



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EL PAPEL DE LAS LEVADURAS EN LA NUTRICIÓN Y  
DEFENSA ANTE PATÓGENOS EN LA ABEJA *APIS*  
*MELLIFERA*

Tesis que presenta

CÉSAR HUMBERTO CANCHÉ COLLÍ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: *Opción Recursos Naturales*)

Mérida, Yucatán, México

2021



## **RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **César Humberto Canché Collí** titulado “**El papel de las levaduras en la nutrición y defensa ante patógenos en la abeja *Apis mellifera***”. fue realizado en la **Unidad de Recursos Naturales**, línea Servicios Ambientales de la Biodiversidad, en el laboratorio de Ecología y Evolución de las interacciones planta-animal del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**, bajo la dirección de la **Dra. María Azucena Canto Aguilar**, dentro de la opción de Recursos Naturales, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, septiembre de 2021

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

CÉSAR HUMBERTO CANCHÉ COLLÍ

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Recursos Naturales** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado **Nutrición y sanidad de las colonias de *Apis mellifera* a través de los aceites esenciales de la flora nativa y de levaduras simbióticas** (CONACYT 219922) bajo la dirección Dra. María Azucena Canto Aguilar y el apoyo técnico de la bióloga María Rosalina Rodríguez Román.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca número 242994 para poder realizar mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) y a la unidad de Recursos Naturales por todas las facilidades otorgadas para desarrollar mi trabajo doctoral.

A mi directora de tesis, la Dra. Azucena Canto, quien me recibió en su laboratorio y me brindó su amistad y confianza, así como valiosas enseñanzas dentro de mi formación científica. Sí se pudo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Rossana Rodríguez, Dr. Felipe Barahona y Dr. Luis Medina Medina, quienes me acompañaron estos cuatro años y de quienes recibí valiosas aportaciones que ayudaron a mejorar mi trabajo doctoral.

Un agradecimiento especial a la bióloga Rosalina Rodríguez Román, por su invaluable apoyo técnico en el laboratorio y en la logística de todos los experimentos y las publicaciones. Sin ella no sería posible.

A la bióloga marina Elisa Chan Vivas y la bióloga Abril Canul por su ayuda técnica en el laboratorio y en la logística de los experimentos.

A la Q.F.B. Matilde Ortiz por su ayuda técnica siempre atenta en el laboratorio de marcadores moleculares.

Al Dr. Humberto Estrella Maldonado por todo su apoyo y sus enseñanzas en los experimentos de PCR en tiempo real.

Al M. en C. Humberto Moo y a los técnicos Rodolfo Iuit, Víctor Iuit y Filiberto Bacab del Departamento de Apicultura del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (UADY) por su ayuda en los muestreos realizados en el apiario experimental.

A los estudiantes del programa Jóvenes Construyendo el Futuro, Norma Dzul Ek y Enrique Tzacun Saldívar por su ayuda en los apiarios y en los experimentos con *Nosema*.

A mis amigos y compañeros del grupo interacciones planta-animal, Diego Garza, Alex Castellanos, Alex Pérez, Abril Canul, Jean Arceo, Diana Jacinto y Carlos Castañeda por las enriquecedoras mañanas de seminarios de investigación.

A mis compañeros, amigos y colegas de la Unidad de Recursos Naturales que se convirtieron en parte de mi familia e hicieron muy agradable esta travesía. En especial a Alfred, Rosalina, Nahleli, Astrid, Katya, Lalo, Laura, Marypaz, Irvin, Duno, Gabriel Dzib, Luis Simá, Roberth Us, Filos y Pau. Al equipo de Voli.

A mi familia, que siempre ha estado allí con su ayuda y confianza.

## DEDICATORIAS

*A las mujeres de mi familia, quienes  
incansablemente me ayudaron, este logro  
también es suyo*

*A Haniel*



**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xviii</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
1.1 Levaduras.....	3
1.1.1 Circunscripción del término levadura.....	3
1.1.2 Simbiosis entre levaduras y otros organismos.....	3
1.1.3 Relación entre levaduras e insectos: escarabajos, mariposas, moscas y abejas.....	4
1.2 Levaduras y su relación con el estado nutricional en insectos.....	5
1.2.1 Estado nutricional en insectos.....	5
1.2.2 Indicadores del estado nutricional: sobrevivencia, peso corporal, cuerpos grasos y vitelogenina.....	7
1.3 Relación entre levaduras simbióticas, estado nutricional y defensa contra patógenos.....	8
1.3.1 Estado nutricional y defensa.....	8
1.3.2 El sistema de defensa de los insectos.....	8
1.4 Levaduras simbióticas, estado nutricional y defensa contra patógenos en <i>Apis mellifera</i> ...	11

## Índice

1.4.1 El sistema de defensa y sus componentes en <i>Apis mellifera</i> .....	13
1.4.2 Componente de defensa individual.....	13
1.4.3 Componente de defensa social.....	14
1.5 Patógenos de importancia en <i>Apis mellifera</i> : <i>Nosema ceranae</i> y <i>Nosema apis</i> .....	15
1.6 JUSTIFICACIÓN.....	16
1.7 HIPÓTESIS.....	17
1.8 OBJETIVOS.....	17
1.8.1 Objetivo general.....	17
1.8.2 Objetivos específicos.....	17
1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>21</b>
<b>LA IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN EL ESTADO NUTRICIONAL Y LOS COMPONENTES DE DEFENSA EN <i>Apis mellifera</i>.....</b>	<b>21</b>
2.1 INTRODUCCIÓN.....	21
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.2.1 Levaduras asociadas a <i>Scaptotrigona pectoralis</i> .....	22
2.2.2 Formulación de dietas.....	23
2.2.3 Abejas y diseño experimental.....	24
2.2.4 Variables de estudio.....	26
2.2.4.1 Supervivencia.....	26
2.2.4.2 Consumo de alimento.....	26

2.2.4.3 Cuerpos grasos.....	26
2.2.4.4 Expresión relativa de los genes <i>Vg</i> , <i>proPO</i> y <i>GOx</i> : extracción de ARN, síntesis de cADN y RT-qPCR.....	27
2.2.5 Análisis estadísticos.....	28
2.3 RESULTADOS.....	29
2.3.1 Supervivencia.....	29
2.3.2 Consumo de alimento.....	30
2.3.3 Cuerpos grasos.....	31
2.3.4 Expresión relativa de los genes <i>Vg</i> , <i>proPO</i> y <i>GOx</i> .....	32
2.4 DISCUSIÓN.....	35
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>41</b>
<b>PROTEIN NUTRITION INCREASES MIXED <i>Nosema</i> INFECTION AND MODULATES THE EXPRESSION OF IMMUNE RELATED GENES IN AFRICANIZED <i>Apis mellifera</i>.....</b>	<b>41</b>
ABSTRACT.....	41
KEYWORDS.....	41
3.1 INTRODUCTION.....	42
3.2 MATERIALS AND METHODS.....	43
3.2.1 Bees and hoarding cages.....	43
3.2.2 Diets.....	44
3.2.3 Identification of <i>Nosema ceranae</i> y <i>N. apis</i> in experimental colonies.....	45
3.2.4 <i>Nosema</i> inoculum.....	46
3.2.5 Experimental design and collective inoculation method.....	46

## Índice

3.2.6 Proportion of infected bees and <i>Nosema</i> spore density .....	47
3.2.7 Gene expression analysis.....	48
3.2.8 Survival.....	49
3.2.9 Food intake.....	49
3.2.10 Data analysis.....	50
3.3 RESULTS.....	51
3.3.1 Proportion of infected bees.....	51
3.3.2 <i>Nosema</i> spore density.....	51
3.3.3 Relative expression level (REL) of <i>Nosema ceranae</i> and <i>N. apis</i> .....	51
3.3.4 Survival.....	52
3.3.5 Food intake.....	53
3.3.6 Relative expression level (REL) of <i>Vg</i> , <i>proPO</i> , and <i>GOx</i> genes.....	53
3.4 DISCUSSION.....	56
3.5 CONCLUSIONS.....	59
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>61</b>
<b>INFLUENCIA DE LEVADURAS COMO SUSTITUTO ALIMENTICIO ANTE LA INFECCIÓN POR <i>Nosema</i> spp. EN ABEJAS <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADAS .....</b>	<b>61</b>
4.1 INTRODUCCIÓN.....	61
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
4.2.1 Levaduras asociadas a <i>Scaptotrigona pectoralis</i> .....	63
4.2.2 Abejas recién emergidas y grupos experimentales.....	64

4.2.3 Formulación de dietas.....	64
4.2.4 Suspensiones celulares de levaduras.....	65
4.2.5 Identificación de <i>Nosema ceranae</i> y <i>N. apis</i> en colonias experimentales.....	65
4.2.6 Inóculo de esporas de <i>Nosema ceranae</i> y <i>N. apis</i> .....	66
4.2.7 Inoculación colectiva de esporas.....	67
4.2.8 Variables de estudio.....	67
4.2.8.1 Expresión relativa de genes específicos de <i>Nosema ceranae</i> , <i>Nosema apis</i> , <i>Vg</i> , <i>proPO</i> y <i>GOx</i> : extracción de ARN, síntesis de cADN y RT-qPCR .....	67
4.2.8.2 Sobrevivencia.....	69
4.2.8.3 Consumo de alimento.....	69
4.2.8.4 Cuerpos grasos.....	70
4.2.9 Análisis estadísticos.....	70
4.3 RESULTADOS.....	68
4.3.1 Expresión relativa de genes específicos de <i>Nosema ceranae</i> y <i>N. apis</i> .....	68
4.3.1.1 <i>Nosema ceranae</i> .....	71
4.3.1.2 <i>Nosema apis</i> .....	72
4.3.2 Sobrevivencia.....	73
4.3.3 Consumo de alimento.....	74
4.3.4 Cuerpos grasos.....	76
4.3.5 Expresión relativa de los genes <i>Vg</i> , <i>proPO</i> y <i>GOx</i> .....	78
4.3.5.1 <i>vitelogenina (Vg)</i> .....	78

