la primera (LRT = 22,231; $p < 0,001$, Tabla A5.2). A su vez, el apiario del lote A mostro un menor nivel de respuesta condicionada que el apiario del lote B (z.ratio = -2,906; $p = 0,010$).

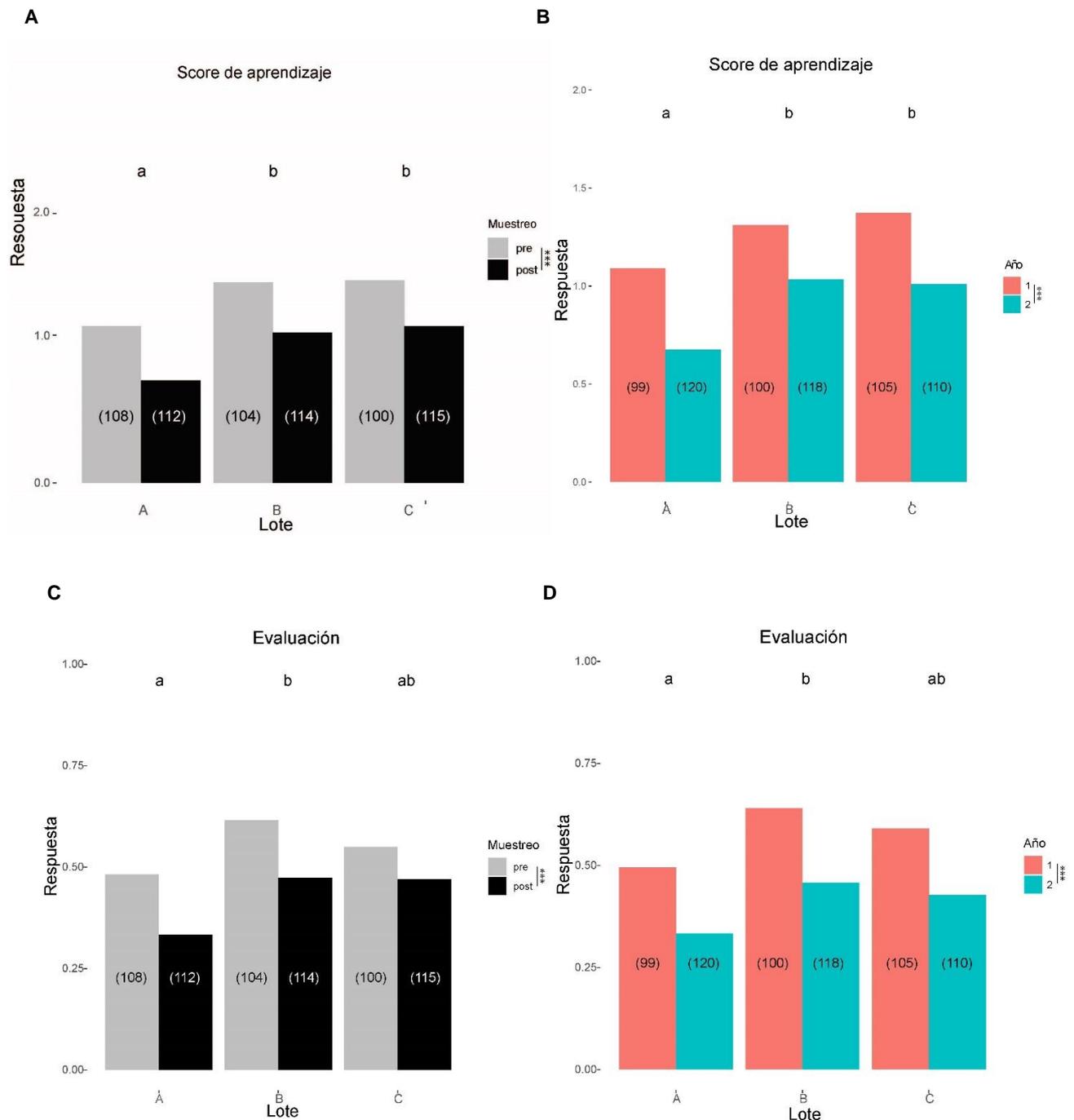


Figura 5.10. Condicionamiento olfativo. A-B) Score de respuesta en la fase de aprendizaje (de 0 a 3). Modelo Poisson: Score de respuesta ~ Muestreo + año + Lote. **C-D)** Respuesta en la fase de evaluación (0 y 1). Modelo Binomial: Respuesta ~ Muestreo + año + Lote. **A-C)** Para los apiarios de los diferentes lotes en los muestreos pre y post aplicación de pesticidas, **B-D)** para los apiarios de los diferentes lotes en los años 1 y 2. Asteriscos indican diferencias significativas

entre muestreos y años (** $p < 0,001$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los apiarios de los distintos lotes ($p < 0,05$). Números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

5.3.2 Abordaje molecular: análisis de expresión relativa de genes relacionados con las bases genéticas de la sociabilidad

Con el objetivo de evaluar los cambios en la expresión de genes asociados a la evolución de la eusocialidad en abejas, debido a la aplicación de agroquímicos y los cambios en la disponibilidad de recursos, se midieron los niveles de expresión relativa de *AChE*, *brahma*, *enolase*, *pelle*, *syx1a* y *syx7* en cerebros de abejas recolectoras.

El nivel de expresión relativa del gen *pelle* fue significativamente menor en el muestreo posterior a la aplicación de agroquímicos, en ambas temporadas (Modelo gamma: Expresión relativa ~ muestreo + (1|Colmena); LRT = 5,397; $p = 0,020$; Tabla A5.3). Sin embargo, no se registraron diferencias entre los apiarios ubicados en los distintos lotes (Figura 5.11). Por otro lado, la expresión relativa de *brahma* fue significativamente menor en el muestreo post, solo en el caso del apiario del lote C y en el año 1 (Modelo gamma: Expresión relativa ~ muestreo*lote*año + (1|Colmena); LRT = 6,766; $p = 0,034$; Tabla A5.3), (Figura 5.12). A su vez, la expresión relativa del gen *enolase* (Modelo gamma: Expresión relativa ~ muestreo*año + lote + (1|Colmena)), varió según año y muestreo (LRT = 9,271; $p = 0,002$; Tabla A5.3), siendo significativamente menor en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas, en el caso del año 1 (z.ratio = -3,315; $p = 0,005$; Tabla A5.3), pero no para el año 2 (z.ratio = 0,911; $p = 0,799$; Tabla A5.3). Adicionalmente, la expresión de este gen fue significativamente diferente entre apiarios (LRT = 15,376; $p < 0,001$; Tabla A5.3), siendo menor en el apiario del lote B con respecto al del lote C (z.ratio = 3,909; $p < 0,001$; Tabla A5.3). Sin embargo, el apiario del lote A no difiere de ninguno de los otros dos apiarios (Figura 5.13).

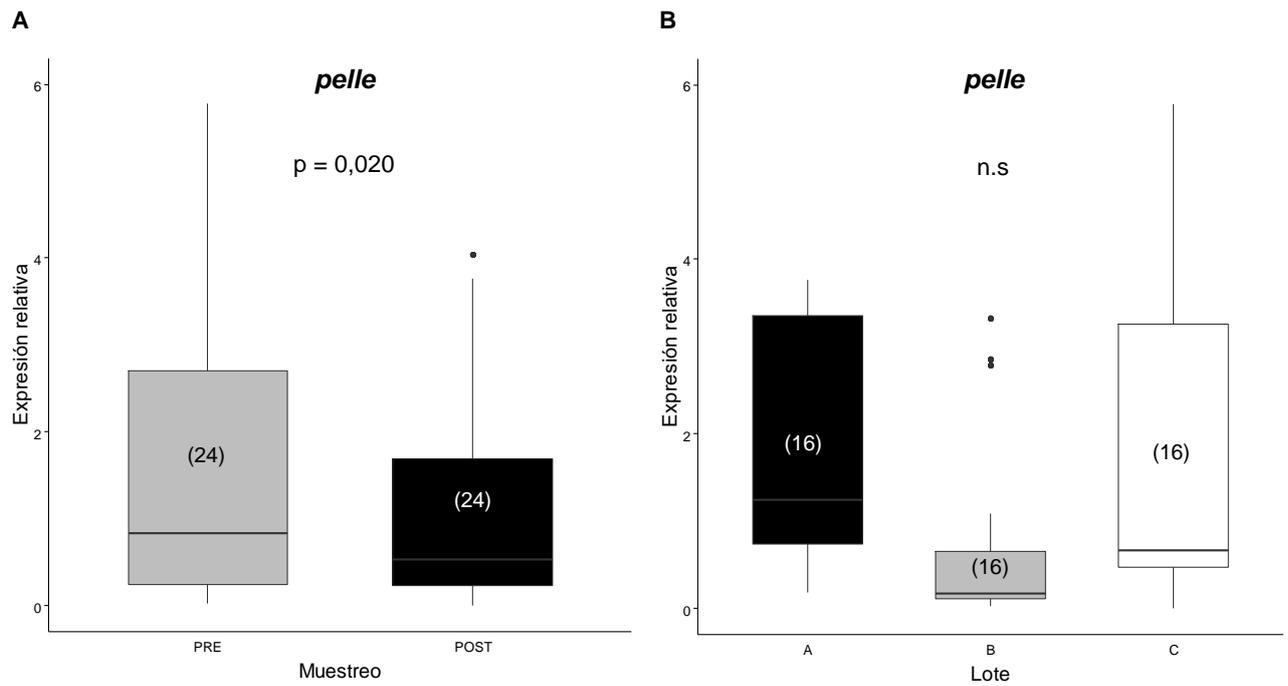


Figura 5.11. Expresión relativa de *pelle* en cerebros de abejas recolectoras. A) Pre y post aplicación de pesticidas, en ambos años. Modelo gamma: Expresión relativa ~ muestreo + (1|Colmena); LRT = 5,397; $p = 0,020$. **B)** En los apiarios de los diferentes lotes, en ambos años (n.s: $p > 0,05$). Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los genes constitutivos *GAPDH* y *Rp49s* fueron utilizados como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de pesticidas, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha administración. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. Los números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

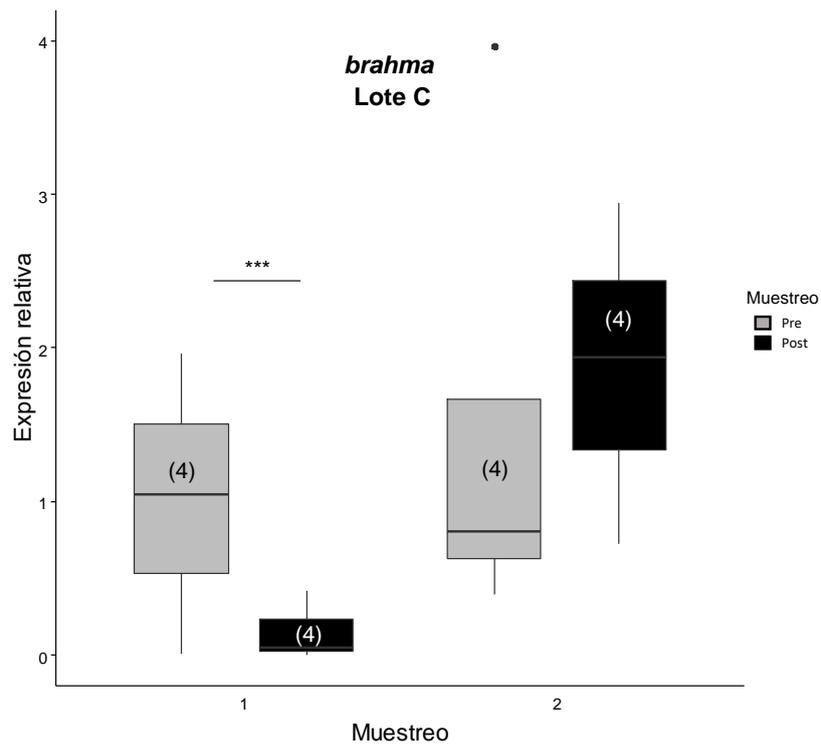


Figura 5.12. Expresión relativa de *brahma* en cerebros de abejas recolectoras, pre y post aplicación de pesticidas, en el lote C y para cada año estudiado. Modelo gamma: Expresión relativa ~ muestreo*lote*año + (1|Colmena); LRT = 6,766; p = 0,034. Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los genes constitutivos *GAPDH* y *Rp49s* fueron utilizados como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de pesticidas, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha administración. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. Asteriscos indican diferencias significativas entre muestreos del año 1 (**p<0,01). Los números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

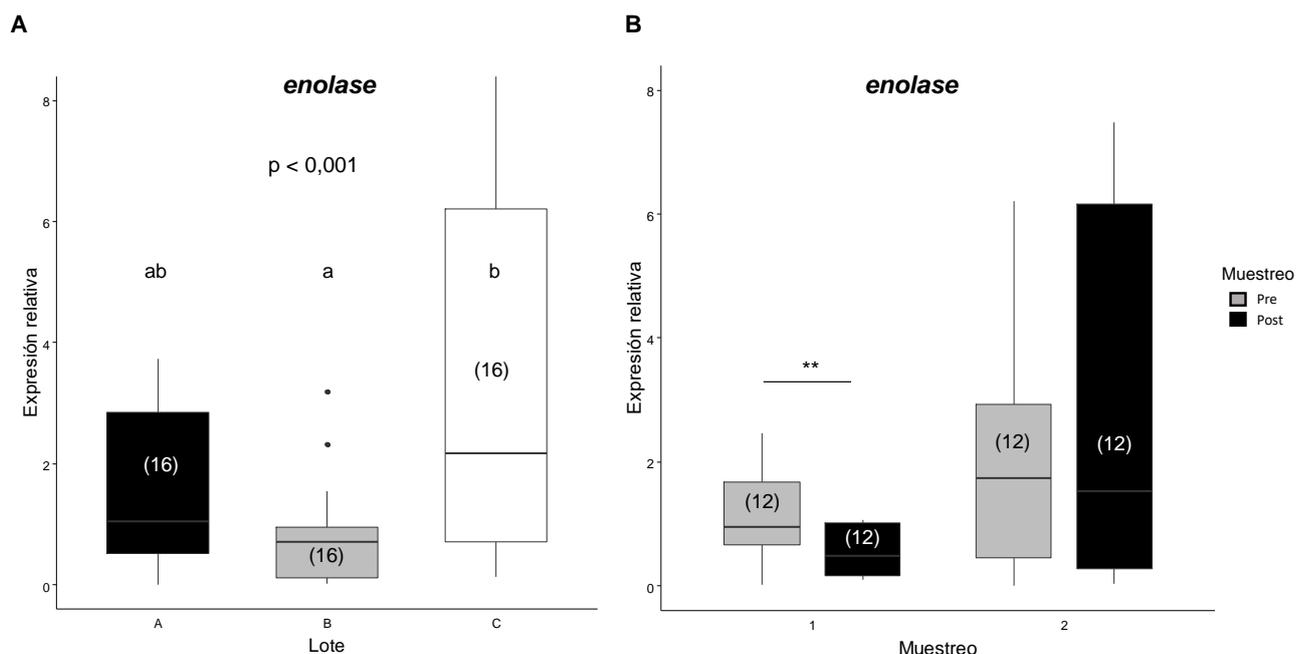


Figura 5.13. Expresión relativa de *enolase* en cerebros de abejas recolectoras. A) En los apiarios de los diferentes lotes, en ambos años. **B)** Pre y post aplicación de pesticidas, en ambos años. Modelo gamma: Expresión relativa ~ muestreo*año + lote + (1|Colmena); LRT = 9,271; p = 0,002. Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los genes constitutivos *GAPDH* y *Rp49s* fueron utilizados como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de pesticidas, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha administración. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. Diferentes letras indican diferencias entre los apiarios de los diferentes lotes (p<0,001). Asteriscos indican diferencias significativas entre muestreos del año 1 (**p<0,01). Los números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

En el caso de la *AChE*, se observó una tendencia en los perfiles de expresión significativamente diferente entre años (Modelo gamma: Expresión relativa ~ muestreo*año + (1|colmena); LRT = 7,841; p = 0,005; Tabla A5.3), (Figura 5.14). La tendencia en el año 1 es a reducir la expresión relativa de *AChE* luego de la aplicación de agroquímicos, de hecho, por poco no es significativa esa disminución (z ratio = -2,450; p = 0,068; Tabla A5.3). Por el contrario, en la temporada 2 la tendencia es a aumentar la expresión relativa de *AChE* luego de la aplicación de herbicidas, aunque ese aumento no es significativo (z ratio = 1,488; p = 0,445; Tabla A5.3). Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre apiarios para ninguna de las temporadas (Tabla A5.3).

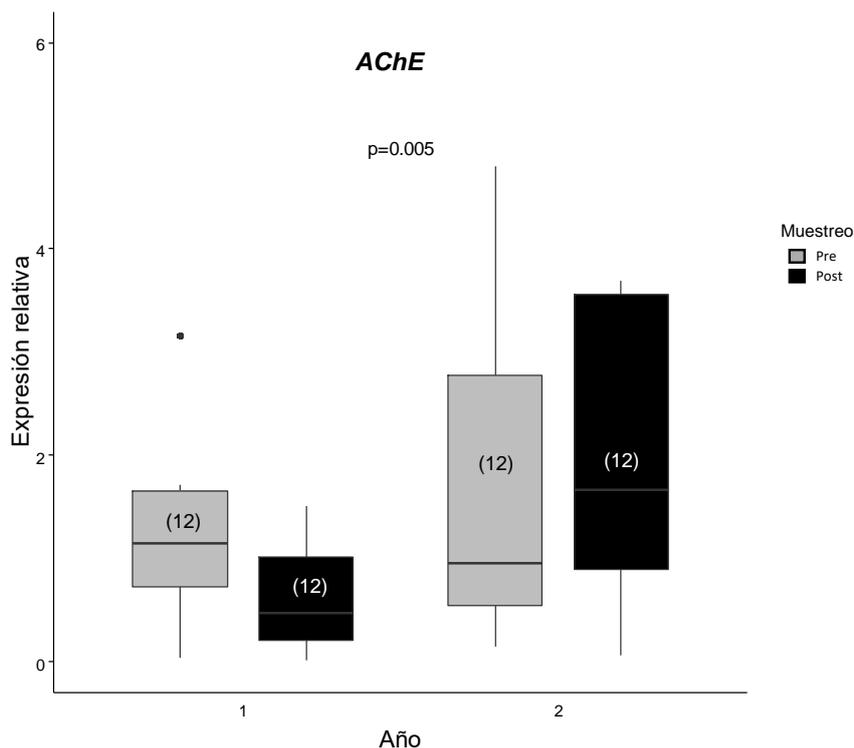


Figura 5.14. Expresión relativa de *AChE* en cerebros de abejas recolectoras, pre y post aplicación de pesticidas y para cada año estudiado. Modelo gamma: Expresión relativa ~ muestreo*año + (1|colmena); LRT = 7,841; p = 0,005. Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los genes constitutivos *GAPDH* y *Rp49s* fueron utilizados como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de pesticidas, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha administración. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. El p valor corresponde a diferencias para la interacción muestreo*año. Los números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

Por último, la expresión relativa de los genes *syx1a* (Figura 5.15) y *syx7* (Figura 5.16) no difirió significativamente ni entre muestreos ni entre lotes para ninguna de las temporadas (Tabla A5.3).

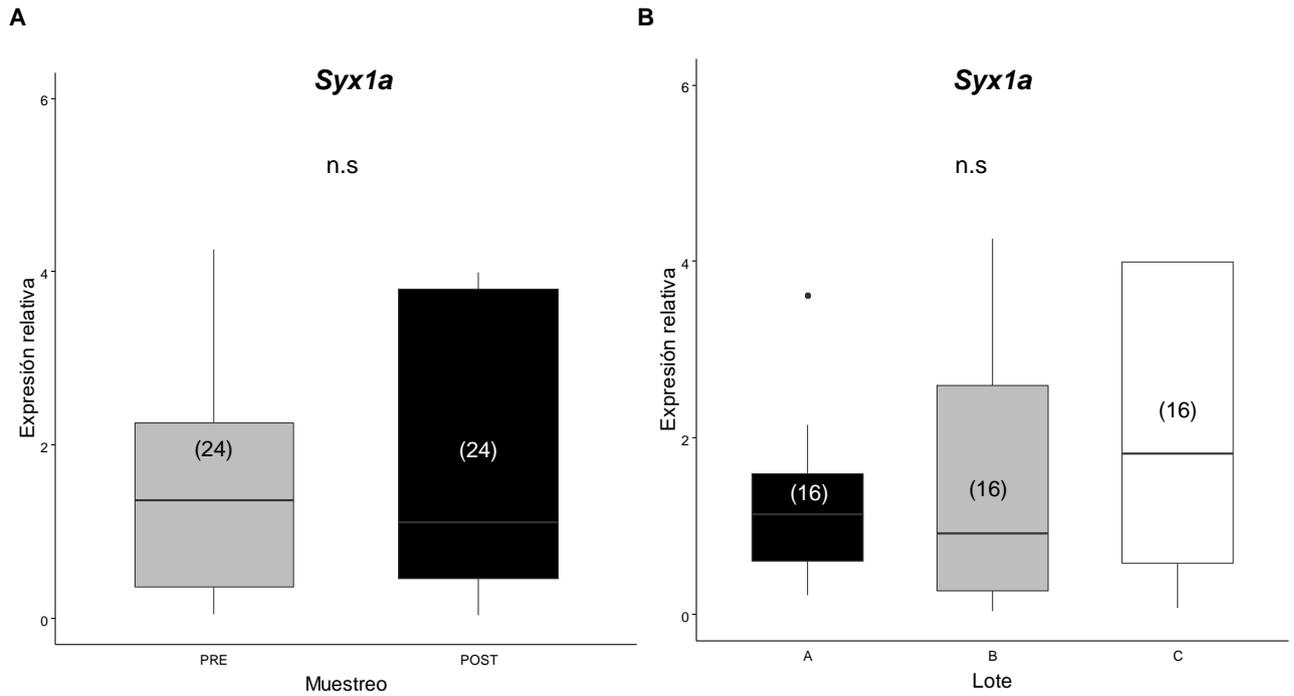


Figura 5.15. Expresión relativa de *syx1a* en cerebros de abejas recolectoras. A) Pre y post aplicación de pesticidas, en ambos años. (n.s: $p > 0,05$). **B)** En los apiarios de los diferentes lotes, en ambos años (n.s: $p > 0,05$). Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los genes constitutivos *GAPDH* y *Rp49s* fueron utilizados como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de pesticidas, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha administración. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. Los números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

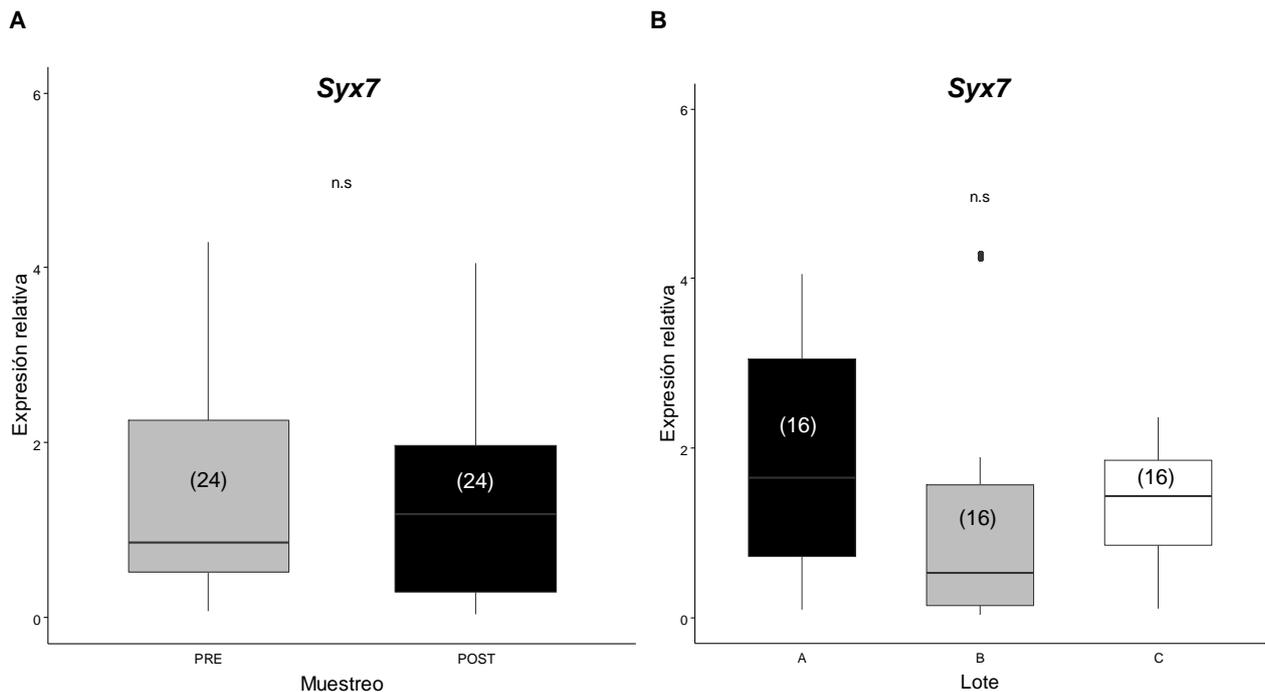


Figura 5.16. Expresión relativa de *syx7* en cerebros de abejas recolectoras. A) Pre y post aplicación de pesticidas, en ambos años (n.s: $p > 0,05$). **B)** En los apiarios de los diferentes lotes, en ambos años (n.s: $p > 0,05$). Análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes biomarcadores de exposición, evaluado mediante qPCR, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los genes constitutivos *GAPDH* y *Rp49s* fueron utilizados como control endógeno y las muestras del primer muestreo, previo a la aplicación de pesticidas, fueron tomados como control para comparar cuanto difiere la expresión relativa de los genes de interés, luego de dicha administración. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. Los números entre paréntesis indican el tamaño muestral para cada variable.

5.3.2 Abordaje ecotoxicológico: Análisis de pesticidas en muestras de polen y abejas recolectoras

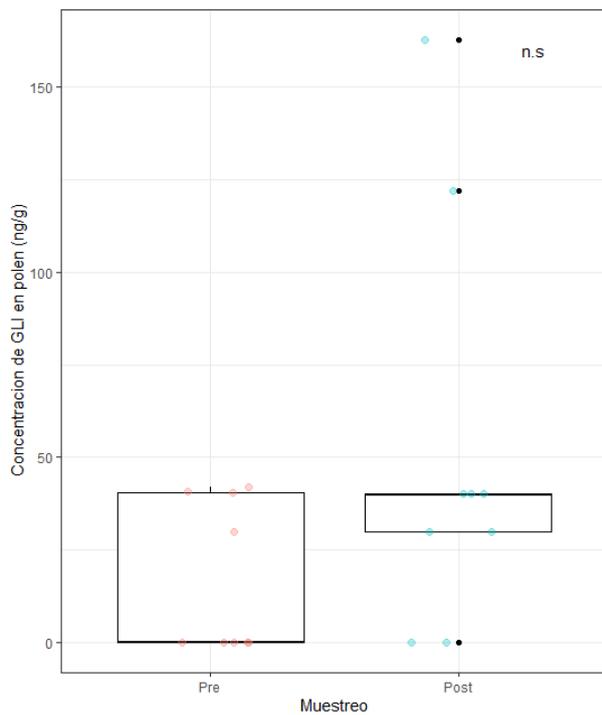
En cuanto al análisis de pesticidas, se evaluó la presencia de trazas en abejas capturadas en piquera y en el polen colectado en trampas. Se realizó un análisis independiente para cada año, dado que no se administraron los mismos pesticidas en cada una de las temporadas. Adicionalmente, se comparó la presencia de GLI en ambas temporadas, debido a que fue el único compuesto común a la aplicación de ambos años.

En el caso del año 1, donde se aplicó un herbicida con GLI como principal compuesto activo, más un insecticida con una mezcla de LC y CLOR y otro con MF, se registró la presencia de GLI tanto en muestras colectadas en el muestreo pre-aplicación de agroquímicos, como en el muestreo post (Tabla 5.3; Figura 5.17). La concentración de este compuesto fue mayor en las muestras de polen del muestreo posterior a la aplicación del herbicida, pero esta diferencia no fue significativa (Prueba de Wilcoxon; $V = 14$; $p = 0,359$; Tabla A5.4). Por otro lado, se registró una concentración mayor a la permitida por la Unión Europea (50 ng/g), en dos de las muestras colectadas en el muestreo post, ambas en el apiario del lote B (Tabla A5.4). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre apiarios (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 1,333$; $p = 0,513$; Tabla A5.4). Adicionalmente, se midió la presencia de AMPA, principal metabolito de la degradación del GLI. Sin embargo, no fue detectable su presencia en ninguna de las muestras de polen analizadas.

Tabla 5.3. Concentración de GLI encontrada en las muestras de polen del año 1. En negrita se indica las concentraciones mayores a los máximos permitidos por la Unión Europea (50ng/g). ND corresponde a valores por debajo del LD = 20 ng/g y MLC corresponde a valores por debajo del LC = 40 ng/g.

GLI en polen			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
1	Lote A	Pre	ND
2	Lote A	Pre	ND
3	Lote A	Pre	40
1	Lote A	Post	MLC
2	Lote A	Post	MLC
3	Lote A	Post	MLC
4	Lote B	Pre	ND
5	Lote B	Pre	ND
6	Lote B	Pre	40
4	Lote B	Post	162,859
5	Lote B	Post	121,920
6	Lote B	Post	MLC
7	Lote C	Pre	ND
8	Lote C	Pre	MLC
9	Lote C	Pre	40
7	Lote C	Post	40
8	Lote C	Post	ND
9	Lote C	Post	ND

A



B

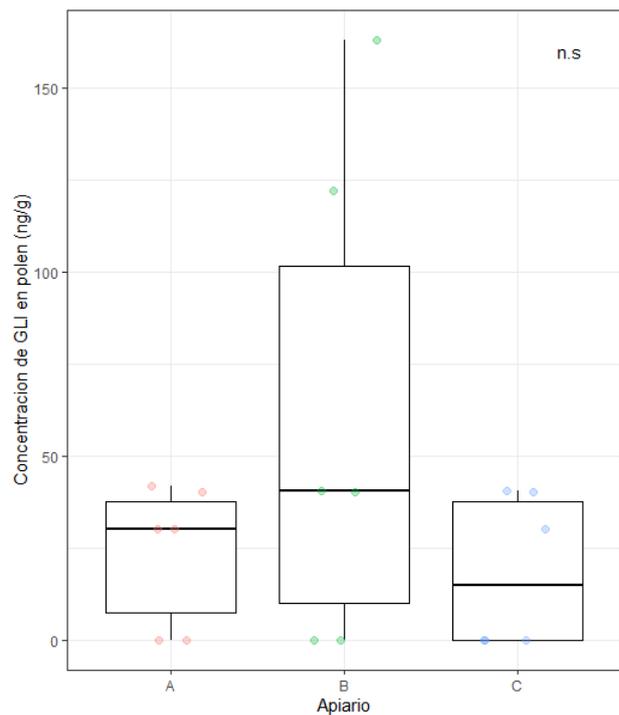


Figura 5.17. Concentración de GLI en polen en el año 1. A) Pre y post aplicación de pesticidas (Prueba de Wilcoxon; $V = 14$; n.s: $p > 0,05$; $N=9$). **B)** En los apiarios de los diferentes lotes (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 1,333$; n.s: $p > 0,05$; $N=6$). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango.

Con respecto a la presencia de insecticidas en polen, no fue detectable la presencia de MF Y LC, mientras que si se encontraron residuos de CLOR (Tabla 5.4). La concentración de este compuesto activo fue mayor en las muestras colectadas luego de la administración de pesticidas (Figura 5.18). Sin embargo, esta diferencia no llega a ser significativa (Prueba de Wilcoxon; $V = 1$; $p = 0,068$; Tabla A5.4). A su vez, si bien la concentración de CLOR fue menor en las muestras de polen del apiario del lote A, esa diferencia tampoco llega a ser significativa (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 1,273$; $p = 0,529$; Tabla A5.4).

Tabla 5.4. Concentración de CLOR encontrada en las muestras de polen del año 1. ND corresponde a valores por debajo del LD = 2 ng/g.

CLOR en polen			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
1	Lote A	Pre	ND
2	Lote A	Pre	ND
3	Lote A	Pre	ND
1	Lote A	Post	11,4
2	Lote A	Post	ND
3	Lote A	Post	ND
4	Lote B	Pre	ND
5	Lote B	Pre	ND
6	Lote B	Pre	ND
4	Lote B	Post	20,1
5	Lote B	Post	19,2
6	Lote B	Post	ND
7	Lote C	Pre	11,4
8	Lote C	Pre	ND
9	Lote C	Pre	ND
7	Lote C	Post	20,1
8	Lote C	Post	ND
9	Lote C	Post	ND

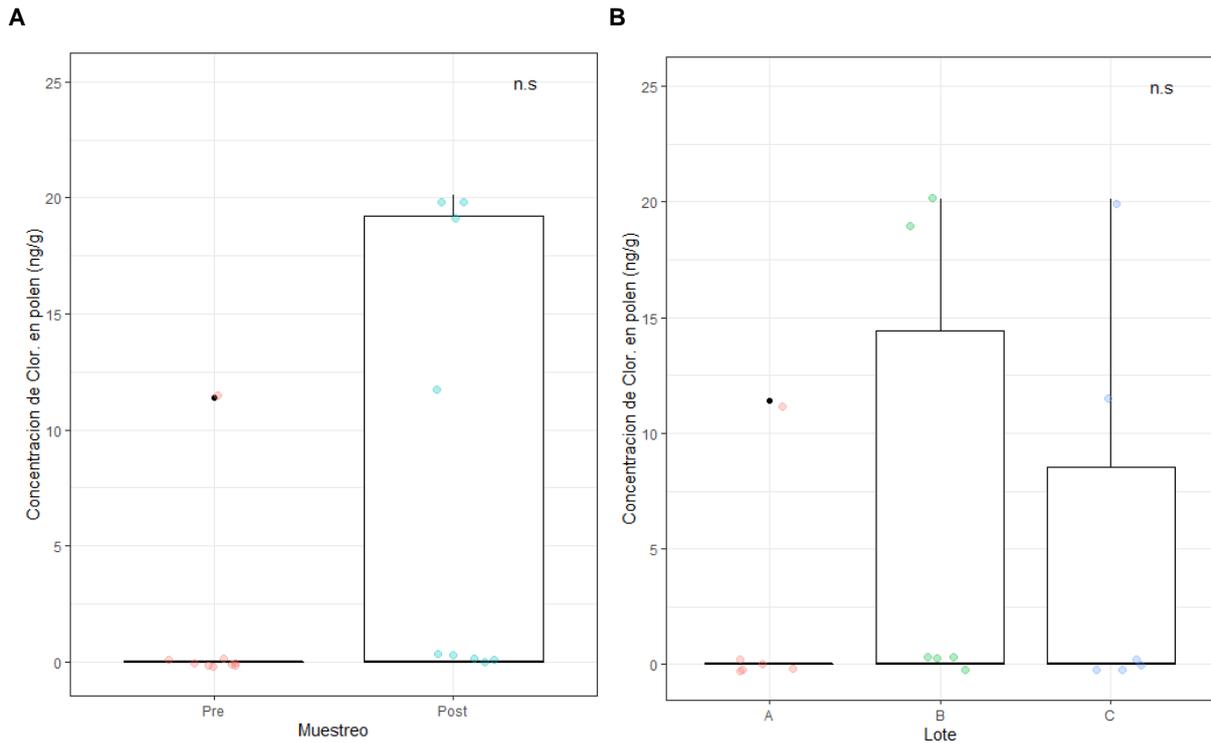


Figura 5.18. Concentración de CLOR en polen en el año 1. A) Pre y post aplicación de pesticidas (Prueba de Wilcoxon; $V = 1$; n.s.: $p > 0,05$; $N=9$). **B)** En los apiarios de los diferentes lotes (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 1,273$; n.s.: $p > 0,05$; $N=6$). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango.

Para finalizar, se registró la presencia CLOR en las muestras de abejas recolectoras, en ambos muestreos (Tabla 5.5). Este análisis es meramente descriptivo, sin relevancia estadística, dado que se procesó un pool de abejas de cada apiario, ya que no pudimos llegar al peso mínimo de muestra necesaria para seguir el protocolo como para hacer un análisis por colmena. Pero evidencian el contacto de las abejas recolectoras con los pesticidas aplicados. Sin embargo, la presencia de GLI en estas muestras no fue detectable.

Tabla 5.5. Concentración de CLOR encontrada en las muestras de cuerpos de abejas recolectoras del año 1. En negrita se indica las concentraciones mayores a los máximos permitidos por la Unión Europea (50ng/g). ND corresponde a valores por debajo del LD = 2 ng/g.

CLOR en abejas recolectoras			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
Pool	Lote A	Pre	6,0
Pool	Lote B	Pre	11,8
Pool	Lote C	Pre	ND
Pool	Lote A	Post	62,3
Pool	Lote B	Post	6,3
Pool	Lote C	Post	ND

En el caso del año 2, se aplicaron diferentes herbicidas, según el cultivo presente en cada lote, entre un muestreo y otro. Solo el GLI fue detectable, el cual se aplicó en los lotes con presencia de soja GM y maíz (ver mapas de la Figura 5.2). En esta temporada no se administraron insecticidas durante el periodo estudiado.

Se registró la presencia de GLI en las muestras obtenidas en ambas campañas, tanto pre como post aplicación de herbicidas (Tabla 5.7). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas entre muestreos (Figura 5.19; Prueba de Wilcoxon; $V = 27$; $p = 0,594$; Tabla A5.5). A su vez, la concentración de GLI difirió entre apiarios (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 7$; $p = 0,030$; Tabla A5.5), siendo significativamente mayor n el polen colectado en las colonias de los apiarios ubicados en los lotes B y C, en comparación al apiario del lote A (Prueba de Conover; $p = 0,003$ y $p = 0,024$; respectivamente Tabla A5.5), (Figura 5.19). Por otro lado, no fue detectable la presencia de AMPA en ninguna de las muestras de polen analizadas.

Tabla 5.6. Concentración de GLI encontrada en las muestras de polen del año 2. En negrita se indica las concentraciones mayores a los máximos permitidos por la Unión Europea (50ng/g). ND corresponde a valores por debajo del LD = 20 ng/g y MLC corresponde a valores por debajo del LC = 40 ng/g.

GLI en polen			
Colmena	Apiario	Muestreo	Concentración encontrada
1	Lote A	Pre	40,331
2	Lote A	Pre	MLC
3	Lote A	Pre	ND
1	Lote A	Post	MLC
2	Lote A	Post	MLC
3	Lote A	Post	MLC
4	Lote B	Pre	68,198
5	Lote B	Pre	47,3
6	Lote B	Pre	40,8
4	Lote B	Post	40
5	Lote B	Post	40
6	Lote B	Post	MLC
7	Lote C	Pre	46,378
8	Lote C	Pre	46,611
9	Lote C	Pre	MLC
7	Lote C	Post	56,91
8	Lote C	Post	ND
9	Lote C	Post	50,921

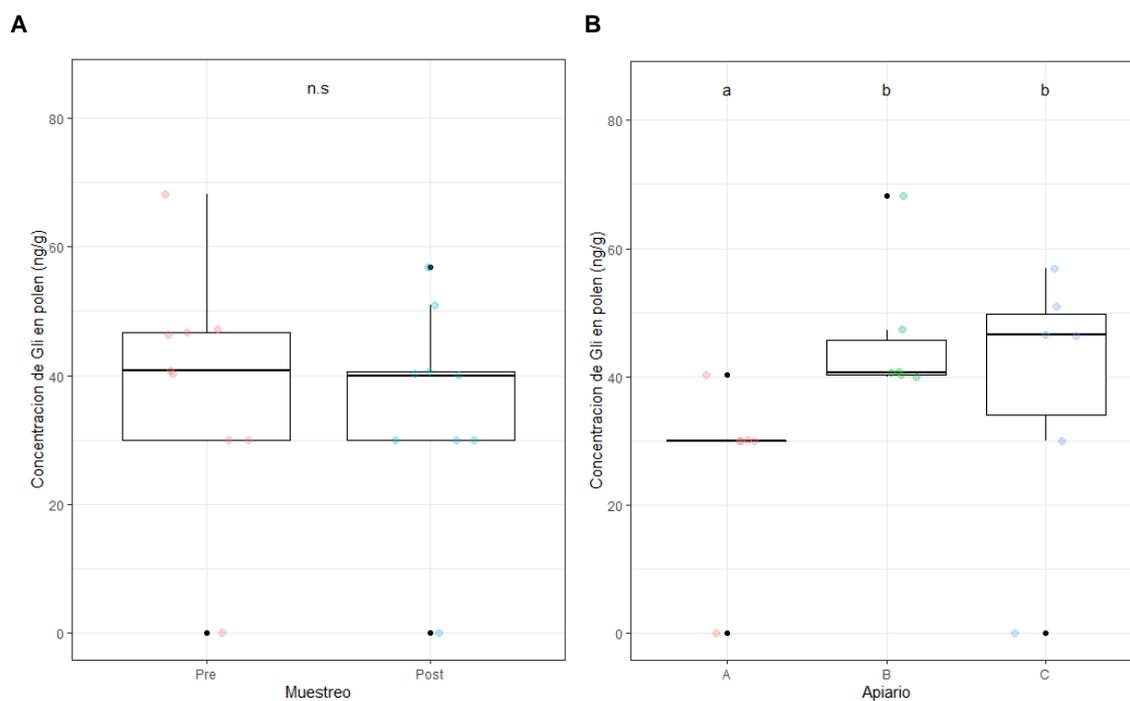


Figura 5.19. Concentración de GLI en polen en el año 2. A) Pre y post aplicación de pesticidas (Prueba de Wilcoxon; $V = 27$; $p = 0,594$; $N = 9$). **B)** En los apiarios de los diferentes lotes (Prueba de Friedman; $\chi^2 = 7$; $p = 0,030$; $N = 6$). Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil (RIQ), las líneas verticales indican el máximo valor dentro del RIQ 1.5 y los puntos marcan los valores fuera de este rango. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los apiarios de los distintos lotes ($p < 0,05$), ns: $p > 0,05$.