## Índice

4.3.5.2 <i>profenoloxidasa (proPO)</i> .....	79
4.3.5.3 <i>glucosa oxidasa (GOx)</i> .....	80
4.4 DISCUSIÓN.....	81
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>87</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	<b>91</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>91</b>
6.1 CONCLUSIONES.....	91
6.2 PERSPECTIVAS.....	92
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>95</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>121</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Fig. 1.1** Publicaciones científicas sobre la asociación simbiótica de levaduras en tres familias del orden Himenóptera: Vespidae (avispa), Formicidae (hormigas) y Apidae (abejas). Datos obtenidos de Web of Science (último acceso 21 febrero 2018).....**5**

**Fig. 1.2** Estrategia experimental.....**20**

### CAPÍTULO II

**Fig. 2.1** Cajas experimentales con abejas recién emergidas de *A. mellifera* en condiciones de oscuridad, temperatura de 36°C, humedad relativa de 70% y flujo constante de aire.....**24**

**Fig. 2.2** Diseño experimental de la evaluación de dietas enriquecidas con levaduras sobre el estado nutricional y los componentes de defensa en *A. mellifera*. En cada dieta, se establecieron nueve cajas experimentales, tres grupos con tres réplicas por grupo. En el diseño, el principal factor fue la dieta, y las réplicas y el tiempo se trataron como factores aleatorios.....**25**

**Fig. 2.3** Curvas de sobrevivencia de abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales doce días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola* 2, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*. Las líneas discontinuas en color negro indican el tiempo medio de sobrevivencia.....**29**

**Fig. 2.4** Consumo de alimento (promedio  $\pm$  EE) en abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola* 2, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.....**30**

**Fig. 2.5** Cuerpos grasos (promedio  $\pm$  EE) de abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola* 2, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.....**31**

**Fig. 2.6** Expresión relativa (Log10, promedio  $\pm$  EE) de *vitelogenina* (*Vg*) en abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola* 2, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.....**32**

**Fig. 2.7** Expresión relativa (Log10, promedio  $\pm$  EE) de *profenoloxidas*a (*proPO*) en abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola* 2, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.....**33**

**Fig. 2.8** Expresión relativa (Log10, promedio  $\pm$  EE) de *glucosa oxidasa* (*GOx*) en abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola* 2, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.....**34**

### CAPÍTULO III

**Fig. 3.1** Standard plastic cage designed to confine newly emerged bees infected with *Nosema* spores.....**44**

**Fig. 3.2** PCR amplification of representative forager bees sampled from different colonies during summer 2018 in the experimental apiary of the FVMZ. Lanes 1-3 indicates three different colonies amplified with *N. apis* primer (208-bp) and lane 4-6 with *N. ceranae* primer (250-bp). Lane 7 and 8 were used as negative control (NC) for both primers. Spore solution (100, 000 spores) obtained from infected bees was used as positive control for amplify *N. apis* (lane 9) and *N. ceranae* (lane10). 1 Kb was used as DNA ladder.....**46**

**Fig. 3.3** Diseño experimental de la evaluación del efecto del tipo de dieta sobre el nivel de infección de *Nosema* en abejas africanizadas de *A. mellifera*.....**47**

**Fig. 3.4** Proportion of uninfected (grey) and infected (pink) worker bees after ten days post-inoculation (A) with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose and pollen substitute.

*Nosema* spore density (average  $\pm$  SE) in worker bees inoculated with 50% sucrose (B) and pollen substitute (C).....51

**Fig. 3.5** Spore density (A) and Relative Expression Levels (REL) of *Nosema ceranae* (B) and *N. apis* (C) in worker bees inoculated with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose and pollen substitute. For visualization, the Y-axis of each plot was Log10 transformed. Each data point represents the average  $\pm$  SE.....52

**Fig. 3.6** Survival curves of uninoculated and inoculated bees with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose (A) and pollen substitute (B). The survival curves were compared according to Log-Rank test with  $p < 0.05$ . Dashed lines indicate median survival time.....52

**Fig. 3.7** Daily food intake (%) of uninoculated and inoculated bees with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose and pollen substitute. Each data point represents the average  $\pm$  SE.....53

**Fig. 3.8** Relative Expression Levels (REL) of *Vg* (A), *proPO* (B), and *GOx* (C) in worker bees inoculated and uninoculated with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose and pollen substitute. For visualization, the Y-axis of each plot was Log10 transformed. Each data point represents the average  $\pm$  SE.....54

## CAPÍTULO IV

**Figura 4.1** Diseño experimental de la evaluación de levaduras sobre la infección por *Nosema* en abejas africanizadas de *A. mellifera*.....63

**Figura 4.2** Expresión relativa de *Nosema ceranae* (promedio  $\pm$  DE) en abejas *A. mellifera* infectadas con *Nosema* y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.....72

**Figura 4.3** Expresión relativa de *Nosema apis* (promedio  $\pm$  DE) en abejas *A. mellifera* infectadas con *Nosema* y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.....73

**Figura 4.4** Curvas de sobrevivencia de abejas *A. mellifera* no infectadas (color verde) e infectadas con *Nosema* (color rojo) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (control), SP + *S. bombicola*, SP + *S. etchellsii*, SP + *S. bombicola* 2, SP + *Z. mellis* y SP + *S. cerevisiae*.....74

**Figura 4.5** Consumo de alimento (% , promedio  $\pm$  DE) en abejas *A. mellifera* no infectadas (panel A) e infectadas con *Nosema* (panel B) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.....76

**Figura 4.6** Cuerpos grasos acumulados (% , promedio  $\pm$  DE) en abejas *A. mellifera* no infectadas (color rojo) e infectadas con *Nosema* (color azul) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.....78

**Figura 4.7** Expresión relativa de *vitelogenina* (*Vg*) en abejas *A. mellifera* no infectadas (color rojo) e infectadas con *Nosema* (color azul) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.....79

**Figura 4.8** Expresión relativa de *profenoloxidasa* (*proPO*) en abejas *A. mellifera* no infectadas (color rojo) e infectadas con *Nosema* (color azul) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.....80

**Figura 4.9** Expresión relativa de *glucosa oxidasa* (*GOx*) en abejas *A. mellifera* no infectadas (color rojo) e infectadas con *Nosema* (color azul) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.....81

## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO III

<b>Table 3.1</b> Statistical results of Generalized Linear Models (GLMs) with gamma distribution (link = <i>log</i> ) for <i>Vg</i> , <i>proPO</i> , and <i>GOx</i> genes.....	<b>55</b>
--	-----------

### CAPÍTULO IV

<b>Tabla 4.1</b> Valores del criterio informativo de Akaike y criterio informativo Bayesiano (AIC y BIC) de quince modelos lineales mixtos (LMM) para analizar el porcentaje de consumo en abejas <i>A. mellifera</i> no infectadas e infectadas con <i>Nosema</i> y alimentadas con levaduras suplementadas en la dieta.....	<b>75</b>
---	-----------

<b>Tabla 4.2</b> Valores del criterio informativo de Akaike y criterio informativo Bayesiano (AIC y BIC) de cuatro modelos lineales mixtos (LMM) para analizar los cuerpos grasos en abejas <i>A. mellifera</i> no infectadas e infectadas con <i>Nosema</i> y alimentadas con levaduras suplementadas en la dieta.....	<b>77</b>
---	-----------



## ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AIC:** criterio informativo de Akaike

**ARN:** ácido ribonucleico

**cADN:** ADN complementario

**BIC:** criterio informativo Bayesiano

**FMVZ:** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**CI:** método de inoculación colectiva de abejas

**GLM:** modelo lineal generalizado

**GOx:** enzima glucosa oxidasa

**GOx:** gen que codifica para la enzima glucosa oxidasa

**HPG:** glándulas hipofaríngeas de las abejas

**IN:** método de inoculación individual de abejas

**LMM:** modelo lineal de efectos mixtos

**ML:** máxima verosimilitud

**MO:** microorganismos

**PO:** enzima fenoloxidasas

**proPO:** gen que codifica para la enzima inactiva profenoloxidasas

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa en tiempo real

**REL:** nivel de expresión relativa obtenido por RT-qPCR

## Abreviaturas

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**RPS5:** gen que codifica para la proteína ribosomal S5 de *Apis mellifera*

**SP:** sustituto de polen

**Vg:** gen que codifica para la proteína vitelogenina

**Vg:** proteína vitelogenina

## RESUMEN

La presencia de levaduras en el tracto intestinal de abejas sugiere un efecto directo en la nutrición de estos insectos. En estudios previos en colonias de abejas nativas sin aguijón en Yucatán, se aislaron las levaduras *Starmerella bombicola*, *Starmerella etchellsii*, *Starmerella bombicola 2* y *Zygosaccharomyces mellis* muy frecuentemente asociadas a las celdas con polen, miel y alimento larvario de la abeja nativa sin aguijón *Scaptotrigona pectoralis*. En este trabajo, estas levaduras fueron evaluadas experimentalmente como fuente de alimento de la abeja *Apis mellifera*. Se elaboraron dietas con cada levadura e incluimos a la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Se registró su efecto sobre la salud (sobrevivencia, consumo de alimento), la nutrición (cuerpos grasos), la defensa (genes *Vg* y *proPO*) y producción de sustancias antimicrobianas para esterilizar el alimento (gen *GOx*) en abejas recién emergidas. Se estableció un protocolo de infección colectiva de abejas *A. mellifera* con esporas de los microsporidios intestinales *Nosema ceranae* y *N. apis*. Se evaluó el efecto del consumo de sacarosa y un sustituto de polen sobre los niveles de infección de ambos patógenos. Además, se analizó el efecto de la infección con microsporidios sobre las variables de la salud y la defensa de las abejas. Finalmente, se evaluó el efecto antagonista de estas cinco levaduras adicionadas en la dieta sobre los patógenos *N. ceranae* y *N. apis* en abejas *A. mellifera* infectadas experimentalmente. Se encontró que el consumo de las levaduras no disminuyó la expresión génica en las variables de salud, nutrición y defensa de las abejas. El consumo de dietas con levaduras fue mayor que la dieta control. La expresión del gen *proPO* aumentó en las abejas que consumieron la dieta con *S. cerevisiae*. El consumo del sustituto de polen aumentó los niveles de infección de *N. ceranae* y *N. apis* en las abejas infectadas. Además, estas abejas experimentaron una rápida disminución de los genes *Vg*, *proPO* y *GOx*. Por otra parte, las abejas infectadas con *N. ceranae* y *N. apis* que consumieron la dieta con *S. bombicola 2* mostraron una sobrevivencia similar al de abejas sanas. Las abejas infectadas que consumieron la dieta con *S. cerevisiae* acumularon más cuerpos grasos. Además, el consumo de *S. cerevisiae* tuvo un efecto antagonista al disminuir los niveles de infección de *N. ceranae*. Los resultados sugieren que el consumo de las levaduras estudiadas, según la especie, puede contribuir positivamente a la salud y la inmunidad de las abejas. Potencialmente podrían emplearse en la nutrición suplementaria de *A. mellifera* para estimular la nutrición y la defensa contra patógenos como *N. ceranae*.



## ABSTRACT

The presence of yeasts in the intestinal tract of bees suggests a direct effect on the nutrition of these insects. In previous studies in colonies of native stingless bees in Yucatan, the yeasts *Starmerella bombicola*, *Starmerella etchellsii*, *Starmerella bombicola 2* and *Zygosaccharomyces mellis* were isolated, very frequently associated with cells with pollen, honey, and larval food of the native stingless bee *Scaptotrigona pectoralis*. In this work, these yeasts were experimentally evaluated as a food source for the bee *Apis mellifera*. Diets were made with each yeast, and *Saccharomyces cerevisiae* enriched diet was also included as a positive control. In newly emerged bees fed with these diets were registered survival, food consumption, accumulated fatty bodies, and the expression of the *Vg*, *proPO* and *GOx* genes. A protocol was established for the collective infection of *A. mellifera* bees with spores of the intestinal microsporidians *Nosema ceranae* and *N. apis*. The effect of the consumption of sucrose and pollen substitute diets, on the infection levels of both pathogens, was evaluated. The effect of microsporidia infection on the health and defense variables of bees was also analyzed. Finally, the antagonistic effect of these five yeasts added in the diet on the pathogens *N. ceranae* and *N. apis* was evaluated in infected *A. mellifera* bees. It was found that the consumption of yeasts did not reduce gene expression in the variables of health, nutrition and defense of bees. The consumption of yeast diets was higher than the control diet. The expression of the *proPO* gene increased in the bees that consumed the diet with *S. cerevisiae*. Consumption of the pollen substitute increased the infection levels of *N. ceranae* and *N. apis* in infected bees. In addition, these bees experienced a rapid decline in *Vg*, *proPO*, and *GOx* genes. On the other hand, bees infected with *N. ceranae* and *N. apis* that consumed the diet with *S. bombicola 2* showed a survival similar to healthy bees. The infected bees that consumed the diet with *S. cerevisiae* accumulated more fatty bodies. Furthermore, the consumption of *S. cerevisiae* had an antagonistic effect by reducing the infection levels of *N. ceranae*. The results suggest that the consumption of the yeasts studied, can contribute positively to the health and immunity of bees. Yeasts evaluated could potentially be used in the supplementary nutrition of *A. mellifera* to maintain the health of bees and the defense against pathogens such as *N. ceranae*.

---



## INTRODUCCIÓN

La nutrición sostiene el funcionamiento de los procesos biológicos en los seres vivos, sobre todo en los heterótrofos. En las abejas melíferas, las deficiencias en la nutrición representan un contribuyente clave en los actuales problemas de salud a nivel global, sin olvidar el efecto simultáneo de otros factores como la exposición a nuevos patógenos, el cambio climático, los pesticidas, etc. (Goulson *et al.*, 2015). Estas deficiencias nutricionales son de dos tipos: de baja calidad (nutrición empobrecida) y de baja cantidad, ambos se deben a la baja disponibilidad espacio-temporal de recursos néctar-poliníferos; y se explican por la intensificación de la agricultura (monocultivos) y la pérdida de áreas naturales (Mola *et al.*, 2021).

Mediante la investigación sobre la nutrición de las abejas se ha tratado de contrarrestar los problemas de salud en las colonias manejadas. Numerosas dietas artificiales se han elaborado para sustituir o complementar la dieta natural usando proteínas y vitaminas de fuentes alternas como la leche, el trigo o la levadura de cerveza (Paray *et al.*, 2021). Sin embargo, estas dietas artificiales han mostrado baja eficacia para promover la salud y la nutrición. Estas dietas se han elaborado bajo la premisa de que los requerimientos nutricionales de las abejas únicamente se obtienen del polen y el néctar (Brodschneider y Crailsheim, 2010). Las dietas artificiales han tratado de aportar nutrimentos similares a los del polen y el néctar. Sin embargo, se ha ignorado que, de forma natural, ciertas comunidades de microorganismos (MO) están ligadas a la dieta de las abejas.

Un enfoque conceptual reciente ha retomado la importancia ecológica y evolutiva de los microorganismos asociados a las abejas. Específicamente, de aquellos que interactúan con sus alimentos y su nutrición (Retschnig *et al.*, 2021; Engel *et al.*, 2016; Crotti *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2011). Aunque aún no existen conclusiones sobre este tema, en otros modelos de estudio, como en *Drosophila*, se ha demostrado que los microorganismos asociados cumplen un papel como potenciadores de la nutrición y de otros procesos como la inmunidad (Anagnostou *et al.*, 2010; Vass y Nappi, 1998). En las abejas melíferas, un conjunto particular de levaduras, caracterizadas por su vida microscópica, se asocian naturalmente a los compartimentos que almacenan el polen y la miel, otras se asocian a las diferentes regiones del tracto intestinal (Rosa *et al.*, 2003; Gilliam, 1972). El potencial de estas levaduras para promover la salud y la nutrición de las abejas aún se desconoce y constituye un área de investigación en desarrollo.

Determinar la diversidad de levaduras asociadas a las abejas es una tarea importante para conocer el número de especies presentes y sus relaciones, y para lograrlo, las herramientas moleculares son imprescindibles (Ludvigsen *et al.*, 2021; Detry *et al.*, 2020). Por otra parte, para dilucidar la contribución de estas levaduras en la nutrición de las abejas, la investigación experimental *in vivo* y el uso de dietas específicas son aproximaciones fundamentales. Ambas aproximaciones permiten evaluar directamente el efecto de estos microorganismos, después de ser consumidos, sobre variables de la salud, la nutrición y la defensa (Williams *et al.*, 2013). Adicionalmente, se puede ganar una mayor comprensión del papel de las levaduras asociadas a las abejas mediante la evaluación de su potencial antagonista en un contexto de infección (Pozo *et al.*, 2020). Para esto, se pueden tomar como modelos de estudio patógenos intestinales importantes en las abejas, como los microsporidios del género *Nosema*, por ejemplo. Este trabajo doctoral desarrolló este conjunto de aproximaciones experimentales estudiando un grupo selecto de levaduras asociadas a la alimentación de la abeja nativa *Scaptotrigona pectoralis*. La síntesis de este trabajo permitirá enriquecer el conocimiento del papel que cumplen estos microorganismos en la biología de las abejas melíferas, tomando como modelo de estudio a la abeja europea *Apis mellifera*.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Levaduras

##### 1.1.1 Circunscripción del término levadura

Las levaduras son hongos microscópicos que se incluyen en las divisiones Ascomycota y Basidiomycota del reino fungi. Poseen un ciclo de vida unicelular y se caracterizan por su reproducción asexual mediante la gemación y la fisión (Kurtzman y Boekhout, 2017). Además, desarrollan estados sexuales sin formar cuerpos fructíferos multicelulares (Kurtzman *et al.*, 2011).