Para finalizar, no fue detectable la presencia de GLI en ninguna de las muestras de abejas recolectoras. En relación al análisis conjunto de la presencia de GLI en polen, si bien la concentración fue mayor en el año 2, esta diferencia no llegó a ser significativa (Prueba de Wilcoxon; $V = 74$; $p = 0,616$; Figura 5.21).

para cada temporada individual, dado que en cada año fue diferente la administración de pesticidas. Para cada temporada se sumó, también, un ACP individual.

Teniendo en cuenta los resultados globales de ambas temporadas, el análisis de correlación entre variables, utilizando el coeficiente de Spearman para datos cuyos residuos no siguen una distribución normal, reveló una correlación positiva y significativa entre las variables de recolección de recursos florales y la expresión relativa de varios genes relacionados a la sociabilidad en abejas (Tabla 5.9). La tasa de recolección total en piquera mostró una correlación significativa con la expresión relativa de los genes *AChE* (Rho = 0,639; $p < 0,001$), *brahma* (Rho = 0,639; $p = 0,009$), *enolase* (Rho = 0,490; $p = 0,015$) y *pelle* (Rho = 0,762; $p < 0,001$). A su vez, la expresión relativa de *brahma* y *pelle* correlacionó positiva y significativamente con la tasa de recolección de polen (Rho = 0,448; $p = 0,028$ y Rho = 0,670; $p < 0,001$; respectivamente). Sin embargo, no se observaron correlaciones significativas entre los residuos de GLI en polen y la expresión relativa de estos genes (Tabla A5.6).

Tabla 5.9. Correlación entre las variables de recolección en piquera y la expresión relativa de los genes estudiados, luego de la aplicación de pesticidas en ambos años. Valores Rho, S y p obtenidos a través de la prueba de correlación de Spearman.

VARIABLES CORRELACIONADAS	RHO	S	P VALOR
Tasa de ingresos totales - <i>AChE</i>	0,639	830,68	0,001
Tasa de ingresos totales - <i>brahma</i>	0,516	1112,7	0,009
Tasa de ingresos totales - <i>enolase</i>	0,490	1172,5	0,015
Tasa de ingresos totales - <i>pelle</i>	0,762	546,62	0,001
Tasa de ingresos totales - <i>syx1a</i>	0,102	2064,9	0,635
Tasa de ingresos totales - <i>syx7</i>	0,367	1456,8	0,078
Tasa de ingresos con polen - <i>AChE</i>	0,371	1445,8	0,074
Tasa de ingresos con polen - <i>brahma</i>	0,448	1269,8	0,028
Tasa de ingresos con polen - <i>enolase</i>	0,434	1302,6	0,034
Tasa de ingresos con polen - <i>pelle</i>	0,670	759,67	0,001
Tasa de ingresos con polen - <i>syx1a</i>	0,201	1836,9	0,345
Tasa de ingresos con polen - <i>syx7</i>	0,420	1333,8	0,041

Pasando al ACP global, teniendo en cuenta ambas temporadas estudiadas y en el muestreo posterior a la administración de pesticidas, encontramos que los primeros tres componentes principales explican el 66,4% de la proporción de variabilidad acumulada (Tabla A5.7). La expresión relativa de los genes *pelle*, *brahma* y *AChE* son los que mejor explican el primer componente principal (CP1), mientras que la expresión relativa de *syx7* y la concentración de GLI en polen son las variables que mejor explica el segundo componente principal (CP2). A su vez, *enolase* y *syx1a* son los genes

que mejor explica el tercer componente principal (CP3), (Tabla A5.8). La dimensión limitada por los CP1 y CP2 discrimina las observaciones individuales del apiario del lote B (triángulos) de ambos años, quedando concentradas en el sector negativo de ambos componentes. Estos dos componentes principales absorben el 33,37% y el 17,50% de la variabilidad, respectivamente (Figura 5.22). De esta manera, la discriminación de las colonias del lote B con respecto a las de los lotes A (círculos) y C (cuadrados), queda explicada por una mayor concentración de GLI en polen y una menor expresión de los genes *pelle*, *brahma* y *AChE*.

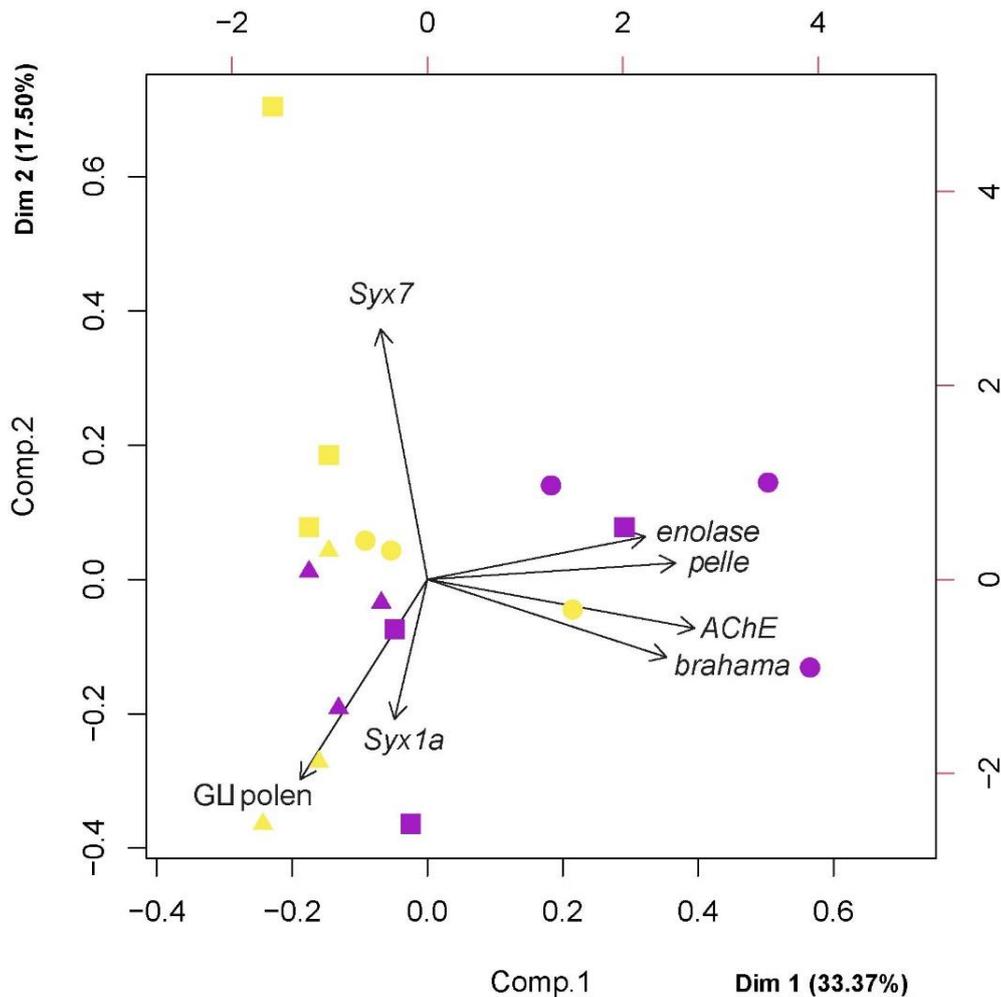


Figura 5.22. Análisis de componentes principales (ACP) del perfil de expresión génica en cerebros de abejas recolectoras y la presencia de GLI en polen, en el muestreo posterior a la aplicación de agroquímicos, para ambos años. Mapa de observaciones individuales de las colonias estudiadas. Las variables están expresadas en los Comp. 1 y 2 (ver Tabla A5.8). El mapa de observaciones individuales muestra la diferenciación del apiario del lote B (triángulos) con respecto a los apiarios de los lotes A (círculos) y C (cuadrados). Los CP1 y CP2 explican el 33,37% y el 17,5% de la variabilidad, respectivamente. Las figuras en color amarillo corresponden al año 1 y las figuras de color violeta corresponden al año 2.

Analizando las temporadas de manera individual, no se registraron correlaciones significativas entre los residuos de pesticidas en polen y la expresión relativa de los genes estudiados, para ninguna de las temporadas (Tabla A5.9 y Tabla A5.10). Por otro lado, el ACP del año 1 explica el 99,02% de la proporción de variabilidad acumulada (Tabla A5.11). La concentración de residuos de agroquímicos en polen son las variables que más peso tienen sobre el CP1 (GLI) y el CP2 (CLOR), mientras que la expresión relativa de *syx7* es la variable que mejor explica el CP3 (Tabla A5.12). En este caso, no se observa una discriminación clara ni entre lotes ni entre momentos, para la dimensión limitada por los CP1 y CP2. Estos dos componentes principales absorben el 95,01% y el 2,4% de la variabilidad, respectivamente (Figura 5.23).

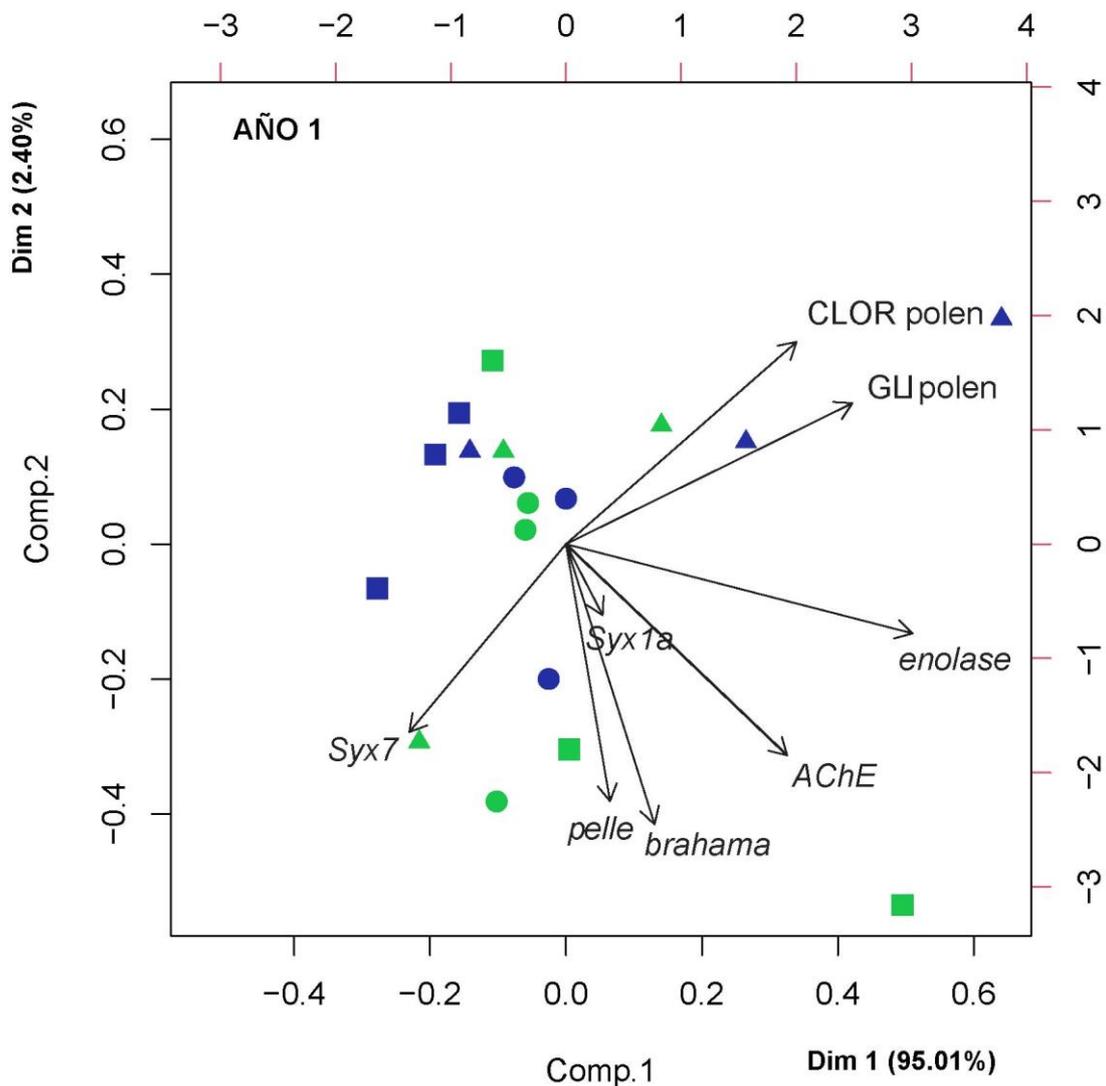


Figura 5.23. Análisis de componentes principales (ACP) del perfil de expresión génica en cerebros de abejas recolectoras y la presencia de pesticidas en polen, en el año 1. Mapa de observaciones individuales de las colonias estudiadas. Las variables están expresadas en los Comp. 1 y 2 (ver Tabla A5.12). El mapa de observaciones individuales no muestra una diferenciación clara ni entre lotes (formas geométricas) ni entre momentos (colores). Los CP1 y CP2 explican el 95,01% y el 2,4% de la variabilidad, respectivamente.

En el caso del año 2, encontramos que los primeros tres componentes principales explican el 82,8% de la proporción de variabilidad acumulada (Tabla A5.13). La expresión relativa de los genes *pelle*, *enolase* y *AChE* son los que mejor explican el primer componente principal (CP1), mientras que la expresión relativa de *syx1a* y la concentración de GLI en polen son las variables que mejor explica el segundo componente principal (CP2). A su vez, *brahma* es el gen que mejor explica el tercer componente principal (CP3), (Tabla A5.14). La dimensión limitada por los CP1 y CP2 discrimina nuevamente las observaciones individuales del apiario del lote B (triángulos), quedando concentradas en el lado positivo del CP1. Estos dos componentes principales absorben el 47,80% y el 19,40% de la variabilidad, respectivamente (Figura 5.24). De esta manera, la discriminación de las colonias del lote B con respecto a las de los lotes A (círculos) y C (cuadrados), queda explicada por una menor expresión de los genes *pelle*, *enolase* y *AChE*.

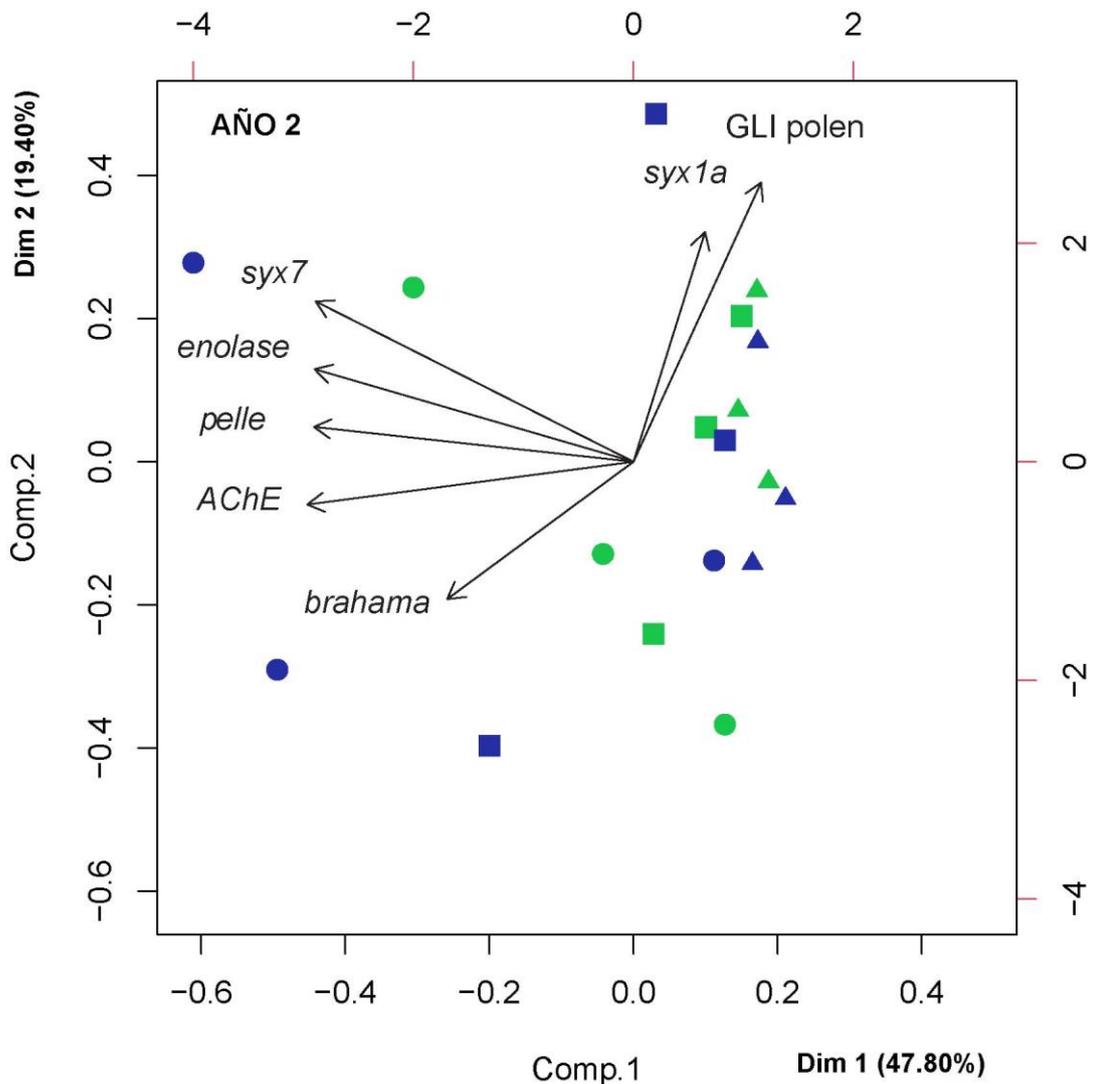


Figura 5.24. Análisis de componentes principales (ACP) del perfil de expresión génica en cerebros de abejas recolectoras y la presencia de GLI en polen, en el año 2. Mapa de observaciones individuales de las colonias estudiadas. Las variables están expresadas en los Comp. 1 y 2 (ver Tabla A5.14). El mapa de observaciones individuales muestra la diferenciación del apiario del lote B (triángulos) con respecto a los apiarios de los lotes A (círculos) y C (cuadrados). Los CP1 y CP2 explican el 47,80% y el 19,4% de la variabilidad, respectivamente. Las figuras en color verde corresponden al muestre pre y las figuras de color azul corresponden al muestreo posterior a la aplicación de pesticidas.

5.4 Discusión

Los resultados obtenidos muestran que, efectivamente, residuos de los pesticidas administrados en los cultivos aledaños a los diferentes apiarios están ingresando a las colonias a través del polen recolectado y en el cuerpo de las abejas recolectoras. Adicionalmente, se registró una disminución en las capacidades cognitivas de las abejas recolectoras luego de la aplicación de pesticidas, en todos los apiarios y en ambos años, tanto de la sensibilidad gustativa como de la asociación olor-recompensa. Asimismo, esta reducción es mayor en el caso de las colonias ubicadas en el lote A, donde se observa la menor proporción de flora silvestre dentro del área de forrajeo establecida. Por otro lado, la actividad recolectora también fue menor en dichas colonias. A su vez, se observó una disminución en la expresión relativa de varios de los genes estudiados, relacionados a procesos metabólicos y neuronales que conforman las bases genéticas de la sociabilidad en abejas, luego de la exposición a pesticidas. Además, los perfiles de expresión en el muestreo posterior a la aplicación de agroquímicos y en ambos años, correlacionaron positivamente con las variables de actividad recolectora. Sin embargo, estos perfiles de expresión no correlacionaron con las concentraciones de pesticidas encontradas en el polen colectado en trampas. En el caso del análisis de componentes principales global, para ambos años, observamos una discriminación de las observaciones individuales del apiario del lote B, dado por una menor expresión génica relativa y una mayor concentración de GLI en polen, en el muestreo posterior a la administración de agroquímicos.

Se encontraron residuos de herbicidas en polen en ambos años, tanto en el muestreo pre como en el muestreo posterior a la administración de los mismos. Se registraron trazas de GLI en altas concentraciones, mayores a las admitidas por la Unión Europea. Sin embargo, estas concentraciones no fueron significativamente diferentes entre muestreos, en ninguno de los años estudiados. La concentración de GLI en polen también fue alta en los muestreos pre aplicación. Este herbicida es frecuentemente utilizado en las aplicaciones de pre emergencia o de barbecho químico. Su presencia en el polen del muestreo previo a la aplicación de post-emergencia, donde solo estaba disponible la floración silvestre, sugeriría una deriva hacia la flora no cultivo circundante. De esta forma, habría llegado al polen de estas plantas que sí estaban en floración cuando los cultivos aún no habían germinado o se presentaban en estado vegetativo. El GLI es bastante persistente en el ambiente, habiendo evidencias de que puede permanecer en agua y suelos por más de un mes (Bento et al., 2016). El polen que ingresa en la colmena es consumido por las larvas de la casta obrera en forma

de pan de abeja (Herbert, 1992; Zhu et al., 2017) y por las abejas nodrizas, quienes requieren grandes cantidades de proteína para el desarrollo de sus glándulas mandibulares e hipofaríngeas, así como también, para producir el alimento de las larvas (Rortais et al., 2005). De esta forma, el polen contaminado llega tanto a las abejas jóvenes que desempeñan tareas de cuidado de la cría en el interior de la colmena, como a las larvas que éstas alimentan. También se encontraron trazas de CLOR en los cuerpos de abejas recolectoras, de manera que hay, efectivamente, una exposición por contacto a estos pesticidas por parte de este grupo de obreras. Así, se evidencia que dicha exposición se produce en todos los estadios de desarrollo de la abeja melífera, ya sea por contacto o por ingesta.

Como se mencionó en secciones anteriores de la tesis, el aprendizaje asociativo se produce cuando una abeja vincula una conexión única y específica entre un estímulo neutro, como un determinado olor floral, y una recompensa, como el néctar, y refuerza esta asociación a lo largo de diferentes eventos de búsqueda de alimento (Galizia et al., 2012; Menzel, 2012; Sandoz y Giurfa, 2012). Esta capacidad de asociar un olor floral a la recompensa de azúcar, por parte de las abejas recolectoras, se vio afectada luego de la aplicación de pesticidas, en los dos años estudiados. A su vez, las abejas evaluadas tras la administración de pesticidas mostraron un proceso de extinción más rápido de estas asociaciones, lo que implica una disminución de la retención de la memoria a corto plazo. El aprendizaje y la memoria son esenciales para las abejas (von Frisch, 1967). Sólo el comportamiento de búsqueda de alimento depende en gran medida de estos procesos. Identificar una fuente de alimento y volver a ella tras sucesivos vuelos de ida y vuelta a la colmena depende de la asociación de un recurso, como el néctar o el polen, a ciertas señales florales como el olor, el color, la calidad o la productividad (Chittka y Thomson, 1999). En este sentido, los resultados muestran una reducción en la sensibilidad gustativa por parte de las abejas recolectoras, afectando la capacidad de detectar las concentraciones más bajas de azúcar en el néctar, por un lado, y la concentración más alta, por el otro. Identificar los recursos florales más beneficiosos y recordar la asociación entre las claves florales y la recompensa en néctar o polen, permite a las abejas melíferas volver a alimentarse de un recurso, aunque se encuentre en diferentes parches florales o a lo largo de diferentes eventos de floración (Farina et al., 2019). De este modo, dicho deterioro de las capacidades cognitivas podría afectar la eficiencia de forrajeo y la coordinación en la colmena de las actividades colectivas. En estudios previos, en condiciones controladas de laboratorio, el GLI afectó negativamente los procesos de aprendizaje asociativo de las abejas pecoreadoras y las capacidades cognitivas y sensoriales de las abejas jóvenes que desarrollan tareas en el interior de la colmena (Herbert et al., 2014; Balbuena et al., 2015; Mengoni Goñalons y Farina, 2018). Además, la exposición a corto plazo a LC en abejas obreras afectó al rendimiento del aprendizaje y la memoria y redujo la capacidad de orientarse en los vuelos de retorno a la colmena (Liao et al., 2018). Asimismo, la exposición a LC afectó la reproducción y al comportamiento de búsqueda de alimento de *Bombus terrestris* (Ceuppens et al., 2015). Estos resultados fueron más pronunciados en el apiario del lote A, en comparación a los de los lotes B y C. Este lote es el que contaba con menor proporción de flora silvestre en su entorno. Como ya se ha establecido en las situaciones de campo anteriores,

los hábitats naturales o semi-naturales podrían actuar como estabilizadores al proporcionar áreas de forrajeo menos disturbadas para las abejas, lo que podría ayudar a mantener la biodiversidad general al amortiguar la variación temporal de los recursos (Ricketts et al., 2008).

En relación a la actividad recolectora, no se registraron diferencias significativas entre muestreos, excepto en el caso de la tasa de recolección total en el segundo año estudiado, la cual fue mayor en el muestro posterior a la aplicación de pesticidas. La misma tendencia se observó en el caso del peso total de polen colectado en trampas. Esto puede deberse a la presencia de un cultivo de girasol en el entorno durante ese año, que no estuvo presente en el año 1 y cuyas flores estuvieron disponibles solo en el segundo muestreo de esa temporada. El néctar de girasol es muy atractivo para las abejas melíferas, siendo sus flores muy visitadas por ellas (Rortairs et al., 2005). Por otro lado, tanto la recolección total como la recolección de polen fue significativamente menor en el apiario ubicado en lote B, en ambos años. A su vez, el índice de variabilidad de polen fue significativamente menor después de la aplicación de pesticidas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los apiarios de los diferentes lotes para esta variable. Esto podría indicar que, aunque no hubo una disminución de la cantidad de polen recolectado, sí hubo una reducción de la variabilidad de las fuentes florales tras la administración de herbicidas, independientemente del entorno de las colonias. De esta forma, se podría potenciar la actividad de los polinizadores, al proporcionar recursos florales apropiados y diversos en el entorno de las colmenas, que abarquen diferentes temporalidades de floración, durante la temporada de mayor actividad de las colonias (Klein et al., 2007).

Con respecto a la expresión relativa de los genes relacionados a las bases genéticas de la sociabilidad en abejas, el análisis estadístico reveló una disminución significativa en los niveles de expresión de *pelle* en los cerebros de abejas recolectoras, luego de la aplicación de pesticidas, en los dos años estudiados. Además, el perfil de expresión fue menor en las colonias ubicadas en el lote B, comparadas con aquellas de los lotes A y C. A su vez, la expresión relativa de *AChE*, *brahma* y *enolase* fue significativamente menor luego de la aplicación de agroquímicos, solo en el año 1. Esto podría indicar que los efectos subletales sobre el perfil de expresión de los cerebros de abejas recolectoras fueron más pronunciados cuando se aplicaron tanto herbicidas como insecticidas. La *AChE*, está presente en el cerebro, y se ha demostrado que su alteración afecta directamente al aprendizaje y la memoria olfativos (Kreissl y Bicker, 1989; Gauthier et al., 1992), tal como se vio que ocurrió en los resultados de los ensayos comportamentales que se realizaron *in situ*. A su vez, su actividad se vio afectada por la exposición a ATZ, GLI y diferentes clases de insecticidas (Boily et al., 2013; Verena y Fent, 2017; Fellows et al., 2022). Por otro lado, un creciente número de trabajos ha identificado genes sometidos a selección en linajes sociales de abejas (Woodard et al., 2011; Harpur et al., 2014; Kapheim et al., 2015). Adicionalmente, Jones y colaboradores (2018), encontraron un solapamiento significativo en los tipos de vías metabólicas y la función de los genes asociados con la evolución convergente de las castas, sugiriendo que los fenotipos de comportamiento social, convergentes entre linajes, son el producto de la evolución de los mismos mecanismos moleculares a nivel de vías metabólicas y redes génicas (Jones et al., 2018). En este sentido, se encontró que

genes asociados con vías metabólicas como la glucólisis, mostraron una selección positiva en múltiples linajes sociales de abejas (Woodard et al., 2011). Dentro de los genes involucrados en la evolución acelerada de los linajes altamente eusociales, están *pelle* y *enolase* (Woodard et al., 2011). Por un lado, *pelle* es una proteína serina/treolina quinasa, asociada a la respuesta inmune, siendo parte de las vías de señalización Toll (Brutscher et al., 2015). Como se mencionó previamente, la expresión relativa de *pelle* mostró una disminución significativa luego de la aplicación de pesticidas, en ambos años. El perfil de expresión de este gen también correlacionó positiva y significativamente con las tasas de recolección total y de polen y fue una de las variables que mejor explicó el agrupamiento de las observaciones individuales del lote B en el ACP global. Por otro lado, *enolase* es una enzima de las vías metabólicas de la glucólisis y la gluconeogénesis, ambas vías vitales para la función celular (Pancholi, 2001). Su expresión relativa también correlacionó positivamente con la tasa de recolección total y fue significativamente menor luego de la aplicación de herbicidas en el año 2. A su vez, el ACP individual para dicha temporada, mostró una discriminación de las observaciones individuales del lote B, y este agrupamiento fue, en parte, explicado por el perfil de expresión de *enolase* y *AChE*. Los perfiles de expresión de *AChE* y *brahma* también exhibieron una correlación positiva y significativa con la tasa de recolección total y *brahma*, a su vez, correlacionó positivamente con la recolección de polen. Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre los perfiles de expresión de los genes estudiados y las concentraciones de pesticidas encontradas en el polen colectado en trampas. Tal como se vio en los resultados de la sección 3 de esta tesis, correspondiente a la temporada de verano 2016-2017, donde se estudiaron los niveles de expresión de genes relacionados a la detoxificación de xenobióticos en abejas jóvenes que desarrollan tareas en el interior de la colmena, parece haber una compleja relación entre los recursos recolectados por la colonia y las vías de expresión génica relativa de las abejas obreras, mediada por el potencial aporte nutricional de los recursos que ingresan a la colmena. De hecho, la nutrición desempeña un rol importante en la división del trabajo asociado a la edad de las abejas (Winston, 1987). La regulación de la división del trabajo de las abejas melíferas es un rasgo altamente derivado que implica vías metabólicas o de detección de nutrientes ampliamente conservadas, además de genes relacionados con la alimentación y la nutrición previamente implicados (Ament et al., 2008).

En conjunto, estos resultados sugieren una intrincada relación entre las trazas de pesticidas en los recursos alimentarios, las capacidades cognitivas, el estado nutricional y la expresión génica relativa en los cerebros de las abejas recolectoras. La exposición a la intensificación agrícola, tanto por la presencia de trazas de pesticidas en matrices apícolas, como por la disminución en la cantidad, variabilidad y calidad de recursos nutricios para las colonias, llevan a una disminución en las capacidades cognitivas de las abejas recolectoras, así como también de los perfiles de expresión de genes relacionados a diferentes vías metabólicas y neuronales que se asocian a las bases genéticas de la sociabilidad en abejas; genes que, a su vez, están altamente conservados en el reino animal (Rittschof et al., 2014; Shpigler et al., 2017b).

Discusión general

A pesar de la creciente dependencia agrícola de los polinizadores, la cantidad global de colmenas de abejas melíferas no cubre las demandas actuales de polinización que requieren los cultivos (Aizen y Harder 2009, Aizen et al. 2019). Aspectos como la fragmentación del hábitat de los polinizadores (Winfree et al. 2015), la extensión de las fronteras agrícolas y la intensificación de prácticas agroindustriales, que implican el uso creciente de agroquímicos (Benbrook, 2016; Meehan et al. 2011), serían algunos de los factores que contribuyen a esta problemática. A lo largo de esta tesis se estudiaron diferentes parámetros comportamentales, fisiológicos y moleculares, en colonias de abejas melíferas expuestas a la intensificación agrícola y ubicadas en diferentes entornos, en relación al tipo de cultivo y la proporción de flora silvestre presente en sus cercanías. Estos estudios se llevaron a cabo bajo diferentes situaciones reales de campo, en relación a los cultivos sembrados, los agroquímicos administrados y el modo de aplicación de los mismos.

En primer lugar, se evaluaron los perfiles de expresión de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos en larvas e intestinos de abejas jóvenes que realizan tareas en el interior de la colmena, expuestas a la aplicación terrestre de herbicidas de post-emergencia y la consecuente reducción en la diversidad floral de su entorno. Los resultados evidencian diferentes grados de susceptibilidad y/o exposición entre larvas y abejas adultas, siendo las primeras, más vulnerables a cambios en los perfiles de expresión de estos biomarcadores de exposición a pesticidas, luego de la aplicación de herbicidas. Esto se observó en todas las colonias, independientemente del entorno. Estas diferencias en los perfiles de expresión de genes detoxificantes de larvas y abejas adultas, ante la exposición a herbicidas tales como el GLI, se condice con lo registrado en estudios previos, bajo condiciones controladas de laboratorio (Tomé et al., 2020). Estos autores observaron las mismas tendencias que las registradas en esta tesis, donde las abejas adultas tienden a sobre-expresar estos genes luego de la exposición, mientras que las larvas tienden a sub-expresarlos luego de estar expuestas al herbicida GLI. Por otro lado, en el caso de las abejas jóvenes, los efectos sobre los perfiles de expresión varían en función del entorno de los apiarios y, a su vez, correlacionan significativamente con la recolección de polen. Esto indicaría que la recolección de este recurso podría influir sobre los perfiles de expresión de estos genes relacionados a la detoxificación de xenobióticos, paliando los efectos negativos de los pesticidas (Schmehl et al., 2014). En este sentido, hay una relación consistente entre la ingesta de polen y los niveles de transcripción de los citocromos *P450* en abejas (Alaux et al., 2011; Corby-Harris et al., 2014; Schmehl et al., 2014). Adicionalmente, el polen de los principales cultivos de verano no provee los requerimientos básicos de la nutrición de las abejas (Somerville, 2001). De esta forma, las abejas melíferas dependen de la adecuada disponibilidad y

recolección de polen para satisfacer la mayor parte de sus necesidades alimentarias. Por lo tanto, un equilibrio en la variabilidad de polen es fundamental para el crecimiento y la sostenibilidad de las colonias, y a su vez, afecta a muchos procesos posteriores, tales como el cuidado de las crías y el comportamiento de las obreras. Por otro lado, este equilibrio en la variabilidad de polen tiene una fuerte influencia sobre las interacciones entre dieta, nutrición, presencia de enfermedades y el estado del sistema inmunitario de la colonia (Smart et al., 2016). Por lo tanto, la fuerte reducción de la biodiversidad vegetal en sus entornos y de la disponibilidad temporal de los recursos florales, puede poner en peligro la supervivencia de los insectos polinizadores utilizados comercialmente, y así afectar a los servicios de polinización que proporcionan (Potts et al., 2010). Esta demanda nutricional podría ser complementada mediante el establecimiento y protección de zonas no cultivadas, con presencia de flora silvestre.

En segundo lugar, se evaluaron los perfiles de expresión de genes asociados a la detoxificación de xenobióticos en larvas. En este caso, la exposición de las colmenas fue debido a la administración terrestre de herbicidas, seguida de una aplicación aérea de una mezcla de fungicida e insecticida. A su vez, se analizó la presencia de residuos de metabolitos de agroquímicos en muestras de cera y miel de las mismas colonias donde se extrajeron las larvas. Los resultados mostraron una tendencia opuesta en los perfiles de expresión de los biomarcadores moleculares de exposición en larvas, en comparación con la temporada anterior donde solo se aplicaron herbicidas. De esta manera, la exposición a la mezcla de pesticidas (insecticidas y fungicidas) provocó una sobreexpresión de estos genes en larvas. En efecto, se ha reportado un efecto sinérgico entre el insecticida CLOR y los fungicidas triazoles, tales como el DIFENO, en bioensayos de toxicidad de contacto aguda, induciendo la actividad de los *P450* (Hass et al., 2022). De esta forma, las acciones antagónicas de esta mezcla de pesticidas pueden ser explicadas por la inducción de las enzimas de detoxificación, lo cual resulta en un aumento del metabolismo de estos compuestos y una disminución en la toxicidad (Johnson et al., 2013). Esto sugeriría que una exposición prolongada a dosis subletales de mezclas de insecticidas y fungicidas de esta familia, podría provocar la inducción de genes que codifican a los citocromos *P450*, los cuales actúan como genes biomarcadores de la respuesta a la exposición (Grozinger y Zayed, 2020; Pal et al., 2022). Por otro lado, al igual que en la temporada anterior, los perfiles de expresión en larvas no correlacionaron con las variables de recolección de recursos. Por lo tanto, la entrada de recursos y el consecuente estado nutricional de las obreras de interior de colmena, parecería paliar el efecto de los pesticidas, lo que no ocurriría en el caso de las larvas. A su vez, además de lo observado en la temporada anterior con relación a los herbicidas, se ha reportado que los insecticidas, en sus diferentes variedades, también son más tóxicos para las larvas que para las abejas adultas (Atkin y Kellum, 1986; Davis, 1989; Tasei, 2001; Rortais et al., 2005; Heylen et al., 2011), siendo entonces factible que este impacto en la etapa larval pueda potencialmente conducir a un debilitamiento de la estructura poblacional de la colonia (Zhu et al., 2014). Adicionalmente, el análisis de pesticidas reveló que, efectivamente, los agroquímicos aplicados están ingresando a la colmena y acumulándose en sus productos derivados. Incluso, en el

caso de GLI, ATZ y CLOR, las muestras registraron concentraciones mayores a las máximas permitidas por la Unión Europea en miel (50ng/g). Además, se registraron correlaciones significativas entre la concentración de pesticidas encontradas en las muestras de cera y miel y los niveles de expresión relativa en larvas. Particularmente, la presencia del insecticida CLOR en miel y cera y la del herbicida ATZ en ceras. Los residuos de plaguicidas en la cera representan una vía de exposición por contacto directo para las larvas de abeja melíferas, que pasan semanas desarrollándose en celdas de cría (Rondeau y Raine, 2022). No solo por un contacto directo entre las larvas y la cera de las celdas, sino porque también, los pesticidas pueden migrar desde la cera a la dieta de las larvas e ingresar a su organismo a través de la ingesta (Kast y Kilchenman, 2022). Adicionalmente, la cera de abejas tiene una baja tasa de reposición y puede permanecer en la colmena durante muchos años, lo que conlleva una mayor acumulación de pesticidas liposolubles persistentes a lo largo del tiempo (Rondeau y Raine, 2022). La supervivencia de las colonias de abejas melíferas depende del correcto desarrollo larvario, y los niveles de exposición de las crías a residuos químicos que pueden causar daños irreversibles a nivel celular, fisiológico y morfológico, pueden poner en peligro el desarrollo de la abeja adulta (Morales et al., 2020).

En tercer lugar, durante dos temporadas de verano, se evaluaron las capacidades cognitivas de las abejas recolectoras, luego de la exposición a la aplicación terrestre de herbicidas, por un lado, y de herbicidas más insecticidas por el otro. Se evaluaron, además, los perfiles de expresión de genes asociados a las bases genéticas de la sociabilidad en abejas, así como también, la presencia de pesticidas en abejas recolectoras y en muestras de polen recolectadas en trampas colocadas en la entrada de las colonias estudiadas. El análisis de pesticidas reveló que los pesticidas aplicados están presentes en las colonias. En este caso, ingresando en el polen que las abejas recolectaron en las flores disponibles en sus entornos. A su vez, se encontraron trazas del insecticida CLOR en cuerpos de abejas recolectoras, quienes entrarían en contacto directo con estos pesticidas. Se registró la presencia de GLI en polen en altas concentraciones, mayores a las admitidas por la Unión Europea. Sin embargo, estas concentraciones no fueron significativamente diferentes entre muestreos, en ninguno de los años estudiados. De hecho, esta concentración fue alta también en los muestreos pre aplicación, donde solo estaba disponible la floración silvestre, aledaña a los cultivos. Esto podría sugerir que el GLI se pudo haber rociado también en las aplicaciones previas, de pre-emergencia o de barbecho químico, y haber derivado hacia la flora no cultivo circundante. De esta forma, habría llegado al polen de estas plantas que sí estaban en floración cuando los cultivos aun no habían germinado o se encontraban en estado vegetativo, siendo que, como ya se mencionó previamente, este herbicida es bastante persistente en el ambiente (Bento et al., 2016). El polen que ingresa en la colmena es consumido tanto por las larvas como por las abejas nodrizas, de manera que el polen contaminado llega tanto a las abejas jóvenes que desempeñan tareas de cuidado de la cría en el interior de la colmena, como a las larvas que éstas alimentan. Con respecto a la expresión relativa de los genes relacionados a las bases genéticas de la sociabilidad en abejas, el análisis estadístico reveló una disminución significativa en los niveles de expresión de varios de estos genes, siendo

más pronunciados estos efectos subletales, cuando se aplicaron conjuntamente tanto herbicidas como insecticidas. Adicionalmente, estos niveles de expresión correlacionaron significativamente con la recolección de recursos. Nuevamente, al evaluar niveles de expresión de genes de interés en abejas adultas, observamos una relación directa con la recolección, mediada por el potencial aporte nutricional de los recursos que ingresan a la colmena. A su vez, en las trampas de polen se observó una disminución de la variabilidad de especies florales recolectadas, luego de la aplicación de los pesticidas. De hecho, la nutrición desempeña un rol importante en la división del trabajo asociado a la edad de las abejas (Winston, 1987). La regulación de la división del trabajo en las abejas melíferas implica vías metabólicas o de detección de nutrientes ampliamente conservadas, además de genes relacionados con la alimentación y la nutrición previamente implicados (Ament et al., 2008). Sin embargo, los perfiles de expresión de estos genes no mostraron ninguna correlación con las concentraciones de pesticidas encontradas en el polen. El aprendizaje asociativo se produce cuando una abeja establece un vínculo específico entre un estímulo ambiental neutro, como un determinado olor floral, y una recompensa, como el néctar. Esta capacidad de asociar un olor floral con la recompensa azucarada, por parte de las abejas recolectoras, se vio afectada luego de la aplicación de pesticidas, en los dos años estudiados. A su vez, las abejas evaluadas tras la administración de pesticidas mostraron una menor retención de la memoria olfativa establecida durante el condicionamiento. Identificar una fuente de alimento y volver a ella tras sucesivos vuelos de ida y vuelta a la colmena depende de la asociación de un recurso, como el néctar o el polen, a ciertas señales florales como el olor, el color, la calidad o la productividad (Chittka y Thomson, 1999). En este sentido, los resultados muestran una reducción en la sensibilidad gustativa por parte de las abejas recolectoras, afectando la capacidad de detectar concentraciones bajas de azúcar en el néctar. A su vez, estos resultados fueron más pronunciados en el apiario del lote A, en comparación a los de los lotes B y C. Este lote es el que contaba con una menor proporción de flora silvestre en su entorno. Por lo tanto, la presencia de estos parches de vegetación no cultivo podrían proporcionar áreas de forrajeo menos disturbadas para las abejas. Identificar los recursos florales más beneficiosos y recordar la asociación entre las claves florales y la recompensa en néctar o polen, permite a las abejas melíferas volver a alimentarse de un recurso, aunque se encuentre en diferentes parches florales o a lo largo de diferentes eventos de floración (Farina et al., 2019). De este modo, el deterioro de las capacidades cognitivas podría afectar la eficiencia de forrajeo y la coordinación en la colmena de las actividades colectivas.