##### 1.1.2 Simbiosis entre levaduras y otros organismos

En ecología, se define como simbiosis, en un sentido amplio, a la estrecha asociación que existe entre dos especies que viven en cercanía (Price, 2002). Dentro de este concepto general se encuentran tres tipos de asociación ampliamente documentados: a) relaciones que ofrecen beneficios para ambas especies, denominado mutualismo (++), b) relaciones en donde al menos una especie experimenta efectos negativos, como el parasitismo (+-), y c) relaciones en donde una especie se beneficia sin ningún efecto para la otra, como el comensalismo (+0) (Mittelbach y Vannette, 2017; Price, 2002).

Las levaduras son microorganismos que establecen relaciones de simbiosis con una diversidad de organismos macroscópicos y microscópicos (Ganter, 2006). Por ejemplo, los virus ScV-M1 y ScV-M2 (Totiviridae) se asocian a *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosaccharomyces bailii* (Schmitt y Breinig, 2006); la bacteria *Staphylococcus aureus* puede formar biopelículas con la levadura *Candida albicans* (Peters *et al.*, 2010); la levadura *Ogatea pini* puede promover el crecimiento del hongo *Entomocorticium* sp. (Davis *et al.*, 2011); la alga *Chlamydomonas reinhardtii* puede fijar el CO<sub>2</sub> liberado por *S. cerevisiae* (Hom y Murray 2014); la levadura *Sporobolomyces roseus* se asocia a las hojas de *Zea mays* y reduce la ovoposición del insecto *Ostrinia nubilalis* (Martin *et al.*, 1993); las levaduras *Debaryomyces hansenii* y *Rhodotorula mucilaginosa* se observan asociadas al intestino de los salmones *Salmo salar*, *Oncorhynchus kisutch* y *O. mykiss* (Raggi *et al.*, 2014); las levaduras también se asocian con diversos grupos de insectos (Ganter, 2006).

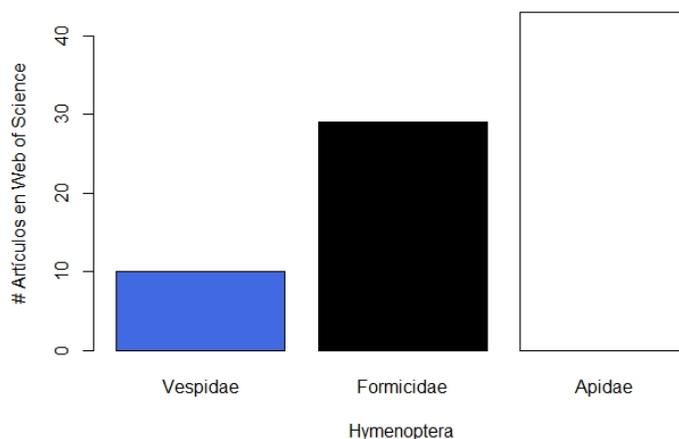
### 1.1.3 Relación entre levaduras e insectos: escarabajos, mariposas, moscas y abejas

La relación entre los insectos y las levaduras representa una de las interacciones simbióticas más relevantes desde una perspectiva ecológica y evolutiva. A nivel global, los insectos representan más de la mitad de las especies descritas (57.5%, aprox. 990, 000 spp.) (Price, 2002) y el éxito evolutivo de varios linajes involucra la simbiosis con microorganismos (Blackwell, 2017). Esta asociación se describe en grupos importantes como los escarabajos (Coleóptera 350, 000 spp.), las abejas, abejorros y avispas (Himenóptera 150, 000 spp.), las mariposas (Lepidóptera 160, 000 spp.) y las moscas (Díptera 125, 000 spp.) (Blackwell, 2017; Starmer y Lachance, 2011). En los insectos, las levaduras simbióticas se han observado en el tracto digestivo, en diferentes fases de su ciclo de vida y en sus alimentos (Starmer y Lachance, 2011; Ganter, 2006). Las principales contribuciones de las levaduras simbióticas se han documentado en:

- ❖ La **alimentación**. Proveen de nutrimentos esenciales (p. ej., esteroides, vitaminas y aminoácidos). Por ejemplo, en moscas de la fruta (*Drosophila* sp.), larvas de escarabajos (Nitidulidae) y saltadores de hojas (*Nilaparvata lugens*) (Starmer y Lachance, 2011; Sasaki *et al.*, 1996; Starmer y Aberdeen, 1990).
- ❖ La **reproducción**. Aportan nutrimentos necesarios para el desarrollo de huevos. Por ejemplo, en las moscas de la fruta (*Drosophila* sp.) y *Chrysopa carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) (Starmer y Lachance, 2011; Bradley y Simmons, 1997). Incluso, se documenta que su presencia determina la expresión sexual en la cochinilla *Stictococcus diversisetae* (Starmer y Lachance, 2011).
- ❖ La **protección** contra patógenos. La presencia de levaduras (p. ej., *S. roseus*) en la superficie foliar de *Triticum aestivum* reduce el establecimiento de fitopatógenos (Fokkema *et al.*, 1983).
- ❖ La **modificación del hábitat**. *Candida ingens* puede metabolizar los ácidos grasos de los tejidos en descomposición de *Stenocereus thurberi*, esto reduce los efectos tóxicos para las larvas de *D. mojavensis* (Starmer y Aberdeen, 1990).

Entre los insectos, destaca el orden Himenóptera, el cual cuenta con 86 referencias científicas que sugieren una asociación simbiótica con levaduras según los datos de Web of Science: 10 en Vespidae (avispa), 29 en Formicidae (hormigas) y 43 en Apidae (abejas) (**Fig. 1.1**). En las

abejas, se observa que el gran número de levaduras asociadas se relacionan filogenéticamente con especies del clado *Starmerella* (Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003). Algunos autores señalan que existe una limitada exploración científica sobre la posible simbiosis que existe entre las levaduras y los insectos de importancia ecológica y económica como son las abejas melíferas (Starmer y Lachance, 2011; Ganter, 2006).



**Figura 1.1** Publicaciones científicas sobre la asociación simbiótica con levaduras en tres familias del orden Himenóptera: Vespidae (avispa), Formicidae (hormiga) y Apidae (abeja). Datos obtenidos de Web of Science (último acceso 21 febrero 2018).

## 1.2 Levaduras y su relación con el estado nutricional en insectos

### 1.2.1 Estado nutricional en insectos

En los insectos, el estado nutricional se refiere a la información cualitativa y cuantitativa de los nutrientes esenciales detectables en la hemolinfa (Simpson, 1995). Estos nutrientes corresponden a aminoácidos, proteínas, lípidos y carbohidratos (House, 1962), los cuales participan en la producción de energía, en el mantenimiento de procesos bioquímicos y en el crecimiento y desarrollo (De Boer, 1995). Bajo este concepto también se incluyen los tejidos que actúan como reservas nutritivas, entre estos se pueden citar a los cuerpos grasos y proteínas como la vitelogenina, ambos informan sobre la condición nutricional (Toth *et al.*, 2005; Chapman y Boer, 1995). Los insectos no pueden sintetizar algunos nutrientes esenciales y requieren una fuente exógena (Blackwell, 2017). En algunos casos, la simbiosis con levaduras ha permitido resolver estas deficiencias nutricionales (Kaufman *et al.*, 2000) mediante la concentración, la descomposición o la liberación de nutrientes que realizan estos microorganismos (Mittelbach y Vannette, 2017). Algunos beneficios nutricionales de las levaduras simbióticas se han descrito en algunos modelos de estudio.

En la relación cactus-levadura-*Drosophila*, las moscas se asocian a un grupo especializado de levaduras. Estas levaduras crecen en los tejidos en descomposición de ciertas cactáceas y representan una fuente de alimento para las larvas de moscas (Mittelbach y Vannette, 2017). Las levaduras aportan un gran contenido de nitrógeno porque su contenido es mayor (8%) que el de los tejidos vegetales (0.3-0.5%) (Starmer y Aberdeen, 1990). En las moscas adultas, las levaduras colonizan los intestinos (Stefanini, 2018) y suministran esteroides, vitaminas y nitrógeno necesarios para la maduración de huevos (Starmer y Lachance, 2011). Las larvas y los adultos de la hormiga *Cyphomyrmex rimouentesus* también ingieren directamente células de levaduras, específicamente del género *Leucocoprinus* (Mueller *et al.*, 1998).

En el sistema flor-levadura-escarabajos, escarabajos de la familia *Nitidulidae* que visitan flores efímeras de cactáceas se asocian a un grupo de levaduras florícolas (*Metschnikowia*, *Kodamaea* y *Wickerhamiella*) (Lachance *et al.*, 2001). Las larvas de los escarabajos dependen de estas levaduras para completar su desarrollo; en los escarabajos adultos, estas levaduras colonizan el tracto intestinal. Se ha propuesto que estos microorganismos transforman los tejidos florales poco digeribles en sustratos ricos en nutrientes para los escarabajos (Starmer y Lachance, 2011).

Los escarabajos ambrosía (subfamilias Scolytinae y Platypodinae) exhiben un mutualismo obligado con hongos dimórficos (fase de levadura y fase multicelular), los cuales utilizan como alimento. Estos escarabajos usan estructuras especializadas (micangios) para transportar a las levaduras (p. ej., *Ambrosiella*) hasta los nidos, en donde son cultivadas para la alimentación de las larvas (Ganter, 2006). En los escarabajos Anobiidae (p. ej., *Lasioderma serricorne* y *Stegobium paniceum*) las levaduras de hongos dimórficos (p. ej., *Symbiotaphrina*) que habitan el tracto intestinal contribuyen con vitaminas y esteroides (Nasir y Noda, 2003).