En suma, los resultados de esta tesis confirman y muestran, en diversas situaciones realistas de campo, que las trazas de agroquímicos ingresan a las colmenas, generando efectos subletales sobre todas las etapas del desarrollo de los miembros de la colonia. Se observaron cambios en los niveles de expresión de los biomarcadores de exposición, relacionados a la detoxificación de xenobióticos, tanto en abejas adultas como en larvas, siendo estas últimas, más vulnerables. La recolección de polen y el potencial nutricional del mismo tiene una relación directa con los perfiles de expresión génica, tanto en abejas jóvenes de interior de colmena como en abejas recolectoras. Esto no se

observa en larvas, donde los perfiles de expresión génica no tienen relación directa con las variables de recolección de recursos, pero sí con las concentraciones de residuos de pesticidas encontrados en miel y cera. Adicionalmente, hay un efecto negativo sobre las capacidades cognitivas de las abejas recolectoras que afecta directamente a la eficiencia recolectora y, sumado a los efectos sobre la expresión de genes relacionados a la actividad neural y sociabilidad en abejas, podría llevar a una desorganización de las actividades colectivas y la estructura social de la colmena. Esto podría llevar a colonias de abejas melíferas más débiles y menos pobladas, con una menor longevidad a mediano plazo, en aquellos apiarios ubicados en entornos más disturbados. De esta forma, la presente tesis aporta evidencias, por un lado, de que es posible un abordaje comportamental mediante protocolos estandarizados para evaluar impacto ambiental y estrés en las colonias de abejas melíferas, en una situación realista de campo. Pudiendo determinarse, a partir de parámetros biológicos complejos y sistémicos, cómo el grado de disturbio en sus entornos afecta a las colmenas. Por otro lado, esta tesis aporta también evidencias sobre la importancia de salvaguardar entornos de flora silvestre que aporten diversidad espacial y disponibilidad temporal de recursos florales, para paliar los efectos subletales que hemos observado, a través de un mejor estado nutricional de las abejas adultas, tanto las que desempeñan tareas dentro de la colmena como las abejas que salen al exterior para recolectar recursos. Por último, es importante resaltar que los resultados de esta tesis fueron todos obtenidos en situaciones reales de campo, cuyas implicancias son muy valiosas para determinar el impacto ambiental efectivo sobre la abeja *Apis mellifera*, especie centinela de importancia económica.

Referencias bibliográficas

Aapresid (2018). Evolución y retos de la siembra directa en Argentina. <https://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2018/03/Evoluci%C3%B3n-y-retos-de-laSiembra-Directa-en-Argentina.pdf>

Abdel razik, M.A.A. (2019). Toxicity and side effects of some insecticides applied in cotton fields on *Apis mellifera*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26, pp. 4987-4996

Abrol, D.P. (2012). Pollination biology. *Springer*.

Aguilera, P., Ruiz-Tachiquín, M.E., Rocha, M., Pineda, B., Chanez-Cardenas, M. (2014). PCR en tiempo real.

Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Klein, A.M. (2008). Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Curr. Biol.*, 18 (20), pp. 1572-1575.

Aizen, M.A. y Harder, L.D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing lower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.* 19(11), 915-918.

Aizen, M.A., Aguiar, S., Biesmeijer, J.C., Garibaldi, L.A., Inouye, D.W. et al. (2019). Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Glob. Change Biol.*, 25 (10), pp. 3516-3527.

Alaux, C., Dantec, C., Parrinello, H., Le Conte, Y. (2011). Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's 750 nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*, 12, 496.

Almasri, H., Tavares, D.A., Pioz, M., Sené, D., Tchamitchian, S. et al. (2020). Mixtures of an insecticide, a fungicide and an herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 203, 111013.

Almasri, H., Tavares, D.A., Tchamitchian, S., Pélissier, M., Sené, D. et al. (2021). Toxicological status changes the susceptibility of the honey bee *Apis mellifera* to a single fungicidal spray application. *Environ Sci Pollut Res* 28(31):42807–42820.

Ament, S. A., Corona, M., Pollock, H. S., Robinson, G. E. (2008). Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4226-4231.

Anastassiades, M., Scherbaum, E., Taşdelen, B., Štajnbaher, D. (2007). Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*, 439-458.

Andrade, F. H., Taboada, M. A., Lema, R. D., Maceira, N. O., Echeverria, H. E. et al. (2017). Los desafíos de la agricultura argentina: satisfacer las futuras demandas y reducir el impacto ambiental. *Ediciones INTA*.

- Andrade, F. H. (2020).** Los desafíos de la agricultura global. *Ediciones INTA*.
- Aparicio, V., De Gerónimo, E., Hernández Guijarro, K., Pérez, D., Portocarrero, R., Vidal, C. (2015).** Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. *INTA Ediciones. Balcarce, Buenos Aires, Argentina. 74 p.*
- Ashton, F. M. y Monaco, T. D. (1991).** *Weed Science. Principles and Practices. 3rd ed. New York: J. Wiley. Pp. 266–272*
- Atkins, E.L. y Kellum, D. (1986).** Comparative morphogenic and toxicity studies on the effect of pesticides on honeybee brood. *J Apicult Res 25 (4) 242–255.*
- Baker, H.G. y Baker, I. (1975).** Studies of nectar-constitution and pollinator-plant coevolution. *Coevolution of Animals and Plants, 100(140):591-600.*
- Balbuena, M.S., Tison, L., Hahn, M.L., Greggers, U., Menzel, R., Farina, W.M. (2018).** Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J. Exp. Biol. 2015, 218, 2799–2805.*
- Barry, E. F. y Grob, R. L. (2007).** Columns for gas chromatography: performance and selection. *John Wiley & Sons.*
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B. et al. (2009).** Package 'lme4'.
- Benbrook, C. M. (2016).** Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe, 28(1), 1-15.*
- Bento, C.P.M., Yang, X., Gort, G., Xue, S., Geissen, V. et al. (2016).** Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Science of the Total Environment, 572, 301-311.*
- Berenbaum, M.R. y Johnson, R.M. (2015).** Xenobiotic detoxification pathways in honeybees. *Current Opinion in Insect Science, 686 10, 51-58.*
- Berg, C.J., King, H.P., Delenstarr, G., Kumar, R., Rubio, F., Glaze, T. (2018).** Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer on-site by bees. *PLoS ONE, 13, e0198876.*
- Biosystems, A. (2014).** Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. *Foster City: 707 Applied Biosystems.*
- Bitterman, M., Menzel, R., Fietz, A., Schäfer, S. (1983).** Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology, 97(2):107.*
- Blot, N., Veillat L., Rouzé R., Delatte, H. (2019).** Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS One, 14:e0215466.*
- Boily, M., Sarrasin, B., Deblois, C., Aras, P., Chagnon, M. (2013).** Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 20, 5603–5614.*

Bommuraj, V., Chen, Y, Klein, H., Sperling, R. et al. (2019). Pesticide and trace element residues in honey and beeswax combs from Israel in association with human risk assessment and honey adulteration. *Food Chemistry, Volume 299, 125123.*

Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J., vanEngelsdorp, D. (2012). Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honeybees *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, 58, 613-620.

Borlaug, N. (2007). Sixty-two years of fighting hunger: personal recollections. *Euphytica 157: 287-297.*

Boyle, N.K., Pitts-Singer, T.L., Abbott, J., Alix, A., Cox-Foster, D.L. et al. (2019). Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. *Environ. Entomol. 48(1), 4-11.*

Brechtbuehl, K., Whalley, S. A., Dusheiko, G. M., Saunders, N. A. (2001). A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of virological methods, 93(1-2), 105-113.*

Breeze, T.D., Vaissière, B.E., Bommarco, R., Petanidou, T., Seraphides, N. et al. (2014). Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PloS one, 9(1).*

Bringezu, S., O'Brien, M., Pengue, W., Swilling, M., Kauppi, L. (2010). Assessing global land use and soil management for sustainable resource policies. *Scoping Paper. International Panel for Sustainable Resource Management. UNEP.*

Brinson Conerly, E. (1990). Clethodim new chemical registration standard. *United States Environmental Protection Agency, pp. 1–66.*

Brodschneider, R. y Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honeybees. *Apidologie, 41, 278–294.*

Brooks, M. E., Kristensen, K., Van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W. et al. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R journal, 9(2), 378-400.*

Brutscher, L.M., Daughenbaugh, K.F., Flenniken, M.L. (2015). Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Curr Opin Insect Sci; 10:71-82.*

Burr, S. y Ray, D.E. (2004). Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol Sci 77(2):341–346*

Carew, T. (2000). Behavioral Neurobiology: The cellular organization of natural behavior. *Sinauer Associates Publishers.*

Carignan, V. y Villard, M. A. (2002). Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review. *Environmental monitoring and assessment, 78(1), 45-61.*

Carnesecchi, E., Svendsen, C., Lasagni, S., Grech, A., Quignot, N. et al. (2019). Investigating combined toxicity of binary mixtures in bees: meta-analysis of laboratory tests, modelling, mechanistic basis and implications for risk assessment. *Environ Int* 133:105256.

Carvalho, L.G., Veldtman, R., Shenkute, A.G., Tesfay, G.B., Pirk, C.W.W., et al. (2011). Natural and within-farmland biodiversity enhances crop productivity. *Ecology Letters*, 14(3), 251- 259

CASAFE (2012). Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Mercado argentino de productos fitosanitarios 2012. Elaborado por Kleffmann & Partner SRL.

CASAFE (2014). Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes www.casafe.org

Ceuppens, B., Eeraerts, M., Vleugels, T. et al. (2015). Effects of dietary lambda-cyhalothrin exposure on bumblebee survival, reproduction, and foraging behavior in laboratory and greenhouse. *J Pest Sci* 88, 777–783.

Chambers, J. M. y Hastie, T. J. (1992). Statistical Models in S, *Chapman and Hall*.

Chamkasem, N. y Vargo, J.D. (2017). Development and independent laboratory validation of an analytical method for the direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminomethylphosphonic acid in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Regul. Sci.*, 5, 1–9. 29.

Cheremisinoff, N.P. y Rosenfeld, P.E. (2007). Handbook of Pollution Prevention and Cleaner Production: Best Practices in the Agrochemical Industry. *William Andrew Publishing*, 215-231.

Chiari, W.C., de Alencar Arnaut de Toledo, V., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Braz de Oliveira; A.J., Shigue-ro Sakaguti, E. et al. (2005). Pollination of soybean (*Glycine max* L. Merrill) by honeybees (*Apis mellifera* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1), 31-36.

Chittka, L. y Thomson, J.D. (Eds.) (2001). Cognitive ecology of pollination: animal behaviour and floral evolution. *Cambridge University Press*.

Cid, R. (2014). Aplicación eficiente de fitosanitarios, en: Buenas Prácticas en la aplicación de fitosanitarios. *Ediciones INTA*.

Clark, M. (2020). Factor Analysis with the psych package.

Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A. et al. (2006). A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity 731 and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol*, 15(5):615–636.

Collins, A., Williams, V., Evans, J. (2004). Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 13, 141–146.

Colombo, C. y Sarandón, S. (2015). Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la provincia de Buenos Aires. Mapa de situación e incidencia sobre la salud. *Defensor del pueblo, provincia de Buenos Aires. Universidad Nacional de La Plata*. 532 p.

Conway, G. R. (1987). The properties of agroecosystems. *Agricultural systems*, 24(2), 95-117.

- Corby-Harris, V., Jones, B.M., Walton, A., Schwan, M.R., Anderson, K.E. (2014).** Transcriptional markers of suboptimal nutrition in developing *Apis mellifera* nurse workers. *BMC Genomics*, 15, 134.
- Cullen, M.G., Thompson, L.J., Carolan, J.C., Stout, J.C., Stanley, D.A. (2019).** Fungicides, herbicides and bees: a systematic review of existing research and methods *PLoS ONE*, 14 (12), p. e0225743
- Cremer, S., Armitage, S., Schmid-Hempel, P. (2007).** Social immunity. *Curr Biol*, 17:R693-R702. 37.
- Dai, P., Yan, Z., Ma, S., Yang, Y., Wang, Q., Hou, C. et al. (2018).** The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honeybee during larvae reared in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 66, 7786–7793.
- Dainese, M., Martin, E., Aizen, M., Albrecht, M., Bommarco, R. (2019).** A global synthesis reveals biodiversity-mediated benefits for crop production. *Science Advances* 5: eaax0121.
- Dalgaard, P. (2008).** Introductory Statistics with R. *Statics and Computing*. Springer.
- de Brito Sanchez, M.G., Chen, C., Li, J., Liu, F. et al. (2008).** Behavioral studies on tarsal gustation in honeybees: sucrose responsiveness and sucrose-mediated olfactory conditioning. *Journal of Comparative Physiology A*, 194(10):861-869.
- Davis, A. (1989).** The study of insecticide poisoning of honey bee brood. *Bee World* 70(1) 163–174.
- Decourtye, A., Mader, E., Desneux, N. (2010).** Landscape enhancement of floral resources for honeybees in agro-ecosystems. *Apidologie*, 41, 264–277.
- De Geronimo, E., Aparicio V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R. et al. (2014).** Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107, 423-431.
- DeGrandi-Hoffman, G. y Martin, J.H. (1993).** The size and distribution of the honeybee (*Apis mellifera* L.) cross-pollinating population on male-sterile sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *J. Apic. Res.*, 1993, 32, 135–142.
- Dermauw, W. y Van Leeuwen, T. (2014).** The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 2014, 45:89-110.
- Devillers, J. y Pham-Delègue, M.H. (Eds.). (2002).** Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. (1st Ed.). *CRC Press*.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Le, D.P. (1998).** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu Rev Entomol* 43: 545–569.
- Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C., Kohn, F., Kretzmer, K., et al. (2010).** Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. *Nandula, V. K. (Ed.). Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development and Management. John Wiley and Sons, Inc. pp. 1-33.*

Dolezal, A., St. Clair, A., Zhang, G., Toth, A., O’Neal, M. (2019). Native habitat mitigates feast–famine conditions faced by honeybees in an agricultural landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 9 116(50), 25147- 25155.

Du, Y., Nomura, Y., Luo, N., Liu, Z., et al. (2009). Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 234(2):266–272.

Dukas, R. (Ed.). (1998). Cognitive ecology: the evolutionary ecology of information processing and decision-making. *University of Chicago Press*.

Duke, S.O. y Powles, S.B. (2008). Glyphosate: a once in a century herbicide. *Pest Manag. Sci.*, 64 (4), pp. 319-325.

Edwards, D. (2005). Reregistration eligibility decision (RED) for sethoxydim. *United States Environmental Protection Agency*, pp. 1–27.

EC. (2017). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. *SANTE/11813/2017. European commission*.

Egbuta, C., Lo, J., Ghosh, D., (2014). Mechanism of inhibition of estrogen biosynthesis by azole fungicides. *Endocrinology* 155, 4622–4628.

Elorza, F. (2021). Buenas prácticas agrícolas: Uso seguro y responsable de los productos fitosanitarios. *Casafe*.

Erber, J., Masuhr, T., Menzel, R. (1980). Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol. Entomol.* 5: 343-358

European Commission (2013). Amending Annexes II and III to Regulation EC No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels of emanectin benzoate, etofenprox, etoxazole, flutriafol, glyphosate, phosmet, pyraclostrobin, spinosad and spirotetramat in or on certain products. *Council Regulation (EC) No 293/2013 of 20 March 2013*

European Commission (2016). EU Pesticides database. Retrieved from <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eupesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>

Evans, L. (1997). Adapting and improving crops: the endless task. *Phil Trans R. Soc. Lond. B.* 354: 901-906.

FAO. (2019). Food outlook - biannual report on global food markets, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAO. (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. *FAO Statistical Database*. <http://www.fao.org/>

Farina, W. M., Grüter, C., Diaz, P. C. (2005) Social learning of floral odours within the honeybee hive. *Proc. R. Soc. B* 272: 1923-1928

Farina, W.M., Balbuena, M.S., Herbert, L.T., Mengoni Goñalons, C., Vázquez, D.E. (2019). Effects of the herbicide glyphosate on honey bee sensory and cognitive abilities: individual impairments with implications for the hive. *Insects*, 10, p. 354.

Farooqui, T. (2013). A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry International* 62 (2013) 122–136

Fehr, W.R., Caviness, C.F., Burmood, D.T., Pennington, J.S. (1971). Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11: 929-931.

Fellows, C.J., Anderson, T.D, Swale, D.R. (2022). Acute toxicity of atrazine, alachlor, and chlorpyrifos mixtures to honey bees. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Volume 188, 105271.

Fernández, F. y Sharkey, M.J. (2006). Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. *Sociedad Colombiana de Entomología*, Bogotá D.C.

Foley, J., DeFries, R., Asner, G., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. (2005). Global consequences of land use. *Science* 309: 570-574.

Free, J.B. (1967). Factors determining the collection of pollen by honey bee foragers. *Animal Behaviour*. 15:134–144

Frings, H. (1944). The loci of olfactory end-organs in the honey bee, *Apis mellifera* Linn. *Journal of Experimental Zoology*.

Galetto, L. y Torres, C. (2020). Pollination in socio-agroecosystems: recommendations to preserve the diversity of pollinators. *Int. J. Plant Reproductive Biol.* 12(1), 38-43.

Galizia, G.C., Eisenhardt, D., Giurfa, M. (2012). Honey bee Neurobiology and Behavior: A Tribute to Randolph Menzel; *Springer: Heidelberg, Germany, 2012; 509p.*

Garibaldi, L.A., Carvalheiro, L.G., Vaissière, B.E., Gemmill-Herren, B., Hipólito, J. et al. (2016). Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. *Science*, 351(6271), 388-391.

Garibaldi, L.A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R. et al. (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, 339(6127):1608–1611.

Gauthier, M., Belzunces, L.P., Zaoujal, A., Colin, M.E., Richard, D. (1992). Modulatory effect of learning and memory on honey bee brain acetylcholinesterase activity. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.*, 103, 91–95.

Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S.H., Niggebrugge, C. et al. (2006) Involvement of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.*, 86, 164–174.

Gauthier, M. y Grünewald, B. (2011). Neurotransmitter Systems in the Honey Bee Brain: Functions in Learning and Memory; *Springer Science and Business Media LLC: Berlin, Germany; pp. 155–169*

Gibbs, J., Elle, E., Bobiwash, K., Haapalainen, T., Isaacs, R. (2016). Contrasting pollinators and pollination in native and non-native regions of highbush blueberry production. *PloS one*, 11(7), e0158937

Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. T.*, 167: 35±120.

Giroud, B., Vauchez, A., Vulliet, E., Wiest, L., Buleté, A. (2013). Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1316, 53-61.

Giurfa, M. (2003). Cognitive neurothology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr. Opinion Neurobiol.* 13, 726-735.

Gong, Y. y Diao, Q. (2017). Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26, 1–12.

González-Varo, J.P., Biesmeijer, J.C., Bommarco, R., Potts, S.G., Schweiger, O. et al. (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends Ecol. Evol.*, 28, 524-530.

Goodman, L. (2003). Form and function in the honeybee. *International Bee Research Association.*

Gordon, L., Bignet, V., Crona, B., Henriksson, P., Van Holt, T. et al. (2017). Rewiring food systems to enhance human health and biosphere stewardship. *Environ. Res. Lett.* 12. 100201

Gradish, A. E., Van Der Steen, J., Scott-Dupree, C. D., Cabrera, A. R., Cutler, G. C. et al. (2019). Comparison of pesticide exposure in honey bees (Hymenoptera: Apidae) and bumble bees (Hymenoptera: Apidae): implications for risk assessments. *Environmental Entomology*, 48(1), 12-21.

Greenleaf, S.S. y Kremen, C. (2006). Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13890-13895.

Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D. (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.*, 58, 1042-1049.

Grosso, J.P., Barneto, J.A., Velarde, R.A., Pagano, E.A., Zavala, J.A., Farina, W.M. (2018). An Early Sensitive Period Induces Long-Lasting Plasticity in the Honeybee Nervous System. *Front. Behav. Neurosci.* 12:11.

Grozinger, C.M. y Zayed, A. (2020). Improving bee health through genomics. *Nat Rev Genet*, 21, 277–291.

Grüter, C. y Farina, W.M. (2007). Nectar distribution and its relation to food quality in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux*, 54, 87–94.

Guo, C., Li, J.Z., Guo, B.Y., Wang, H.L. (2010). Determination and Safety Evaluation of Difenconazole Residues in Apples and Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85, 427–431.

Haas, J., Glaubitz, J., Koenig, U., Nauen, R. (2022). A mechanism-based approach unveils metabolic routes potentially mediating chlorantraniliprole synergism in honey bees, *Apis mellifera* L., by azole fungicides. *Pest Management Science*, 78(3), 965-973.

Harborne, J.B. (1982). Introduction to ecological biochemistry, *Academic Press*.

Harpur, B. A., Kent, C. F., Molodtsova, D., Lebon, J. M., Alqarni, A. S., Owayss, A. A., & Zayed, A. (2014). Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2614-2619.

Hartig, F. (2020). DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level/Mixed) Regression Models. R Package Version 0.2.7. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>

Helmer, S.H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M. (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Sci Pollut Res.*, 22, 8010–8021.

Herbert, E.W. (1992). Honey bee nutrition. *En Graham, J.E. (Ed.), The hive and the honey bee* (pp. 197–233). *Hamilton, IL: Dadant & Sons*.

Herbert, L.T., Vazquez, D.E., Arenas, A., Farina, W.M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *J. Exp. Biol.* 217, 3457–3464.

Heylen, K., Gobin, B., Arckens, L., Huybrechts, R., Billen, J. (2011). The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 42 (1) 103–116.

Hoehn, P., Tschardtke, T., Tylianakis, J. M., Steffan-Dewenter, I. (2008). Functional group diversity of bee pollinators increases crop yield. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1648), 2283-2291.

Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R. et al. (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 129– 149.

Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., Neov, B. (2020). Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Vet. Sci.*, 7, 166.

IPBES (2016). The Assessment Report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on 603 Pollinators, *Pollination and Food Production*. *Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V.L., Ngo, H.T., Eds.; Secretariat of the IPBES: Bonn, Germany; 552p*.

Isbell, F., Craven, D., Connolly, J., Loreau, M. (2015). Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes. *Nature* 526: 574-577.

Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honeybee, *Apis mellifera*. *Crop Protect*, 23:371-378.

Jablonowski, N.D., Schäffer, A., Burauel, P. (2011). Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environ Sci Pollut Res.*, 18, 328–331.

Johnson, R.M., Pollock, H.S., Berenbaum, M.R. (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.* 102, 474e479

Johnson, R.M., Mao, W., Pollock, H.S., Niu, G., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. (2012). Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS One*, 7, 31051.

Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D., Ellis, M.D. (2013). Acaricide, fungicide and drug interactions in honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8:e54092.

Jolliffe, I.T. y Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Phil. Trans. R. Soc. A* 374: 20150202.

Jones, B.M., Kingwell, C.J., Wcislo, W.T., Robinson, G.E. (2017). Caste-biased gene expression in a facultatively eusocial bee suggests a role for genetic accommodation in the evolution of eusociality. *Proc. R. Soc. B* 284: 20162228.

Jumarie, C., Aras, P., Boily, M. (2017). Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honeybees. *Chemosphere*, 168, 163-170.

Kadala, A., Charreton, M., Charnet, P. et al. (2019). Honey bees long-lasting locomotor deficits after exposure to the diamide chlorantraniliprole are accompanied by brain and muscular calcium channels alterations. *Sci Rep* 9, 2153

Kadlikova, K., Vaclavikova, M., Halesova, T., Kamler, M., Markovic, M., Erban, T. (2021). The investigation of honey bee pesticide poisoning incidents in Czechia. *Chemosphere*, 263, 128056.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (1991). Principles of neural science. *Elsevier*.

Kast, C. y Kilchenmann, V. (2022). An in vitro model for assessing the toxicity of pesticides in beeswax on honey bee larvae. *Chemosphere*, Volume 287, Part 2, 132214.

Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.M. (1998). Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 83-112.

Keller, I., Fluri, P., Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honeybees. *Bee World*, Volume 86 - Issue 2.

Kevan, P.G. (1999). Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1), 373-39

Kirchner, W. H. (1999). Mad-bee-disease? Sublethal effects of imidacloprid (Gaucho®) on the behaviour of honey bees. *Apidologie* 30: 422.

Klein, A.M., Muller, C., Hoehn, P., Kremen, C. (2009). Understanding the role of species richness for crop pollination services. En: *Naeem, S., Bunker, D.E., Hector, A., Loreau, M. y Perrings, C. (Eds.) Biodiversity, Ecosystem Functioning, and Human Well-Being – an Ecological and Economic Perspective. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 195–208.*

Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A. et al. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1608):303-313.

- Knudsen, J. T. y Tollsten, L. (1993).** Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Bot. J. Linn. Soc.* 113, 263-284.
- Kocher, S.D., Mallarino, R., Rubin, B.E. et al. (2018).** The genetic basis of a social polymorphism in halictid bees. *Nat Commun* 9, 4338.
- Kopit, A. M. y Pitts-Singer, T. L. (2018).** Routes of pesticide exposure in solitary, cavity-nesting bees. *Environmental Entomology*, 47(3), 499-510.
- Kreissl, S. y Bicker, G. (1989).** Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, 286(1), 71-84.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K. (2012).** Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE* 7:e29268
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A.C, Jonák, J. et al. (2006).** The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, Issues 2–3, pp 95-125.
- Kuwabara, M. (1957).** Bildung des bedingten reflexes van Pavlovs typus bei der honigbiene, *Apis mellifera*. *Hokkaido Univ. Zool. J. Fac. Sci.* 16:458-464
- Larsen, M., Hamilton, P., Werkheiser, W. (2013).** Water quality status and trends in the United States. *Ahuja, S. (Ed.). Monitoring water quality. Elsevier, NC EUA.* 19-57 pp.
- Le, S., Josse, J., Husson, F. (2008).** FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18.
- Leguizamón, A. (2020).** Seeds of power: Environmental injustice and genetically modified soybeans in Argentina. *Duke University Press*.
- Lenth, R. (2020).** Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R Package Version 1.4.4. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Lewis, K.A, Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A. (2016).** An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum Ecol Risk Assess an Int J* 22:1050–1064.
- Liao, L., Wu, W., Berenbaum, M.R. (2017).** Behavioral responses of honeybee (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Sci Rep.*, 7, 15924.
- Liao, C., He, X., Wang, Z. et al. (2018).** Short-Term Exposure to Lambda-Cyhalothrin Negatively Affects the Survival and Memory-Related Characteristics of Worker Bees *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol* 75, 59–65
- Ligor, M., Bukowska, M., Ratiu, I. A., Gadzała-Kopciuch, R., Buszewski, B. (2020).** Determination of neonicotinoids in honey samples originated from Poland and other world countries. *Molecules*, 25(24), 5817.
- Lindauer, M. (1952).** Ein beitrag zur frage der arbeitsteilung im bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 34(4):299-345.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.

- Lourenço, A.P., Mackert, A., dos Santos Cristino, A., Simões, Z.L.P. (2008).** Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39(3), 372-385.
- Lushchak, V.I., Matviishyn, T.M., Husak, V.V., Storey, J.M., Storey, K.B. (2018).** Pesticide toxicity: A mechanistic approach. *EXCLI J.*, 17, 1101.
- Mao, W., Johnson, R.M., Rupasinghe, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. (2009).** Quercetin-metabolizing *CYP6AS* enzymes of the pollinator *Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 154:427-434.
- Mandelik, Y., Winfree, R., Neeson, T., Kremen, C. (2012).** Complementary habitat use by wild bees in agro-natural landscapes. *Ecological Applications*, 22(5), 1535-1546
- Mao, W., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R. (2011).** CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (31) 12657-12662.
- Mao, W., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R. (2013).** Honey constituents' upregulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 8842-8846.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Rodríguez-Dimaté, F.A., Campos, J.M., Santos Júnior, V.C.D. et al. (2019).** Exposure to insecticides reduces populations of *Rhynchophorus palmarum* in oil palm plantations with Bud Rot disease. *Insects*, 10 (4) (2019), p. 111
- Martínez-Domínguez, G., Romero-Gonzalez, R., Garrido-Frenich, A. (2014).** Multiclass pesticide determination in royal jelly by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Anal. Meth.* 6, 5376e5386.
- Martins, C.A.H., Caliani, I., D'Agostino, A. et al. (2022).** Biochemical responses, feeding and survival in the solitary bee *Osmia bicornis* following exposure to an insecticide and a fungicide alone and in combination. *Environ Sci Pollut Res*.
- Martins, K.T., Gonzalez, A., Lechowicz, M.J. (2015).** Pollination services are mediated by bee functional diversity and landscape context. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 200, 12-20.
- Masson, C. y Arnold, G. (1987).** Organization and plasticity of the olfactory system of the honey bee, *Apis mellifera*. En: Menzel R y Mercer A (eds.) *Neurobiology and Behavior of Honeybees*, 280-295, Springer Verlag.
- Matthews, G. (2006).** Pesticides: Health, Safety and the environment. *Blackwell Publishing Ltd.* ISBN 978-14051-3091-2.
- McGregor, S. E. (1976).** Insect pollination of cultivated crop plants (pp. 1-9). *Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture*.
- McLafferty, F. W. y Turecek, F. (1993).** Interpretation of mass spectra. *University science books*.
- Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L.P., Chauzat, M-P., et al. (2008).** Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. In *The COLOSS BEE-BOOK, Volume I: standard*

methods for *Apis mellifera* research. V Dietemann; J D Ellis; P Neumann, Eds.; *Journal of Apicultural Research*, 52(4).

Meikle, W.G., Corby-Harris, V., Carroll, M.J., Weiss, M., Snyder, L.A. et al. (2019). Exposure to sublethal concentrations of methoxyfenozide disrupts honey bee colony activity and thermoregulation. *PLoS ONE* 14(3): e0204635.

Mengoni Goñalons, C.M. y Farina, W.M. (2018). Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honeybees. *J. Exp. Biol.*, 221.

Menzel, R. (1985). Learning in honeybees in an ecological and behavioural context. Fortschritte der Zoologie, B. D. 31 Hölldobler/Lindauer (Hrsg.): *Experimental Behavioral Ecology*. G. Fischer Verlag. Stuttgart. New York.

Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* 185:323-340

Menzel, R. (2012). The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 758–768.

Michener, C.D. (1974). The Social Behavior of Bees: A Comparative Study. *Harvard University Press, Cambridge*.

Michener, C.D. (2000). The Bees of the World (Vol. 1): *JHU press*.

Mitchell, E.A., Mulhauser, B., Mulo, M., Mutabazi, A., Glauser, G., Aebi, A. (2017). A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, 358(6359), 109-111.

Mohamed, I.A., Omar, E.M., Tawfik, A.I., Amro, A., Al Nagggar, Y. (2023). Sublethal effects of herbicides clethodim, haloxyfop-P-methyl, and their mixture on honey bee health. *Apidologie*, 54(1), 1-17.

Morales, M.M., Ramos, M.J.G., Vázquez, P.P., Galiano, F.J.D., Valverde, M.G. et al. (2020). Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honey bee brood. *Science of the Total Environment*, 710, 136288.

Morton, H.L., Moffett, J.O., Macdonald, R.H. (1972). Toxicity of Herbicides to Newly Emerged Honey Bees. *Environmental Entomology*, 1:102–104.

Motta, E.V.S.; Raymann, K.; Moran, N.A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honeybees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 115, 10305–10310.

Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S. et al. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honeybee health. *Plos One*, 2010, 5, e9754.

Nicolson, S.W., Nepi, M., Pacini, E. (Eds.). (2007). Nectaries and nectar (Vol. 4). *Dordrecht: Springer*.

Niu, G., Johnson, R.M., Berenbaum, M.R. (2010). Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. *Apidologie*, 1051.

Núñez, J.A. (1982). Honeybee foraging strategies at a food source in relation to its distance from the hive and the rate of sugar flow. *Journal of Apicultural Research*, 21(3), 139-150.

Odum, E.P. (1984). Properties of agroecosystems. In: Lowrance R, BR Stinner & GJ House (Eds). *Agricultural Ecosystem: Unifying concepts. J Willey & Sons. New York: 5-11*

Ordaz-Guillén, Y., Galíndez-Mayer, C.J., Ruiz-Ordaz, N., Juárez-Ramírez, C. et al. (2014). Evaluating the degradation of the herbicides picloram and 2, 4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21 pp. 8765-8773.

Otegui, M.E., Riglos, M., Mercau, J.L. (2021). Genetically modified maize hybrids and delayed sowing reduced drought effects across a rainfall gradient in temperate Argentina, *Journal of Experimental Botany, Volume 72, Issue 14, Pages 5180–5188.*

Page, R., Erber, J., Fondrk, M. (1998). The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 182:489-500.

Pal, E., Almasri, H., Paris, L., Diogon, M., Pioz, M. et al. (2022). Toxicity of the Pesticides Imidacloprid, Difenoconazole and Glyphosate Alone and in Binary and Ternary Mixtures to Winter Honey Bees: Effects on Survival and Antioxidative Defenses. *Toxics* 2022, 10, 104.

Pancholi, V. (2001). Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences. 58(7):902–920.*

Pankiw, T., Page Jr, R.E., Fondrk, M.K. (1998). Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral ecology and sociobiology*, 44(3), 193-198.

Pavlov, I.P. (1927). Conditional reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *H. Milford.*

Pernal, S.F. y Currie, R.W. (2001). The influence of pollen quality on foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51(1), 53-68.

Pilling, E.D., Bromleychallenor, K.A.C., Walker, C.H., Jepson, P.C. (1995). Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide λ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Physiol* 51(1):1–11.

Pohlert, T. (2020). PMCMRplus: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended. R package version 1.4.4. <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMRplus>

Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A. et al. (2010). Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe. *J Api Res*, 49:15–22.

R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.* <https://www.R-project.org/>

Rader, R., Bartomeus, I., Garibaldi, L.A., Garratt, M.P., Howlett, B.G. et al. (2016). Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(1), 146-151. 130

Rader, R., Cunningham, S.A., Howlett, B.G., Inouye, D.W. (2020). Non-bee insects as visitors and pollinators of crops: Biology, ecology, and management. *Annual Review of Entomology*, 65, 391-407.

Rader, R., Howlett, B.G., Cunningham, S.A., Westcott, D.A., Edwards, W. (2012). Spatial and temporal variation in pollinator effectiveness: do unmanaged insects provide consistent pollination services to mass flowering crops? *Journal of Applied Ecology*, 49(1), 126-134.

Raimets, R., Bontšutšnaja, A., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Kaart, T. et al. (2020). Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. *Chemosphere*, 238, 124555.

Ray, D.E. y Fry, J.R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & therapeutics*, 111(1), 174-193.

Requier, F., Odoux, J. F., Tamic, T., Moreau, N., Henry, M. et al. (2015). Honey bee diet in intensive farmland habitats reveals an unexpectedly high flower richness and a major role of weeds. *Ecological Applications*, 25(4), 881-890.

Research and Markets. (2015). Global Fungicide Market – Growth, Trends, Forecast for the period 2015-2020. *Brief article. Biotech Business Week*, p. 357. Retrieved from <https://link.gale.com/apps/doc/A419662423/AONE?u=guel77241&sid=AONE&xid=411257f1>

Ribbands, R. (1955). The scent language of honeybees. *Annual Report Smithsonian Institution*, 4243:369-377.

Ricketts T.H., Regetz J., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C. et al. (2008). Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecol. Lett.*, 11, 499–515.

Riley, J. R., Greggers, U., Smith, A. D., Reynolds, D. R., Menzel, R. (2005). The flight paths of honey bees recruited by the waggle dance. *Nature*, 435(7039), 205-207.

Ripple, W., Wolf, C., Newsome, T., Galetti, M., Alamgir, M. and 15364 scientist signatories from 184 countries. (2017). World Scientists' Warning to Humanity: A Second Notice. *BioScience* 67: 1028-1028.

Ritchie, S.W. and Hanway, J.J. (1982). How a corn plant develops. *Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Services, Ames, Iowa. USA. Special Report*, 48. 21p.

Rittschof, C.C., Bukhari, S. A., Sloofman, L. G., Troy, J. M., Caetano-Anollés, D. et al. (2014). Neuromolecular responses to social challenge: Common mechanisms across mouse, stickleback fish, and honey bee. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:17929–17934.

Robinson, G.E. (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annual review of entomology*, 37(1):637-665.

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Stuart Chapin, F. et al. (2009). A safe operating space for humanity. *Nature* 461: 472-475.

Rockström, J., Edenhofer, O., Gaertner, J., DeClerck, F. (2020). Planet-proofing the global food system. *Nature Food* 1: 3-5.

Roig Alsina, A. (2008). Apiformes (abejas). En: Biodiversidad de artrópodos argentinos II. (Eds: Claps, L.; Debandi, G. y Roig-Juñent, S.) *Sociedad Entomológica Argentina ediciones, Tucumán, Pp.* 373-390.

Rondeau, S. y Raine, E. (2022). Fungicides and bees: a review of exposure and risk. *Environment International, Volume 165.*

Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.P., Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees' exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie, 36 pp.* 71-83.

Roy, R., Schmitt, A.J., Thomas, J.B., Carter, C.J. (2017). Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant Science, 262,* 148-164.

Rubio, F., Guo, E., Kamp, L. (2014). Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. *J. Environ. Anal. Toxicol. 4:*249.

Samson-Robert, O., Labrie, G., Mercier, P.L., Chagnon, M., Derome, N., Fournier, V. (2015). Increased acetylcholinesterase expression in bumble bees during neonicotinoid coated corn sowing. *Scientific Reports 5:*12636

Sanchez-Bayo, F. y Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees – a risk assessment. *PLoS One, 9 (4):*e94482.

Sandoz, J.C., Laloi, D., Odoux, J.F., Pham-Delègue, M.H. (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Anim. Behav. 59:*1025–1034

Sandoz, J.-C. y Giurfa, M. (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learn. Mem. 19,* 54–66.

Satorre, E. y Andrade, F. (2021). Cambios productivos y tecnológicos de la agricultura extensiva argentina en los últimos quince años. *Ciencia Hoy, Vol 29 (173):* 19-27.

Scharlaken, B., de Graaf, D.C., Goossens, K., Brunain, M., Peelman, L. J., Jacobs, F. J. (2008). Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *Journal of insect Science, 8(1),* 33.

Scheiner, R., Sokolowski, M.B., Erber, J. (2004). Activity of cGMP-Dependent Protein Kinase (PKG) Affects Sucrose Responsiveness and Habituation in *Drosophila melanogaster*. *Learning and Memory.*

Schmehl, D.R., Teal, P.E., Frazier, J.L., Grozinger, C.M. (2014). Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol., 71,* pp. 177-190.

Schneiter, A. y Miller, J.F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Sci., 21:* 901-903.

Schwarz, R.S., Moran, N.A., Evans, J.D. (2016). Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honeybee workers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 113,* 9345–9350.

- Seeley, T. (1982).** Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11(4):287-293
- Seeley, T. (1995).** The wisdom of the hive: the social physiology of honeybee colonies. *Harvard University Press*.
- Sehlmeyer, S., Wang, L., Langel, D., Heckel, D.G., Mohagheghi, H. et al. (2010).** Flavin-dependent monooxygenases as a detoxification mechanism in insects: new insights from the Arctiids (Lepidoptera). *PLoS ONE*, 5:e10435.
- Sgolastra, F., Hinarejos, S., Pitts-Singer, T.L., Boyle, N.K., Joseph, T. et al. (2018).** Pesticide exposure assessment paradigm for solitary bees. *Environ. Entomol.* 48 (1), 22e35.
- Sgolastra, F., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Maini, S., Porrini, C. et al. (2020).** Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. *Biol. Conserv.* 241:108356.
- Shpigler, H. Y., Saul, M. C., Murdoch, E. E., Cash-Ahmed, A. C., Seward, C. H. et al. (2017a).** Behavioral, transcriptomic and epigenetic responses to social challenge in honey bees. *Genes, Brain and Behavior*, 16(6), 579-591.
- Shpigler, H.Y., Saul, M.C., Corona, F., et al. (2017b).** Deep evolutionary conservation of autism-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017a; 114:9653-9658.
- Silman, I. y Sussman, J.L. (2008).** Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chem. Interactions*, 175, 3–10.
- Skinner, B. (1938).** The behavior of organisms. *Appleton-Century-Crofts*.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (2001).** Principios de análisis instrumental. (Vol. 5, pp. 614-633). *Madrid: McGraw-Hill*.
- Smagghe, G., Gomez, L.E., Dhadialla, T.S. (2012).** Chapter Two—Bisacylhydrazine Insecticides for selective pest control. In Dhadialla T.S. (Ed.) *Advances in Insect Physiology* 43: 163–249. *Academic Press*.
- Smart, M., Pettis, J., Rice, N., Browning, Z., Spivak, M. (2016).** Linking Measures of Colony and Individual Honey Bee Health to Survival among Apiaries Exposed to Varying Agricultural Land Use. *PLoS ONE*, 11(3): e0152685.
- Soderlund, D.M. y Bloomquist, J.R. (1989).** Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual review of entomology*, 34(1), 77-96.
- Somerville, D.C. (2001).** Nutritional value of bee collected pollens: A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. *RIRDC Project No DAN-134A. RIRDC*.
- Song, Y. (2014).** Insight into the mode of action of 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *J Integr Plant Biol.*, 56:106–113.
- Song, S., Zhang, C., Chen, Z., He, F., Wei, J., Tan, H., Li, X. (2018).** Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC–MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction. *Journal of Chromatography A*, 1557, 51-61.