Otros grupos de insectos también muestran una asociación simbiótica con levaduras. En algunas especies de Chrysopidae (p. ej., *Chrysoperla carnea*, Neuróptera) los insectos adultos albergan levaduras en el estómago, estas levaduras aportan aminoácidos que los insectos no obtienen de su dieta principal constituida de excreciones de áfidos (Starmer y Lachance, 2011; Ganter, 2006).

En el saltahojas marrón *Nilaparvata lugens* (Homoptera), las levaduras (hongos dimórficos) presentes en la hemolinfa aportan aminoácidos que estos insectos no logran obtener de la savia de las plantas (Wilkinson y Ishikawa, 2001). Además, se ha observado que en *N. lugens*

las levaduras pueden reciclar los desechos nitrogenados. El ácido úrico que sintetizan los insectos se almacena en los tejidos y es reciclado (Sasaki *et al.*, 1996).

### 1.2.2 Indicadores del estado nutricional: sobrevivencia, peso corporal, cuerpos grasos y vitelogenina

En los insectos, un conocimiento preciso del estado nutricional requiere conocer información cualitativa y cuantitativa de los nutrimentos presentes en la hemolinfa (Simpson, 1995). Sin embargo, otras variables sin relación directa con la hemolinfa, pueden ser indicadores confiables de la condición nutricional (Manning *et al.*, 2007; Standifer *et al.*, 1960).

La sobrevivencia resume la proporción relativa de individuos vivos respecto al total inicial en un tiempo determinado. Es una variable utilizada con frecuencia para evaluar el efecto de diferentes dietas o el consumo de microorganismos (Manning *et al.*, 2007; House, 1962). Por ejemplo, Lee y Hou (1987) evaluaron la importancia de levaduras simbióticas en *N. lugens* tomando en cuenta la sobrevivencia de los individuos. Bruins *et al.* (1991) observaron a través de datos de sobrevivencia que la adición de levaduras en la dieta de *D. melanogaster* disminuyó la mortalidad de las larvas y pupas.

El peso de los insectos es una variable útil para conocer el estado nutricional (House, 1962). Wilkinson y Ishikawa (2001) observaron que la eliminación de levaduras simbióticas en *N. lugens* disminuyó el peso de los individuos. Mankowski y Morrell (2004) se basaron en el peso de individuos de *Camponotus vicinus* (Formicidae) para estudiar el efecto de la levadura *Debariomyces polymorphus* en la dieta. Fischman *et al.* (2017) también cuantificaron el peso para estudiar el efecto de diferentes dietas en la abeja *Megachile rotundata*.

Un indicador confiable del estado nutricional de los insectos es el cuerpo graso (Standifer *et al.*, 1960). Es un órgano localizado debajo del integumento que rodea los intestinos y los órganos reproductivos. Es fundamental en la vida de los insectos porque regula múltiples funciones como: metabolismo de lípidos (ácidos grasos, triglicéridos) y proteínas, síntesis de proteínas y metabolismo de aminoácidos y nitrógeno (Arrese *et al.*, 2010). Su función primaria es almacenar reservas energéticas en forma de triglicéridos, glicógeno y proteínas (Hahn y Denlinger, 2011), las cuales se liberan según las demandas energéticas. De tal forma, que la cuantificación de cuerpos grasos ofrece información vital del estado nutricional (Toth y Robinson, 2005).

En las abejas, la vitelogenina (Vg) es una (fosfolipoglico-) proteína multifuncional que también aporta información relevante del estado nutricional (Amdam *et al.*, 2012). La expresión del gen que codifica para Vg es sensible al nivel de nutrientes presentes en la hemolinfa, por ejemplo, responde positivamente al nivel de aminoácidos (Amdam *et al.*, 2012). Su función primaria es el aporte de macronutrientes (p. ej., lípidos) a los embriones en desarrollo. Pero, también regula la conducta de las abejas obreras como el inicio y la especialización de forrajeo (polen o néctar) y la duración del cuidado de las crías (nodricismo) (Corona *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007). Asimismo, modula el tiempo de vida debido a su aporte nutrimental, su efecto positivo contra el estrés oxidativo y su relación con la inmunidad (Seehuus *et al.*, 2006). El nivel de vitelogenina varía según la edad de la abeja y su labor, siendo mayor en abejas nodrizas; altos niveles de vitelogenina se asocian con mayores tiempos de vida (Antúñez *et al.*, 2013).

### **1.3 Relación entre levaduras simbióticas, estado nutricional y defensa contra patógenos**

#### 1.3.1 Estado nutricional y defensa

La contribución nutrimental (p. ej., esteroides) que realizan las levaduras simbióticas no solo promueve el estado nutricional de los insectos, sino que también afecta otros procesos fundamentales como la defensa contra patógenos.

En cualquier ser vivo, la activación de las respuestas de defensa significa un alto costo en términos de energía y de recursos (Schmid-Hempel, 2005; Lochmiller y Dasoerenberg, 2000), estableciéndose un fuerte vínculo con el estado nutricional (DeGrandi-Hoffman y Chen, 2015). Por ejemplo, las proteínas brindan los aminoácidos esenciales para la síntesis de péptidos (péptidos antimicrobianos, PAM) cuya función es eliminar patógenos (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2009), mientras que los carbohidratos proveen la energía necesaria para el funcionamiento de los procesos implicados en las respuestas de defensa (DeGrandi-Hoffman y Chen, 2015).

#### 1.3.2 El sistema de defensa de los insectos

Los insectos carecen de un sistema inmune adaptativo como el que poseen los vertebrados, el cual consta de anticuerpos (linfocitos) que reconocen patógenos específicos y generan memoria inmunológica (Cremer y Sixt, 2009; Nappi y Ottaviani, 2000). Esta memoria permite al organismo responder más rápido cuando se enfrenta a un patógeno con el que previamente tuvo contacto (Schmid-Hempel, 2005). En los insectos, la defensa se basa fundamentalmente en un conjunto de respuestas innatas (Soderhall y Cerenius, 1998), que según sus

características se puede reconocer como “sistema inmune”, debido a su marcada homología con los vertebrados (p. ej., péptidos antimicrobianos, fagocitosis, genes ortólogos) (Evans *et al.*, 2006; Hoffman, 2003). Este sistema permite tener una capacidad de respuesta eficaz frente al ataque de parásitos y patógenos.

Según Schmid-Hempel y Hebert (2005), la defensa de cualquier organismo consta de múltiples componentes que se interconectan y actúan en sinergia. En los insectos, los modelos de estudio como *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, *Bombyx mori* y *Anopheles* han permitido identificar los principales componentes de defensa que involucran células específicas (respuesta celular), moléculas tóxicas (respuesta humoral) y varias vías de señalización y reconocimiento de patógenos (Cao *et al.*, 2015; Clayton *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2013; Lemaitre y Hoffmann, 2007). Es posible categorizar estos componentes de defensa en diferentes líneas:

La primera consta de barreras físicas como la cutícula del exoesqueleto y la membrana peritrófica (protecciones inespecíficas), ambas impiden la adhesión y el acceso de patógenos al interior del cuerpo (Evans y Spivak, 2010; Schmid-Hempel y Hebert, 2005). La cutícula es una estructura rígida e impermeable que protege contra el daño mecánico. Por su parte, la membrana peritrófica protege las células del tracto digestivo, los túbulos de Malpighi y los órganos reproductivos (Evans y Spivak, 2010).

La segunda línea de defensa es el “sistema inmune”, el cual se activa cuando los patógenos atraviesan las barreras físicas (Hoffman, 2003). Este sistema se basa en una respuesta celular y una respuesta humoral, ambos regulados por receptores de reconocimiento y por vías de señalización (Tsakas y Marmaras, 2010). La respuesta celular involucra células llamadas hemocitos, especializadas de reconocer, controlar y eliminar patógenos mediante: a) la fagocitosis, que implica la digestión de cuerpo extraños; b) la nodulación, que implica la agregación de hemocitos para inmovilizar y eliminar bacterias; y c) la encapsulación, que consiste en la adhesión de hemocitos a patógenos de gran tamaño combinado con la producción de quinonas tóxicas y la melanización (síntesis y deposición de melanina alrededor del patógeno) (Wilson-Rich *et al.*, 2009; Schmid-Hempel, 2005). Los tipos de hemocitos y su nomenclatura varían entre los insectos, aunque conservan funciones similares (Tsakas y Marmaras, 2010); los más comunes son los prohemocitos, los granulocitos y los plasmacitos (Wilson-Rich *et al.*, 2009).

La respuesta humoral consiste en la síntesis y liberación de elementos extracelulares a la hemolinfa, los cuales pueden reconocer sustancias extrañas, destruir directamente patógenos o funcionar como factores de activación celular (Nappi y Ottaviani, 2000). La síntesis de estos elementos ocurre en los cuerpos grasos, en los hemocitos y en menor grado en el intestino y órganos reproductivos (Schmid-Hempel, 2005). Los principales elementos humorales observados en los insectos son los péptidos antimicrobianos (PAM), la cascada de la enzima fenoloxidasa (melanización, producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno), las lectinas y las lisozimas.

Los péptidos antimicrobianos son moléculas (15-20 aminoácidos) sintetizadas en el cuerpo graso y los hemocitos, y se encargan de eliminar microorganismos al inhibir la síntesis de proteínas de la membrana celular o formar poros en la membrana provocando lisis (Nappi y Ottaviani, 2000). Los tipos de péptidos antimicrobianos varían entre las especies de insectos, por ejemplo, en *Drosophila* se reconocen veinte y en *Anopheles* solo nueve (Evans *et al.*, 2006). En total, se han descrito 150 péptidos antimicrobianos, los cuales se asignan a cuatro grupos: a) cecropinas, b) ricos en cisteína, c) ricos en prolina y d) ricos en glicina (Nappi y Ottaviani, 2000).

Una enzima importante en la respuesta humoral es la fenoloxidasa (PO, siglas en inglés), la cual es responsable de la formación del pigmento melanina (melanogénesis) y su deposición alrededor de un patógeno durante la encapsulación (melanización) (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012). Cuando los hemocitos detectan un cuerpo extraño inician la secreción de quimio-atrayentes para reclutar numerosos plasmotocitos que forman una pared multicelular. Los plasmotocitos sintetizan melanina que finalmente se deposita sobre el patógeno formando una capa que limita su crecimiento y reproducción y lleva a su muerte (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012). La enzima fenoloxidasa convierte al aminoácido fenilalanina en tirosina; después la tirosina es transformada en dihidroxifenilalanina (dopa), luego es convertida en dopaquinona y finalmente se polimeriza en melanina. El precursor de la PO es la enzima inactiva profenoloxidasa (proPO).

La melanina no es tóxica, pero durante la cascada de reacciones enzimáticas que produce la PO se generan intermediarios como quinonas tóxicas, difenoles, superóxidos, peróxido de hidrógeno e intermediarios reactivos de nitrógeno que actúan contra bacterias gram-positivas y negativas, hongos y agentes virales (Wilson-Rich *et al.*, 2009). Las especies reactivas de

oxígeno y nitrógeno que se producen dañan las proteínas, el ADN y las membranas ocasionando un estrés oxidativo que deteriora la estructura y la función de los patógenos.

Además de su rol en la melanización, la cascada del sistema proPO puede estimular otras reacciones celulares como la fagocitosis, la nodulación, la encapsulación y la adhesión de hemocitos. Esta cascada es activada por proteasas de serina que se presentan en forma inactiva en los hemocitos, las cuales se activan en respuesta a los glucanos de hongos, peptidoglicanos bacterianos o lipopolisácaridos de bacterias gram-negativas.

Otros elementos humorales son las lectinas, que son proteínas que aglutinan células bacterianas u otros materiales que tengan un oligosacárido de complementariedad apropiada. Su papel parece ser el reconocimiento de partículas extrañas para facilitar la fagocitosis (opsonización) (Nappi y Ottaviani, 2000). Otras proteínas antibacterianas son las lisozimas que se sintetizan en el tracto digestivo, las cuales digieren las paredes celulares de bacterias gram-positivas y negativas (Schmid-Hempel, 2005).

Un aspecto fundamental en la activación del sistema inmune son las vías de señalización enfocadas en reconocer patógenos y en activar, modular y producir las respuestas celulares y humorales. Se reconocen cuatro vías interconectadas que responden ante los patógenos: las vías Toll, Imd, Jak/STAT y Jnk (siglās en inglés). Estas vías involucran proteínas de reconocimiento de patógenos, proteínas que modulan y amplifican las señales y proteínas efectoras que eliminan directamente patógenos (Evans *et al.*, 2006). La vía Toll regula la expresión de péptidos antimicrobianos contra bacterias gram-positivas y hongos (Lemaitre y Hoffmann, 2007), la vía Imd regula la producción de péptidos contra bacterias gram-negativas (Wilson-Rich *et al.*, 2009), mientras que se propone que la vía Jak/STAT está asociada con factores de opsonización (fagocitosis) (Tzou *et al.*, 2002), y la vía Jnk está implicada en la cicatrización de heridas (Lemaitre y Hoffmann, 2007).

#### **1.4 Levaduras simbióticas, estado nutricional y defensa contra patógenos en *Apis mellifera***

La asociación simbiótica con levaduras es un rasgo que comparten las abejas solitarias como *Megachile*, y las sociales, como las abejas sin aguijón y *A. mellifera* (Pimentel *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2003; Gilliam *et al.*, 1974). Se ha planteado que el principal reservorio de levaduras es la colonia, en este sitio, las levaduras encuentran diversos nichos para establecerse

(Brysch-Herzberg, 2004); en menor grado, el cuerpo de las abejas también actúa como un reservorio natural (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2009).

En *A. mellifera*, las levaduras simbióticas se han aislado en fuentes importantes de alimento, así como en el cuerpo de los individuos (Canto y Herrera, 2012; Herrera *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2003; Gilliam, 1997; Sandhu y Waraich, 1985), por ejemplo en:

- ❖ recursos florales: néctar y polen
- ❖ provisiones de alimento: miel, polen y alimento de larvas
- ❖ cuerpo de los insectos: probóscide y tracto digestivo
- ❖ diferentes fases del ciclo de vida: larvas y abejas adultas

Durante la alimentación de las abejas melíferas, el néctar y el polen recolectado de las flores experimentan una serie de cambios físico-químicos antes de su consumo, estos cambios inician en el tracto digestivo y finalizan en la colmena (Gilliam, 1997; Seeley, 1995). Ciertas regiones del tracto digestivo y las reservas de alimento de las colonias son colonizadas con frecuencia por levaduras simbióticas (Spencer y Spencer, 1997).

Especies de los géneros *Candida* y *Zygosaccharomyces* se han registrado en la probóscide de las abejas, órgano que sirve para la recolección y el traspaso de néctar entre abejas (Brysch-Herzberg, 2004). En la parte media del tracto digestivo, en donde inicia la transformación bioquímica de néctar a miel, se han observado levaduras como *C. apicola* (Sandhu y Waraich, 1985). Además, el néctar recolectado es almacenado y mezclado con enzimas secretadas por las glándulas hipofaríngeas (HPG, siglas en inglés) en presencia de levaduras. El intestino medio, en donde ocurre la absorción nutrimental, también es una región colonizada por levaduras de los géneros *Candida* y *Metschnikowia*. Al interior de las colonias, se ha reportado la presencia de especies de los géneros *Starmarella*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* en las celdas con miel (Rosa *et al.*, 2003; Ruíz-Argüeso y Rodríguez-Navarro, 1975). En las celdas, el polen almacenado experimenta un cambio bioquímico en presencia de microorganismos procedentes de la saliva o del néctar. El metabolismo microbiano (p. ej., fermentación láctica) participa en la conversión del polen a “pan de abeja”, que es un alimento enriquecido nutrimentalmente (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2009). Algunas levaduras observadas en este proceso pertenecen a los géneros *Candida*, *Metschnikowia* y *Starmarella* (Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003; Gilliam, 1979).

La evidencia sugiere que las levaduras simbióticas tienen un fuerte vínculo con la nutrición de las abejas, que puede estar relacionado con la pre-digestión de los alimentos y con el aporte de nutrimentos esenciales (Starmer y Lachance, 2011; Rosa *et al.*, 2003; Gilliam, 1997). Por ejemplo, DeGrandi-Hoffman *et al.* (2009) señalaron que las levaduras presentes en el pan de abeja sintetizan y añaden vitaminas B.

Además de mostrar una asociación con la nutrición de las abejas, las levaduras simbióticas pueden afectar procesos regulados a través de la misma nutrición como son las respuestas de defensa. Un adecuado estado nutricional provee los elementos básicos para la síntesis de proteínas que participan en el reconocimiento y la eliminación de patógenos (defensa humoral) (DeGrandi-Hoffman y Chen, 2015).

Se reconoce que los actuales problemas de salud que experimentan las abejas en diversas regiones del mundo comparten un fuerte vínculo con alteraciones nutrimentales. Posiblemente, un desbalance de las comunidades microbianas asociadas a la nutrición de las abejas puede conducir a una digestión incompleta y a deficiencias de vitaminas y aminoácidos (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2009). De ser así, las levaduras simbióticas pueden ser un componente clave en la nutrición y es factible su uso para promover el estado nutricional y los componentes de defensa. Actualmente, la investigación internacional se ha enfocado en estudiar la nutrición de las abejas, su relación con las respuestas de defensa y la participación de microorganismos (DeGrandi-Hoffman y Chen, 2015).

#### 1.4.1 El sistema de defensa y sus componentes en *Apis mellifera*

Las abejas melíferas son insectos eusociales que forman colonias y los individuos mantienen contactos cercanos, comparten alimentos y experimentan largos períodos de confinamiento, estas condiciones favorecen la propagación de patógenos (DeGrandi-Hoffman y Chen, 2015). En la fase adulta (> 15-20 días), las abejas se especializan en coleccionar néctar y polen, y esta búsqueda de alimento ocurre en diversos ambientes en presencia de patógenos y factores de estrés. Durante la historia natural y la evolución de las abejas se han fijado diversos componentes de defensa, los cuales operan a un nivel individual y otros a nivel social (Cremer *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2006).

### 1.4.2 Componente de defensa individual

En las abejas melíferas, el componente de defensa individual no difiere del observado en los insectos no sociales. La defensa a nivel de individuo también consiste en dos líneas de respuesta que actúan contra patógenos y parásitos (Wilson-Rich *et al.*, 2009). La primera línea incluye: a) barreras físicas, como la cutícula y las membranas peritróficas que impiden la introducción de patógenos al cuerpo.