Springmann, M., Clark, M., Mason-D’Croze, D., Wiebe, K., Bodirsky, B. et al. (2018). Options for keeping the food system within environmental limits. *Nature* 562: 519-525.

Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H., Kubista, M. (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin. Chem.* 50 (3), 509–515.

Stanley, J., Preetha, G., Stanley, J. (2016). Pesticide toxicity to non-target organisms (Vol. 502). Berlin, Germany. Springer.

St. Clair, A., Zhang, G., Dolezal, A., O’Neal, M., Toth, A. (2020). Diversified Farming in a Monoculture Landscape: Effects on Honeybee Health and Wild Bee Communities. *Environ. Entomol.* 2020. 1–12.

Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honeybee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3):168-179.

Tang, F.H.M., Lenzen, M., McBratney, A. et al. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nat. Geosci.* 14, 206–210.

Tasei, J.N.I. (2001). Effects of insect growth regulators on honey bees and non-Apis bees. A review. *Apidologie* 32 (6) 527–545.

Tepedino, V.J. (1979). The importance of bees and other insect pollinators in maintaining floral species composition. *Great Basin Naturalist Memoirs*, 3, 139-150.

The Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949.

Thioulouse, J., Dray, S., Dufour, A., Siberchicot, A. et al. (2018). Multivariate Analysis of Ecological Data with ade4. Springer.

Thom, C., Gilley, D. C., Hooper, J., Esch, H. E. (2007). The scent of the waggle dance. *PLoS biology*, 5(9), e228.

Thompson, H. y Wilkins, S. (2003). Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bull Insectol* 56(1):131–134

Thompson, H.M., Fryday, S.L., Harkin, S., Milner, S. (2014). Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie* 45(5):545–553.

Tittonell, P. (2013). Farming systems ecology. Towards ecological intensification of world agricultura. *Wageningen University*. 40 p.

Tittonell, P. (2014). Ecological intensification of agriculture—sustainable by nature. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 8, 53-61.

Tomé, H.V.V., Schmechl, D.R., Wedde, A.E., Godoy, R.S.M., Ravaiano, S.V. et al. (2020). Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honeybees. *Environmental Pollution*, Volume 256, 113420.

Tong, Z., Duan, J., Wu, Y., Liu, Q., He, Q. et al. (2018). A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in China. *Science of the Total Environment*, 640, 1578-1586.

Traynor, K.S., Pettis, J.S., Tarpy, D.R., Mullin, C.A., Frazier, J.L., Frazier, M. (2016). In-hive pesticide exposure: assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Sci. Rep.* 6, 33207.

Trigo, E.J. (2011). Fifteen years of genetically modified crops in Argentine agriculture. *ArgenBio*.

Ucar, T. y Hall, F.R. (2001). Windbreaks as a pesticide drift mitigation strategy: a review. *Pest. Manag. Sci.*, 57: 663-675.

Valverde, B.E. (2002). Weed management in Latin America. *Pestic. Outlook*, 13, 79-81.

van der Schalie, W.H., Gardner Jr, H.S., Bantle, J.A., De Rosa, C.T., Finch, R.A. et al. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental health perspectives*, 107(4), 309.

vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E. et al. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4, e6481.

vanEngelsdorp, D., Hayes, Jr. J., Underwood, R.M., Pettis, J., (2008). A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3, e4071

vanEngelsdorp, D., Speybroeck, N., Evans, J.D., Nguyen, B.K., Mullin, C. (2010). Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J. Econ. Entomol.* 103 (5), 1517–1523.

vanEngelsdorp, D. y Meixner, M.D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S80-S95.

Vázquez, D.E., Iliina, N., Pagano, E.A., Zavala, J.A., Farina, W.M. (2018). Glyphosate affects the larval development of honeybees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS ONE*,13(10): e0205074.

Vázquez, D.E., Latorre-Estivalis, J.M., Ons, S., Farina, W.M. (2020). Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. *Environmental Pollution*, 261, 114148.

Verde Calvo, J.R. (1999). Manual de prácticas de química analítica II. *Universidad Autónoma Metropolitana*.

Verena, C. y Fent, K. (2017). Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. *Environmental pollution* 226 (2017): 48-59.

von Frisch, K. (1967). Dance language and orientation of bees.

Wade, A., Lin, C.H., Kurkul, C., Regan, E.R., Johnson, R.M. (2019). Combined Toxicity of Insecticides and Fungicides Applied to California Almond Orchards to Honey Bee Larvae and Adults. *Insects* 2019, 10, 20.

Walters, J. (2011). Environmental Fate of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid Environmental Monitoring and Pest Management. *Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, USA*.

Wang, F., Wang, Y., Li, Y., Zhang, S. et al. (2022). Pesticide residues in beebread and honey in *Apis cerana cerana* and their hazards to honey bees and human. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 238, 113574.

Wang, Y., Zhu, Y.C., Li, W. (2020). Comparative examination on synergistic toxicities of chlorpyrifos, acephate, or tetraconazole mixed with pyrethroid insecticides to honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environ Sci Pollut Res* 27(7):6971–6980.

Wenger, J. y Niderman, T. (2007). Chapter 9: Acetyl-CoA carboxylase inhibitors. *En Krämer, W. y Schimer, U. (Eds.) Modern Crop Protection Compounds. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, GmbH & Co.*

Whitehead, A.T. y Larsen, J.R. (1976). Electrophysiological responses of galeal contact chemoreceptors of *Apis mellifera* to selected sugars and electrolytes. *Journal of Insect Physiology*, 22(12):1609-1616.

Williams, J.R., Swale, D.R., Anderson, T.D. (2020). Comparative effects of technical-grade and formulated chlorantraniliprole to the survivorship and locomotor activity of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *Pest Manag Sci*, 76: 2582-2588.

Williams, N. M., Crone, E. E., Roulston, T. H., Minckley, R. L., Packer, L., Potts, S. G. (2010). Ecological and life-history traits predict bee species responses to environmental disturbances. *Biol. Conserv.* 143, 2280–2291.

Wilson, E.O. (1971). The insect societies, Belknap Press of Harvard University Press.

Wilson, E.O. y Hölldobler, B. (2005). Eusociality: Origin and consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 205:13367–13371.

Wilson, M.B., Spivak, M., Hegeman, A.D., Rendahl, A., Cohen, J.D. (2013). Metabolomics reveals the origin of antimicrobial plant resins collected by honeybees. *PLoS ONE*, 8:e77512.

Winfrey, R.W. Fox, J., Williams, N.M., Reilly, J.R., Cariveau, D.P. (2015). Abundance of common species, not species richness, drives delivery of a real-world ecosystem service. *Ecology Letters*, 18(7), 626-635.

Winston, M.L. (1987). The biology of the honeybee, *Harvard University Press*.

Woodard, S.H., Fischman, B.J., Venkat, A., Hudson, M.E., Varala, K. et al. (2011). Genes involved in convergent evolution of eusociality in bees. *Proc Natl Acad Sci U S A. May 3; 108(18):7472-7.*

Xavier, K.V., Kc, A.N., Vallad, G.E. (2020). Fungicide application timing essential for the management of leaf spot and fruit rot on pomegranate (*Punica granatum* L.) in Florida Plant Disease. *Sciic Soc* 104(6):1629–1637.

Xiao, J., He, Q., Liu, Q., Wang, Z., Yin, F., et al. (2022). Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment. *Science of The Total Environment*, 805, 150292.

Xu, J., Strange, J.P., Welker, D.L., James, R.R. (2013). Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genom*, 14:874.

Zhu, K., Liu, M., Fu, Z., Zhou, Z., Kong, Y. et al. (2017). Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genetics*, 13(8), e1006946

Zhu, W., Schmehl, D.R., Mullin, C.A., Frazier, J.L. (2014). Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae. *PLoS ONE* 9(1): e77547.

Zubrod, J.P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C.A., Imfeld, G. et al. (2019). Fungicides: an overlooked pesticide class? *Environ. Sci. Technol.*, 53 (7) pp. 3347-3365.

Anexo estadístico

Tabla A3.1. Actividad recolectora. Estadísticos de la prueba de Wilcoxon para comparaciones entre muestreos y de la prueba de Friedman para comparaciones entre lotes (en negrita, $p < 0,05$).

Recolectoras totales				
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
PRE vs POST	Wilcoxon	V = 289 estimate = 40,898	28 - 52.5	<0,001
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 0,143$; df = 2		0,931
Recolectoras con polen				
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
PRE vs POST	Wilcoxon	V = 253 estimate = 11,999	9 - 15	<0,001
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 8,044$; df = 2		0,018
A - B	Conover <i>post hoc</i>			<0,001
A - C	Conover <i>post hoc</i>			0,240
B - C	Conover <i>post hoc</i>			<0,001
Ratio Polen/Total				
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
PRE vs POST	Wilcoxon	V = 280 Estimate = 0,133	0.087 – 0,181	<0,001
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 9,805$; df = 2		0,007
A - B	Conover <i>post hoc</i>			<0,001
A - C	Conover <i>post hoc</i>			0,310
B - C	Conover <i>post hoc</i>			<0,001

Tabla A3.2. Expresión génica relativa. Estadísticos de la prueba de Wilcoxon para comparaciones entre muestreos y de la prueba de Friedman para comparaciones entre lotes, (en negrita, $p < 0,05$).

ABEJAS					
Gen	Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
AB	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 36 Estimate = -0,105	-2,537 – 1,550	0,814
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 0$; df = 2		1
CYP6BD1	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 24 Estimate = -0,194	-2,681 – 0,447	0,424
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 4,75$; df = 2		0,093
CYP6AS2	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 56 estimate = 0,862	-0,835 – 3,286	0,204
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 1,75$; df = 2		0,417
CYP6AS3	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 37 Estimate = -0,194	-1,971 – 9,829	0,875
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 1$; df = 2		0,606
CYP6AS4	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 29 Estimate = -0,559	-6,344 – 2,000	0,470
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 9,25$; df = 2		0,010
	A - B	Conover <i>post hoc</i>			<0,001
	A - C	Conover <i>post hoc</i>			<0,001
	B - C	Conover <i>post hoc</i>			0,618
CYP9Q3	PRE vs POST	Wilcoxon	V=20 estimate=- 0,033	-1.522 - 3.083	0,248
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 9,75$; df = 2		0,008
	A - B	Conover <i>post hoc</i>			<0,001
	A - C	Conover <i>post hoc</i>			0,140
	B - C	Conover <i>post hoc</i>			<0,001
LARVAS					
Gen	Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
AB	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 39 Estimate = -0,075	-2,267 – 1,731	0,980
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 0,25$; df = 2		0,882
CYP6BD1	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 66 Estimate = 1,451	0,017 – 5,939	0,034
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 0,25$; df = 2		0,882
CYP6AS2	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 38 Estimate = -0,107	-2,674 – 2,051	0,970
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 0,25$; df = 2		0,883
CYP6AS3	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 63 Estimate = 1,856	-0,212 – 5,964	0,064
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 0,25$; df = 2		0,882
CYP6AS4	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 70 Estimate = 0,979	0,177 – 2,920	0,012
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 3,161$; df = 2		0,206
CYP9Q3	PRE vs POST	Wilcoxon	V = 61	-0,366 – 2,380	0,092

			estimate = 1,019		
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 1; df = 2$		0,606

Tabla A3.3. Correlación entre la expresión relativa de los diferentes genes estudiados en abejas jóvenes de interior de colmena, luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia. Valores de Tau, z y p, obtenidos de la Prueba de correlación de Kendall, (en negrita, $p < 0,05$).

Genes correlacionados	Tau	Valor z	Valor p
<i>AB - CYP6BD1</i>	0,292	1,309	0,191
<i>AB - CYP6AS2</i>	0,321	1,443	0,149
<i>AB - CYP6AS3</i>	-0,076	-0,344	0,731
<i>AB - CYP6AS4</i>	0,015	0,069	0,945
<i>AB - CYP9Q3</i>	0,107	0,481	0,630
<i>CYP6BD1 - CYP6AS2</i>	0,779	3,506	<0,001
<i>CYP6BD1 - CYP6AS3</i>	0,259	1,169	0,243
<i>CYP6BD1 - CYP6AS4</i>	0,657	2,956	0,003
<i>CYP6BD1 - CYP9Q3</i>	0,748	3,368	<0,001
<i>CYP6AS2 - CYP6AS3</i>	0,303	1,433	0,197
<i>CYP6AS2 - CYP6AS4</i>	0,515	2,501	0,021
<i>CYP6AS2 - CYP9Q3</i>	0,667	3,155	0,002
<i>CYP6AS3 - CYP6AS4</i>	0,080	0,033	0,990
<i>CYP6AS3 - CYP9Q3</i>	0,152	0,538	0,545
<i>CYP6AS4 - CYP9Q3</i>	0,848	4,132	<0,001

Tabla A3.4. Correlación entre la expresión relativa de los diferentes genes estudiados en larvas en el quinto estadio, luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia. Valores de Tau, z y p, obtenidos de la Prueba de correlación de Kendall, (en negrita, $p < 0,05$).

Genes correlacionados	Tau	Valor z	p valor
<i>AB - CYP6BD1</i>	0,242	1,041	0,311
<i>AB - CYP6AS2</i>	-0,168	-0,756	0,450
<i>AB - CYP6AS3</i>	0,273	1,240	0,250
<i>AB - CYP6AS4</i>	0,164	0,714	0,475
<i>AB - CYP9Q3</i>	0,382	1,718	0,086
<i>CYP6BD1 - CYP6AS2</i>	0,076	0,344	0,731
<i>CYP6BD1 - CYP6AS3</i>	0,424	1,847	0,063
<i>CYP6BD1 - CYP6AS4</i>	0,428	1,857	0,063
<i>CYP6BD1 - CYP9Q3</i>	0,290	1,306	0,191
<i>CYP6AS2 - CYP6AS3</i>	0,351	1,581	0,113
<i>CYP6AS2 - CYP6AS4</i>	0,249	1,074	0,283
<i>CYP6AS2 - CYP9Q3</i>	-0,246	-1,102	0,270
<i>CYP6AS3 - CYP6AS4</i>	0,461	2	0,046
<i>CYP6AS3 - CYP9Q3</i>	0,015	0,069	0,945
<i>CYP6AS4 - CYP9Q3</i>	0,348	1,503	0,133

Tabla A3.5. Correlación entre la expresión relativa del mismo gen biomarcador en abejas jóvenes de interior de colmena (A) y larvas (L), luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia. Valores de Tau, z y p, obtenidos de la Prueba de correlación de Kendall, (en negrita, $p < 0,05$).

Genes correlacionados	Tau	Valor z	p valor
<i>AB A – AB L</i>	0,198	0,894	0,371
<i>CYP6BD1 A – CYP6BD1 L</i>	0,046	0,206	0,837
<i>CYP6AS2 A – CYP6AS2 L</i>	-0,321	-1,443	0,149
<i>CYP6AS3 A – CYP6AS3 L</i>	-0,091	0,430	0,737
<i>CYP6AS4 A – CYP6AS4 L</i>	0,132	0,571	0,568
<i>CYP9Q3 A – CYP9Q3 L</i>	0,504	2,268	0,023

Tabla A3.6. Importancia de los componentes para el análisis de componentes principales (ACP). Desviación estándar, proporción de variabilidad y proporción de variabilidad acumulada para cada componente principal.

Abejas jóvenes de interior de colmena						
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
Desviación estándar	1,681	1,093	1,055	0,894	0,245	0,089
Proporción de variabilidad	0,471	0,199	0,185	0,133	0,010	0,001
Proporción de variabilidad acumulada	0,471	0,670	0,856	0,989	0,999	1,000
Larvas						
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
Desviación estándar	1,516	1,356	0,998	0,808	0,415	0,204
Proporción de variabilidad	0,383	0,306	0,166	0,109	0,029	0,007
Proporción de variabilidad acumulada	0,383	0,689	0,855	0,964	0,993	1,000

Tabla A3.7. Contribución de las expresiones génicas relativas luego de la aplicación de la mezcla de herbicidas de post-emergencia a la variabilidad en cada componente principal, para abejas de interior de colmena y larvas. Se señala en negrita las variables que más aportan a los primeros 3 componentes.

Abejas jóvenes de interior de colmena						
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
AB	0,096	-0,077	0,760	-0,636	0,034	0,020
CYP6BD1	-0,559	-0,221	-0,091	-0,128	0,777	-0,103
CYP6AS2	-0,179	-0,795	-0,271	-0,278	-0,430	0,025
CYP6AS3	0,138	0,394	-0,571	-0,706	0,032	0,022
CYP6AS4	-0,567	0,255	0,075	-0,016	-0,230	0,745
CYP9Q3	-0,553	0,305	0,092	-0,051	-0,396	-0,658
Larvas						
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
AB	0,069	-0,102	0,982	-0,116	-0,070	0,054
CYP6BD1	0,148	0,688	0,031	0,027	-0,664	-0,249
CYP6AS2	-0,536	0,044	-0,080	-0,690	-0,257	0,403
CYP6AS3	-0,521	0,136	0,102	0,701	-0,108	0,443
CYP6AS4	-0,624	0,172	0,117	-0,033	0,302	-0,689
CYP9Q3	0,157	0,683	0,071	-0,132	0,620	0,319

Tabla A4.1. Actividad recolectora. Modelos estadísticos y conjunto de variables analizadas. Se indica estadístico LRT y p valor obtenidos en la salida de cada modelo (en negrita, $p < 0,05$).

Recolectoras totales		
Modelo (Poisson): Totales ~ 1 + (1 Colmena)	LRT	p valor
	Muestreo = 3,238	0,072
Lote = 4,276	0,118	
Recolectoras con polen		
Modelo (Poisson): Polen ~ Muestreo + (1 Colmena)	LRT	p valor
	Muestreo = 63,929	<0,001
Lote = 0,009	0,995	
Ratio polen/total		
Modelo (Binomial): Ratio~ Muestreo+(1 Colmena)	LRT	p valor
	Muestreo = 105,535	<0,001
Lote = 3,667	0,160	

Tabla A4.2. Expresión relativa. Modelos estadísticos y conjunto de variables analizadas. Para los modelos GLM se indica el estadístico LRT y el p valor, obtenidos en la salida de cada modelo. En el caso del análisis no paramétrico, se indican estadísticos de la prueba de Wilcoxon para comparaciones entre muestreos y de la prueba de Friedman para comparaciones entre lotes. En negrita, $p < 0,05$.

CYP6AS2					
Modelo (Gamma): CYP6AS2 ~ Muestreo + (1 Colmena)	LRT		p valor		
	Muestreo = 31,192			<0,001	
Lote = 5,363			0,069		
CYP6AS4					
Modelo (Gamma): CYP6AS4 ~ Muestreo + (1 Colmena)	LRT		p valor		
	Muestreo = 6,491			0,011	
Lote = 0,144			0,930		
CYP6BD1					
Modelo (Gamma): CYP6BD1 ~ 1 + (1 Colmena)	LRT		p valor		
	Muestreo = 0,011			0,915	
Lote = 0,011			0,994		
CYP6AS3					
Modelo no paramétrico	Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
Modelo no paramétrico	Muestreo	Wilcoxon	V = 24	-7,325 3,225	0,239
	PRE vs POST		Estimate = -0,814		
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 2,25, df = 2$		0,325
CYP9Q3					
Modelo no paramétrico	Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
Modelo no paramétrico	Muestreo	Wilcoxon	V = 16	-97,35 2,90	0,077
	PRE vs POST		Estimate = -2,972		
	Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 1,05, df = 2$		0,606

Tabla A4.3. Concentración de pesticidas en miel. Estadísticos de la prueba de Wilcoxon para comparaciones entre muestreos y de la prueba de Friedman para comparaciones entre lotes (en negrita, $p < 0,05$).

Concentración de CLOR en miel				
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
Muestreo PRE vs POST	Wilcoxon	V = 1 Estimate = -40,360	-67,636 -19,134	0,028
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 3, df = 2$		0,223
Concentración de DIFENO en miel				
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
Muestreo PRE vs POST	Wilcoxon	V = 46 Estimate = 0,064	-0,074 0,625	0,248
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 3,161, df = 2$		0,206
Concentración de GLI en miel				
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
Muestreo PRE vs POST	Wilcoxon	V = 26 Estimate = -7,144	-14,958 13,056	0,308
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 1,75, df = 2$		0,417
Concentración de ATZ en miel				
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
Muestreo PRE vs POST	Wilcoxon	V = 15 Estimate = -20,7	-262,35 104	0,374
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 0,963, df = 2$		0,618

Tabla A4.4. Concentración de pesticidas en cera. Estadísticos de la prueba de Wilcoxon para comparaciones entre muestreos y de la prueba de Friedman para comparaciones entre lotes (en negrita, $p < 0,05$).