La segunda línea de defensa consiste en respuestas fisiológicas innatas que podemos definir como el “sistema inmune” de las abejas (Schmid-Hempel, 2005). Este sistema se integra por: a) una respuesta celular mediada por hemocitos que reconocen y eliminan patógenos mediante la fagocitosis, la nodulación y la encapsulación. Además de, b) una respuesta humoral, responsable de la síntesis de moléculas extracelulares que tienen diversas funciones biológicas dirigidas al reconocimiento, control y eliminación de patógenos (Wilson-Rich *et al.*, 2009). Los principales sitios de síntesis de los elementos humorales son los cuerpos grasos y los hemocitos. Los principales elementos humorales estudiados en las abejas melíferas son los péptidos antimicrobianos (PAM) y la cascada de la enzima fenoloxidasasa (proPO-PO) (Schmid-Hempel, 2005).

### 1.4.3 Componente de defensa social

En insectos eusociales como las termitas, las hormigas y las abejas, la organización en colonias trae consigo ventajas como la eficiencia en el cuidado de las crías y en la búsqueda de alimento. No obstante, los numerosos contactos físicos, compartir alimentos y el tiempo de confinamiento crean condiciones favorables para la diseminación de enfermedades.

En particular, las abejas melíferas han desarrollado un componente de defensa que emerge de la cooperación de todos los individuos. Cada abeja realiza pequeñas tareas que colectivamente reducen el acceso, el establecimiento y la diseminación de patógenos y parásitos en la colonia (DeGrandi-Hoffman y Chen, 2015). Este componente de defensa se integra por diferentes estrategias que van desde estructurales hasta conductuales y fisiológicas.

a) las estructurales incluyen acciones para regular el ambiente interno de la colonia. Por ejemplo, las resinas (propóleo) que las abejas recolectan, combinan con agua y depositan en las paredes de la colonia crean una cubierta hermética que impide el paso de aire y de luz, pero también poseen propiedades antimicrobianas que brindan una protección colectiva (Borba

y Spivak, 2017). Otro ejemplo es el “comportamiento de fiebre”, en el cual las abejas incrementan la temperatura dentro de la colonia para combatir patógenos sensibles al calor como *Ascophaera apis* (Starks *et al.*, 2000).

b) las conductuales incluyen comportamientos enfocados en reducir la transmisión de enfermedades. Estas son a) el acicalamiento, que es la remoción de partículas extrañas del cuerpo como polen o ácaros (grooming), b) la conducta higiénica que es la capacidad que tienen las abejas obreras de detectar y remover crías enfermas, parasitadas o muertas, y c) la remoción de individuos adultos muertos (undertaking).

c) las fisiológicas consisten en la síntesis de moléculas que aportan propiedades antisépticas. Un ejemplo es la enzima glucosa oxidasa (GOx) que se sintetiza en las glándulas hipofaríngeas de las abejas nodrizas (Ohashi *et al.*, 1999). Esta enzima es una oxido-reductasa que cataliza la oxidación de la beta-D-glucosa, reacción que da lugar a los productos: ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Wong *et al.*, 2008). Cuando las abejas nodrizas secretan esta enzima en el alimento larvario y en la miel las propiedades antisépticas de los productos sintetizados esterilizan el alimento y brindan una protección colectiva (Bucekova *et al.*, 2014). Esta enzima es un indicador fisiológico y es uno de los enfoques propuestos en esta tesis para obtener información sobre el componente de defensa social.

### **1.5 Patógenos de importancia en *Apis mellifera*: *Nosema ceranae* y *Nosema apis***

*Apis mellifera* es un insecto social vulnerable ante un gran número de patógenos en todos los ambientes donde está presente. Las principales enfermedades son provocadas por agentes causales como bacterias, virus, hongos, ácaros y escarabajos.

En la actualidad, los microsporidios *Nosema ceranae* y *N. apis* (Reino fungi, filum Zygomycota) son dos patógenos ampliamente estudiados por su probable asociación con la disminución global de colonias. Se trata de hongos endoparásitos unicelulares que dañan las células epiteliales del intestino de las abejas y provocan una deficiente absorción nutrimental. En las colonias, pueden reducir la población y, en consecuencia, la recolección de alimento (Fries *et al.*, 2013). Las abejas pueden experimentar infecciones mixtas de *Nosema*, no obstante, *N. ceranae* parece desarrollar mayor virulencia y severidad. Además, se ha observado que esta especie tiene un efecto negativo sobre las respuestas inmunes (Antúnez *et al.*, 2009).

Algunos estudios indican que las infecciones por *Nosema* tienen un componente espacial y temporal (Williams *et al.*, 2014). Esto lleva a observar una variación de los niveles de infección y su prevalencia entre diferentes escalas de tiempo y diferentes regiones. El nivel de infección se describe como la densidad (o número) de esporas por abeja, mientras que la prevalencia indica el porcentaje relativo de individuos infectados en un determinado tiempo. Por ejemplo, en algunas regiones de México como la Península de Yucatán, la prevalencia de *N. apis* pasó de 7.2% en 1990 a 14.4% en 1994 y en 2006 se incrementó a 74.0% (Martínez-Puc *et al.*, 2011).

### 1.6 JUSTIFICACIÓN

Las abejas melíferas son de vital importancia ecológica y socioeconómica a nivel global. En los ecosistemas, las abejas efectúan la polinización de numerosas (80%) especies de plantas silvestres. Además, polinizan el 75% de los cultivos que son la base de la alimentación humana (Potts *et al.*, 2010). En México, la apicultura es una actividad relevante, nuestro país es el tercer exportador de miel a nivel mundial (FAO, 2021) y alberga casi 43 mil apicultores (INEGI-SADER, 2018). Los servicios ambientales y económicos que brindan las abejas se han visto amenazados por una deficiente nutrición y por la presencia de parásitos y patógenos en las colonias (Goulson *et al.*, 2015). Una estrategia ha sido fortalecer la nutrición con el uso de dietas artificiales, sin embargo, han sido poco eficaces; es imprescindible encontrar nuevas alternativas. En este contexto, es necesario generar un conocimiento integral sobre la nutrición de las abejas explorando áreas poco estudiadas, una mayor comprensión permitirá desarrollar esquemas de nutrición más eficientes. Un enfoque con gran significado biológico consiste en reconocer a las levaduras asociadas a las abejas y sus alimentos, como elementos clave de su nutrición y salud (Anderson *et al.*, 2011). Desarrollar investigación sobre este tema tiene la finalidad de identificar aquellas levaduras que promueven las respuestas de salud, de nutrición e incluso inmunidad. Estas levaduras podrían emplearse en la formulación de dietas específicas con la ventaja de que son elementos inocuos para las abejas. También es importante determinar si el consumo de estas levaduras aporta una protección contra patógenos (Pozo *et al.*, 2020), porque esto puede ayudar en el control y el manejo de las enfermedades en las colonias. Este conocimiento científico contribuye al uso de levaduras asociadas a las abejas como una alternativa novedosa para promover la salud, la nutrición y la defensa contra patógenos. También es útil para implementar estrategias enfocadas en el mantenimiento de las comunidades de microorganismos benéficos en las colonias.

## 1.7 HIPÓTESIS

Un conjunto de levaduras se asocia a las abejas productoras de miel, estos microorganismos se observan colonizando el tracto intestinal y las provisiones de alimento de las abejas, de tal forma que están presentes en su dieta. Por lo tanto, se espera que tengan un papel importante en la alimentación y una influencia en el estado nutricional y en los componentes de defensa. Si las especies levaduras que se observan en asociación con las abejas son microorganismos que afectan el estado nutricional y los componentes de defensa, se puede hipotetizar que:

Estado nutricional:

i) Incrementarán la sobrevivencia, la acumulación de cuerpos grasos y la expresión del gen *vitelogenina*

Componente de defensa individual (respuesta inmune):

ii) Incrementarán la expresión del gen *profenoloxidasa*

Componente de defensa social (inmunidad social):

iii) Incrementarán la expresión del gen *glucosa oxidasa*

Respuesta ante patógenos (efecto antagonista):

iv) Reducirán la infección causada por los microsporidios del género *Nosema*

## 1.8 OBJETIVOS

### 1.8.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de cinco levaduras asociadas a abejas melíferas sobre el estado nutricional y la respuesta de los componentes de defensa en el modelo de estudio *Apis mellifera*

### 1.8.2 Objetivos específicos

## Capítulo II

Evaluar experimentalmente el efecto de cinco levaduras suplementadas en la dieta de abejas adultas y sanas de *A. mellifera* en:

- ❖ Estado nutricional: supervivencia, consumo de alimento, cuerpos grasos y expresión del gen *vitelogenina*
- ❖ Componente de defensa individual (respuesta inmune): expresión del gen *profenoloxidasa*
- ❖ Componente de defensa social (inmunidad social): expresión del gen *glucosa oxidasa*

## Capítulo III

- ❖ Evaluar el efecto del tipo de dieta en la proporción de abejas infectadas y el nivel de infección de los patógenos *Nosema ceranae* y *N. apis* en abejas *A. mellifera*
- ❖ Evaluar el efecto de infecciones mixtas de *N. ceranae* y *N. apis* sobre el estado nutricional de *A. mellifera*: supervivencia, consumo de alimento y expresión del gen *vitelogenina*
- ❖ Evaluar el efecto de infecciones mixtas de *N. ceranae* y *N. apis* sobre la respuesta inmune y la inmunidad social en *A. mellifera*: expresión de los genes *profenoloxidasa* y *glucosa oxidasa*
- ❖ Estandarizar métodos moleculares para la identificación de los patógenos *N. ceranae* y *N. apis*
- ❖ Estandarizar un método de infección colectiva de abejas *A. mellifera* con esporas de *N. ceranae* y *N. apis*

## Capítulo IV

Evaluar el efecto de cinco levaduras suplementadas en la dieta de abejas adultas de *A. mellifera* infectadas experimentalmente con *Nosema ceranae* y *N. apis* en las siguientes variables:

- ❖ Respuesta ante patógenos (efecto antagonista): expresión de genes específicos de los patógenos *Nosema ceranae* y *N. apis*
- ❖ Estado nutricional: supervivencia, consumo de alimento, cuerpos grasos y expresión del gen *vitelogenina*

- ❖ Componente de defensa individual (respuesta inmune): expresión del gen *profenoloxidasa*
- ❖ Componente de defensa social (inmunidad social): expresión del gen *glucosa oxidasa*

## 1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los objetivos planteados en este trabajo se abordaron en tres diferentes bioensayos. Estos bioensayos fueron conducidos en laboratorio estudiando abejas recién emergidas de *Apis mellifera* en cajas experimentales. En la **Fig. 1.2** se ilustra el esquema general de la estrategia experimental.