Concentración de CLOR en cera, en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas			
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	p valor
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 5,733; df = 2$	0,057
Concentración de GLI en cera, en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas			
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	p valor
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 5,636; df = 2$	0,060
Concentración de DIFENO en cera, en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas			
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	p valor
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 2; df = 2$	0,368

Concentración de ATZ en cera, en el muestreo posterior a la aplicación de pesticidas			
Variables comparadas	Prueba	Estadísticos	p valor
Entre lotes	Friedman	$\chi^2 = 8$; $df = 2$	0,018
A - B	Conover post hoc		0,016
A - C	Conover post hoc		<0,001
B - C	Conover post hoc		0,011

Tabla A4.5. Correlación entre las variables de actividad recolectora y la expresión relativa de los diferentes genes estudiados en larvas, luego de la aplicación pesticidas. Valores de Rho, S y p, obtenidos de la Prueba de correlación de Spearman.

Prueba de correlación de Spearman			
Variables correlacionadas	Rho	S	p valor
Recolectoras totales – <i>CYP6AS2</i>	0,077	264	0,817
Recolectoras totales – <i>CYP6AS3</i>	-0,350	386	0,266
Recolectoras totales – <i>CYP6AS4</i>	-0,371	392	0,237
Recolectoras totales – <i>CYP6BD1</i>	0,203	228	0,528
Recolectoras totales – <i>CYP9Q3</i>	0,042	274	0,904
Recolectoras con polen – <i>CYP6AS2</i>	-0,021	292,03	0,948
Recolectoras con polen – <i>CYP6AS3</i>	-0,186	339,28	0,562
Recolectoras con polen – <i>CYP6AS4</i>	0,172	236,74	0,592
Recolectoras con polen – <i>CYP6BD1</i>	0,151	242,77	0,639
Recolectoras con polen – <i>CYP9Q3</i>	-0,256	359,39	0,421

Tabla A4.6. Importancia de los componentes para el análisis de componentes principales (ACP). Desviación estándar, proporción de variabilidad y proporción de variabilidad acumulada para cada componente principal.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10
Desvío estándar	1,670	1,466	1,246	1,040	0,951	0,824	0,609	0,562	0,384	0,071
Proporción de varianza	0,279	0,215	0,155	0,108	0,090	0,068	0,037	0,032	0,015	0,001
Proporción acumulada	0,279	0,494	0,649	0,758	0,848	0,916	0,953	0,985	0,999	1,000

Tabla A4.7. Contribución de las expresiones génicas relativas en larvas, luego de la aplicación de pesticidas, a la variabilidad en cada componente principal. Se señala en negrita las variables que más aportan a los primeros 3 componentes.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10
CYP6AS2	-0,474	0,132	0,155	0,408	0,163	-0,067	-0,360	0,132	0,491	0,384
CYP6AS3	-0,527	0,216	0,019	0,183	0,004	-0,055	-0,303	-0,081	-0,581	-0,450
CYP6AS4	0,204	0,176	0,308	0,352	-0,577	0,577	-0,081	-0,100	0,097	-0,127
CYP6BD1	0,052	-0,319	-0,444	0,481	-0,330	-0,349	0,079	0,290	0,180	-0,335
CYP9Q3	-0,321	-0,341	0,332	0,258	0,102	0,188	0,652	0,235	-0,239	0,137
Concentración de GLI en miel	-0,005	0,482	-0,509	0,148	-0,202	0,052	0,197	0,105	-0,325	0,536
Concentración de CLOR en miel	0,308	0,172	0,505	0,020	-0,170	-0,451	-0,158	0,536	-0,247	0,116
Concentración de ATZ en miel	0,093	0,538	0,182	0,237	0,166	-0,359	0,476	-0,340	0,225	0,251
Concentración de CLOR en cera	0,341	0,179	-0,143	0,257	0,619	0,377	-0,084	0,418	-0,030	-0,236
Concentración de ATZ en cera	-0,359	0,321	-0,067	-0,483	-0,199	0,156	0,205	0,487	0,322	0,288

Tabla A5.1 Actividad recolectora. Modelos estadísticos y conjunto de variables analizadas. Se indica estadístico el LRT y el p valor, obtenidos en la salida de cada modelo (en negrita, $p < 0,05$).

Recolectoras totales			
Modelo (Binomial Negativa): Totales ~ Muestreo*año + lote + (1 Colmena)	LRT		p valor
		Muestreo*año = 43,590	
	Lote = 30,174		<0,001
Comparaciones <i>post hoc</i>	Comparaciones	Estadísticos	p valor
	Interacción Muestreo*año		
	Año = 1 Pre vs Post	z.ratio = 1,635 estimate = 0,088	0,102
	Año = 2 Pre vs Post	z.ratio = -7,601 estimate = -0,423	<0,001
	Entre lotes		
	A - B	z.ratio = 7,391 estimate = 0,405	<0,001
	A - C	z.ratio = 1,674 estimate = 0,091	0,282
	B - C	z.ratio = 5,717 estimate = 0,314	<0,001
	Recolectoras con polen		

Modelo (Binomial Negativa): Polen ~ lote + (1 Colmena)	LRT		p valor
	Muestreo = 3,200		0,074
	Año = 1,584		0,208
		Lote = 23,214	<0,001
Comparaciones <i>post hoc</i>	Comparaciones	Estadísticos	p valor
	Entre los apiarios de los diferentes lotes		
	A - B	z.ratio = 5,993 estimate = 0,589	<0,001
	A - C	z.ratio = 1,887 estimate = 0,183	0,177
	B - C	z.ratio = 4,112 estimate = 0,406	0,001
Ratio polen/total			
Modelo (Beta binomial): Ratio polen/total ~ Muestreo + (1 Colmena)	LRT		p valor
	Muestreo = 12,642		<0,001
	Lote = 0,289		0,865
		Año = 0,198	0,656
Peso total de polen			
Modelo (Normal): Peso polen ~ Muestreo*año + (1 Colmena)	LRT		p valor
	Muestreo*año = 7,540		0,006
	Muestreo = 1,600		0,206
		Año = 0,363	0,547
Comparaciones <i>post hoc</i>	Comparaciones	Estadísticos	p valor
	Interacción Muestreo*año		
	Año = 2 Pre vs Post	t.ratio = -2,785 estimate = -10,08	0,005
	Año = 1 Pre vs Post	t.ratio = 0,934 estimate = 3,38	0,353
Índice de variabilidad de polen			
Modelo (Binomial): Proporción de color ~ Muestreo + (1 Colmena)	LRT		p valor
	Lote = 0,924		0,630
	Muestreo = 7,709		0,006
		Año = 0,931	0,335

Tabla A5.2. Ensayos comportamentales *in situ*. Modelos estadísticos y conjunto de variables analizadas. Se indica el estadístico LRT y el p valor, obtenidos en la salida de cada modelo (en negrita, $p < 0,05$).

Sensibilidad gustativa			
Concentración 0,1%			
Modelo (Binomial): Respuesta ~ Muestreo	LRT		p valor
	Muestreo = 8,743		0,003
	Año = 1,045		0,306
	Lote = 4,759		0,093
Concentración 0,3%			
Modelo (Binomial): Respuesta ~ Muestreo	LRT		p valor
	Muestreo = 5,131		0,023
	Año = 3,775		0,052
	Lote = 0,593		0,743
Concentración 1%			
Modelo (Binomial): Respuesta ~ 1	LRT		p valor
	Muestreo = 2,053		0,152
	Año = 2,800		0,094
	Lote = 2,544		0,280
Concentración 3%			
Modelo (Binomial): Respuesta ~ 1	LRT		p valor
	Muestreo = 1,144		0,285
	Año = 0,155		0,694
	Lote = 1,602		0,449
Concentración 10%			
Modelo (Binomial): Respuesta ~ 1	LRT		p valor
	Muestreo = 0,132		0,717
	Año = 2,364		0,124
	Lote = 0,543		0,762
Concentración 30%			
Modelo (Binomial): Respuesta ~ 1	LRT		p valor
	Muestreo = 1,648		0,199
	Año = 0,313		0,576
	Lote = 0,258		0,879
Concentración 50%			
Modelo (Binomial): Respuesta ~ Muestreo	LRT		p valor
	Muestreo = 6,648		0,009
	Año = 0,225		0,635
	Lote = 1,631		0,442
Score de respuesta			
Modelo (Poisson): Respuesta ~ Muestreo + Año + Lote	LRT		p valor
	Muestreo = 20,840		<0,001
	Año = 22,442		<0,001
	Lote = 13,608		0,0011
Comparaciones	Comparaciones	Estadísticos	p valor
	Entre los apiarios de los diferentes lotes		
	A - B	z.ratio = -3,119 estimate = -0,300	0,005

<i>post hoc</i>	A - C	z.ratio = -3,276 estimate = -0,315	0,003
	B - C	z.ratio = -0,166 estimate = -0,015	0,985
Evaluación (respuesta condicionada)			
Modelo (Binomial): Respuesta ~ Muestreo + Año + Lote	LRT		p value
	Muestreo = 13,477		<0,001
	Año = 22,231		<0,001
Lote = 9,083		0,011	
Comparaciones <i>post hoc</i>	Comparaciones	Estadísticos	p valor
	Entre los apiarios de los diferentes lotes		
	A - B	z.ratio = -2,906 estimate = -0,577	0,010
	A - C	z.ratio = -2,094 estimate = -0,417	0,091
	B - C	z.ratio = 0,812 estimate = 0,160	0,696

Tabla A5.3. Expresión génica. Modelos estadísticos y conjunto de variables analizadas. Se indica el estadístico LRT y el p valor, obtenidos en la salida de cada modelo (en negrita, $p < 0,05$).

AChE			
Modelo (gamma): Expresión relativa ~ Muestreo*Año + (1 Colmena)	LRT		p valor
	Muestreo = 0,373		0,541
	Año = 2,896		0,089
Muestreo*Año = 7,841		0,005	
Comparaciones <i>post hoc</i>	Comparaciones	Estadísticos	p valor
	Entre los diferentes momentos y años		
	POST1 - PRE1	z.ratio = -2,450 estimate = -1,098	0,068
	POST2 - PRE2	z.ratio = 1,488 estimate = 0,634	0,445
brahma			
Modelo (gamma): Expresión relativa ~ Muestreo*Año*Lote + (1 Colmena)	LRT		p valor
	Muestreo = 8,990		0,003
	Año = 0,898		0,343
	Lote = 2,958		0,228
	Muestreo*Lote = 18,407		<0,001
	Año*Lote = 0,668		0,716
	Muestreo*Año = 23,298		<0,001
Muestreo*Año*Lote = 6,766		0,034	
Comparaciones <i>post hoc</i>	Comparaciones	Estadísticos	p valor
	Entre los diferentes momentos, años y lotes		
	A PRE1 - A POST1	z.ratio = -0,176 estimate = -0,137	1,000
	B PRE1 - B POST1	z.ratio = 2,539 estimate = 1,708	0,315

	C PRE1 – C POST1	z.ratio = 6,919 estimate = 4,655	<0,001
	A PRE2 – A POST2	z.ratio = -2,069 estimate = -1,608	0,645
	B PRE2 – B POST2	z.ratio = -0,287 estimate = -0,193	1,000
	C PRE2 – C POST2	z.ratio = -0,310 estimate = -0,225	1,000
enolase			
Modelo (gamma): Expresión relativa ~ Muestreo*Año + Lote + (1 Colmena)	LRT		p valor
	Muestreo = 2,544 Año = 5,523 Lote = 15,376 Muestreo*Año = 9,271		0,111 0,019 <0,001 0,002
Comparaciones post hoc	Comparaciones	Estadísticos	p valor
	Entre los apiarios de los diferentes lotes		
	A – B	z.ratio = -2,191 estimate = -1,002	0,073
	A – C	z.ratio = 1,754 estimate = 0,815	0,185
	B – C	z.ratio=3.909, estimate=1.817	<0.001
	Entre los diferentes momentos y años		
	POST1 - PRE1	z.ratio = -3,315 estimate = -1,838	0,005
	POST2 - PRE2	z.ratio = 0,911 estimate = 0,471	0,799
pelle			
Modelo (gamma): Expresión relativa ~ Muestreo + (1 Colmena)	LRT		p valor
	Muestreo = 5,397		0,020
syx1a			
Modelo (gamma): Expresión relativa ~ 1 + (1 Colmena)			
syx7			
Modelo (gamma): Expresión relativa ~ 1 + (1 Colmena)			

Tabla A5.4. Concentración de pesticidas en polen en el año 1. Estadísticos de la prueba de Wilcoxon para comparaciones entre muestreos y de la prueba de Friedman para comparaciones entre lotes (en negrita, $p < 0,05$).

Concentración de GLI en polen				
Comparaciones	Test	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
PRE vs POST	Wilcoxon	V = 14 Estimate = -6,948	-77,767 - 6,856	0,359
Entre apiarios de los diferentes lotes	Friedman	$\chi^2 = 1,333$, df = 2		0,513
Concentración de ATZ en polen				
Comparaciones	Test	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
PRE vs POST	Wilcoxon	V = 30 Estimate = 38,150	-34,600 - 113,100	0,374
Entre apiarios de los diferentes lotes	Friedman	$\chi^2 = 9$; df = 2		0,011
A - B	Conover post hoc			0,001
A - C				0,001
B - C				0,967
Concentración de CLOR en polen				
Comparaciones	Test	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
PRE vs POST	Wilcoxon	V = 1 Estimate = -14,4	-19,650 - -10,050	0,068
Entre apiarios de los diferentes lotes	Friedman	$\chi^2 = 1,273$, df = 2		0,529

Tabla A5.5. Concentración de pesticidas en polen y abejas recolectoras en el año 2. Estadísticos de la prueba de Wilcoxon para comparaciones entre muestreos y de la prueba de Friedman para comparaciones entre lotes (en negrita, $p < 0,05$).

Concentración de GLI en polen				
Comparaciones	Test	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
PRE vs POST	Wilcoxon	V = 28 Estimate = 3,706	-14,443 - 26,243	0,594
Entre apiarios de los diferentes lotes	Friedman	$\chi^2 = 7$, df = 2		0,030
A - B	Conover post hoc			0,003
A - C				0,024
B - C				0,157
Concentración de GLI en abejas recolectoras				
Comparaciones	Test	Estadísticos	Intervalo de confianza 95	p valor
PRE vs POST	Wilcoxon	V = 3 Estimate = 9,158	5,224 - 13,093	0,180
Entre apiarios de los diferentes lotes	Friedman	$\chi^2 = 2$, df = 2		0,368

Tabla A5.6. Correlación entre la concentración de GLI en polen y la expresión relativa de los genes estudiados, luego de la aplicación de pesticidas en ambos años. Valores Rho, S y p obtenidos a través de la prueba de correlación de Spearman.

Variables correlacionadas	Rho	S	p value
Concentración de GLI - <i>AChE</i>	-0,094	1060	0,711
Concentración de GLI - <i>brahma</i>	0,065	906	0,799
Concentración de GLI - <i>enolase</i>	-0,029	997,01	0,909
Concentración de GLI - <i>pelle</i>	-0,172	1136	0,493
Concentración de GLI - <i>syx1a</i>	0,342	638	0,165
Concentración de GLI - <i>syx7</i>	-0,470	1424	0,052

Tabla A5.7. Importancia de los componentes para el análisis de componentes principales (PCA) global, teniendo en cuenta ambos años, en el muestreo posterior a la administración. Desviación estándar, proporción de variabilidad y proporción de variabilidad acumulada para cada componente principal.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
Desvío estándar	1,528	1,107	1,042	0,949	0,828	0,698	0,530
Proporción de varianza	0,334	0,175	0,155	0,129	0,098	0,070	0,040
Proporción acumulada	0,334	0,509	0,664	0,792	0,890	0,960	1,000

Tabla A5.8. Contribución de las expresiones génicas relativas y la concentración de pesticidas en polen, luego de la aplicación de pesticidas y en ambos años, a la variabilidad en cada componente principal. Se señala en negrita las variables que más aportan a los primeros 3 componentes.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
<i>enolase</i>	0,430	-0,117	0,447	-0,367	0,059	0,624	0,270
<i>pelle</i>	0,489	-0,045	0,273	-0,391	-0,098	-0,568	-0,446
<i>brahma</i>	0,472	0,214	-0,297	0,382	0,270	0,362	-0,541
<i>AChE</i>	0,527	0,134	-0,311	0,126	0,219	-0,343	0,653
<i>sy7</i>	-0,092	-0,687	-0,296	-0,258	0,598	-0,024	-0,088
<i>syx1a</i>	-0,065	0,384	-0,578	-0,682	-0,148	0,159	-0,036
GLI en polen	-0,250	0,549	0,344	-0,136	0,698	-0,111	-0,012

Tabla A5.9. Correlación entre la concentración de pesticidas en polen y la expresión relativa de los genes estudiados, luego de la aplicación de pesticidas en el año 1. Valores Rho, S y p obtenidos a través de la prueba de correlación de Spearman.

Variables correlacionadas	Rho	S	p value
Concentración de GLI - <i>AChE</i>	0,150	102	0,708
Concentración de GLI - <i>brahma</i>	0,086	46	0,617
Concentración de GLI - <i>enolase</i>	0,583	50	0,108
Concentración de GLI - <i>pelle</i>	0,350	78	0,359
Concentración de GLI - <i>syx1a</i>	0,333	80	0,385
Concentración de GLI - <i>syx7</i>	-0,667	200	0,059
Concentración de CLOR - <i>AChE</i>	0,198	96,236	0,609
Concentración de CLOR - <i>brahma</i>	0,495	60,591	0,175
Concentración de CLOR - <i>enolase</i>	0,505	59,403	0,166
Concentración de CLOR - <i>pelle</i>	0,099	108,12	0,799
Concentración de CLOR - <i>syx1a</i>	0,505	59,403	0,166
Concentración de CLOR - <i>syx7</i>	-0,139	136,63	0,722

Tabla A5.10. Correlación entre la concentración de pesticidas en polen y la expresión relativa de los genes estudiados, luego de la aplicación de herbicidas en el año 2. Valores Rho, S y p obtenidos a través de la prueba de correlación de Spearman.

Variables correlacionadas	Rho	S	p value
Concentración de GLI - <i>AChE</i>	-0,633	196	0,076
Concentración de GLI - <i>brahma</i>	-0,267	152	0,493
Concentración de GLI - <i>enolase</i>	-0,333	160	0,385
Concentración de GLI - <i>pelle</i>	-0,550	186	0,133
Concentración de GLI - <i>syx1a</i>	0,200	96	0,613
Concentración de GLI - <i>syx7</i>	-0,200	144	0,613

Tabla A5.11. Importancia de los componentes para el análisis de componentes principales (PCA) en el año 1.

Desviación estándar, proporción de variabilidad y proporción de variabilidad acumulada para cada componente principal.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8
Desvío estándar	39,564	6,298	5,140	3,565	1,447	0,762	0,683	0,503
Proporción de varianza	0,950	0,024	0,016	0,008	0,001	0,0003	0,0002	0,0001
Proporción acumulada	0,950	0,974	0,990	0,998	0,9992	0,9996	0,9998	1,000

Tabla A5.12. Contribución de las expresiones génicas relativas y la concentración de pesticidas en polen en el año 1, a la variabilidad en cada componente principal. Se señala en negrita las variables que más aportan a los primeros 3 componentes.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8
<i>enolase</i>	0,018	0,007	0,062	0,264	0,010	0,708	-0,416	0,501
<i>pelle</i>	-0,000	0,066	-0,033	0,123	-0,920	-0,262	-0,180	0,179
<i>brahma</i>	-0,002	0,014	-0,015	0,108	-0,254	0,412	0,864	0,085
<i>AChE</i>	-0,004	0,008	0,246	0,917	0,121	-0,193	0,038	-0,210
<i>syx7</i>	-0,033	0,353	-0,900	0,217	0,064	0,041	-0,040	-0,099
<i>syx1a</i>	0,006	0,063	-0,062	0,059	0,264	-0,193	0,212	0,809
GLI en polen	0,991	0,130	0,014	-0,008	0,003	-0,005	0,007	-0,022
CLOR en polen	0,127	-0,922	-0,347	0,106	-0,026	-0,026	-0,002	0,031

Tabla A5.13. Importancia de los componentes para el análisis de componentes principales (PCA) en el año 2.

Desviación estándar, proporción de variabilidad y proporción de variabilidad acumulada para cada componente principal.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
Desvío estándar	1,830	1,165	1,042	0,838	0,510	0,419	0,260
Proporción de varianza	0,478	0,194	0,155	0,100	0,037	0,025	0,009
Proporción acumulada	0,478	0,673	0,828	0,928	0,965	0,990	1,000

Tabla A5.14. Contribución de las expresiones génicas relativas y la concentración de pesticidas en polen en el año 2, a la variabilidad en cada componente principal. Se señala en negrita las variables que más aportan a los primeros 3 componentes.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
<i>enolase</i>	0,466	-0,214	0,223	0,045	0,744	0,012	-0,360
<i>pelle</i>	0,467	-0,080	0,321	-0,204	-0,338	0,702	0,150
<i>brahma</i>	0,272	0,318	-0,676	0,332	0,249	0,314	0,310
<i>AChE</i>	0,477	0,099	-0,349	-0,053	-0,453	-0,250	-0,608
<i>Syx7</i>	0,465	-0,371	0,048	0,125	-0,131	-0,525	0,579
<i>Syx1a</i>	-0,105	-0,531	-0,502	-0,655	0,123	0,098	0,044
GLI polen	-0,187	-0,646	-0,115	0,632	-0,178	0,245	-0,209