**Capítulo II.** En este capítulo, en condiciones de laboratorio se alimentaron abejas recién emergidas de *A. mellifera* con dietas enriquecidas con cinco levaduras: *Starmerella bombicola*, *S. etchellsii*, *S. bombicola 2*, *Zygosaccharomyces mellis* y *Saccharomyces cerevisiae*; se empleó un sustituto de polen como control. Cada dieta enriquecida con una levadura representó un tratamiento y se evaluó su efecto sobre marcadores biológicos del estado nutricional, de la salud, y de la respuesta inmune e inmunidad social de las abejas.

**Capítulo III:** Este capítulo integró los resultados de identificación molecular de los patógenos *Nosema ceranae* y *N. apis*, así como la estandarización de un método de infección colectiva de abejas *A. mellifera* con esporas de *N. ceranae* y *N. apis* usando sacarosa y un sustituto de polen. Se evaluó el efecto del tipo dieta sobre el nivel de infección causado por ambos patógenos y los efectos de esta infección sobre marcadores de la salud, la nutrición, de la respuesta inmune y la inmunidad social.

**Capítulo IV:** En este capítulo se infectaron abejas recién emergidas de *A. mellifera* con esporas de *N. ceranae* y *N. apis*, mientras que otro grupo no fue infectado y se designó como el control. Las abejas no infectadas e infectadas se dividieron en grupos y cada grupo recibió una de cinco dietas enriquecidas con las levaduras *Starmerella bombicola*, *S. etchellsii*, *S. bombicola 2*, *Z. mellis* y *S. cerevisiae*. Se evaluó el efecto antagonista de las levaduras consumidas sobre el nivel de los patógenos *N. ceranae* y *N. apis* en las abejas infectadas. Asimismo, en las abejas infectadas, se evaluó el efecto de las dietas con levaduras sobre marcadores biológicos del estado nutricional, de la salud y de la respuesta inmune e inmunidad social, y se compararon con las respuestas observadas en las abejas no infectadas.

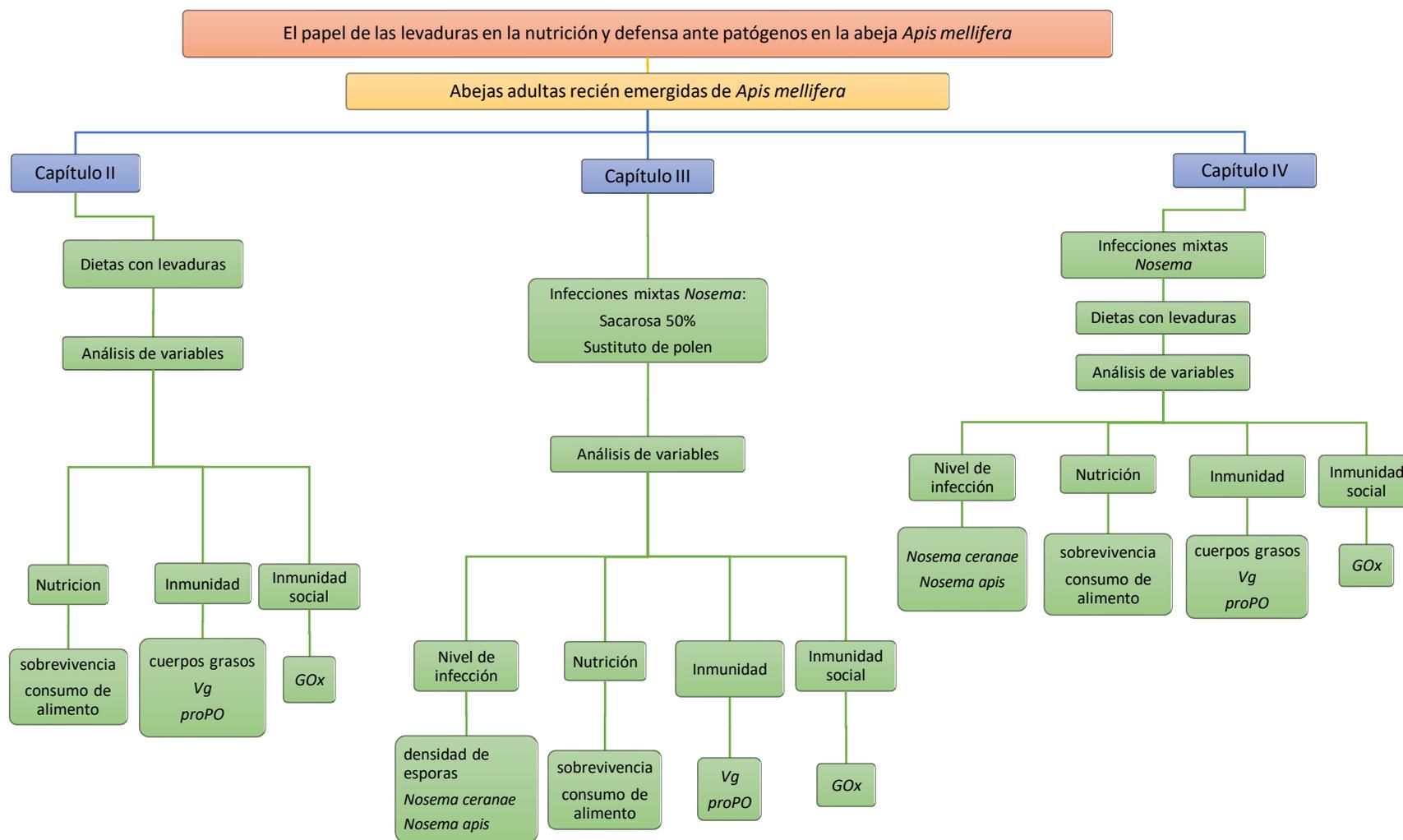


Figura 1.2 Estrategia experimental.

## CAPÍTULO II

Este capítulo se encuentra ACEPTADO como artículo científico en la revista *PeerJ*:

Canché-Collí, C., Estrella Maldonado, H.J., Medina-Medina, L.A., Moo Valle, H., Calvo-Irabien, L.M., Chan-Vivas, E., Rodríguez, R. & Canto, A. (2021). Effect of yeast and essential oil-enriched diets on critical determinants of health and immune function in Africanized *Apis mellifera*. *PeerJ*, 9, e12164.

### **LA IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN EL ESTADO NUTRICIONAL Y LOS COMPONENTES DE DEFENSA EN *Apis mellifera***

#### **2.1 INTRODUCCIÓN**

La nutrición es la base del correcto funcionamiento de los procesos fisiológicos en las abejas (estado nutricional, función inmune, reproducción, etc.), que a vez sustentan la salud y el mantenimiento de las colonias manejadas y las poblaciones silvestres. Las abejas basan su dieta en dos recursos florales, el polen y el néctar, los cuales aportan aminoácidos, proteínas, lípidos y carbohidratos necesarios (Brodschneider y Crailsheim, 2010). A nivel mundial, la reducción de áreas naturales y el incremento de monocultivos han reducido las fuentes néctar-poliníferas llevando a una nutrición empobrecida y un estrés nutricional en las abejas (Vaudo *et al.*, 2015). Se asume que el estrés nutricional junto a los parásitos, patógenos y pesticidas, han actuado en sinergia provocando múltiples problemas de salud que se relacionan con la disminución de las poblaciones de abejas (Dolezal y Toth, 2018; Goulson *et al.*, 2015).

Los impactos negativos del estrés nutricional han motivado la investigación para desarrollar suplementos proteicos y sustitutos de polen (SP, dietas artificiales) como alternativas para proveer los nutrimentos básicos (Saffari *et al.*, 2004; Spencer-Booth, 1960). Aunque estas dietas artificiales resultan aceptables en ensayos de laboratorio y de campo, aún se debate su uso y sus alcances. Por otra parte, un “elemento” poco explorado y que puede contribuir a la nutrición son las levaduras microscópicas que naturalmente se asocian a las abejas y a sus fuentes de alimento (Gilliam, 1979). Estas levaduras habitan el tracto digestivo de las larvas y las abejas adultas, y las provisiones de miel y polen de abejas sociales y solitarias. Estas levaduras, conforman un grupo especializado que comparte rasgos fisiológicos y filogenéticos (Stefanini, 2018; Rosa *et al.*, 2003; Gilliam, 1997; Inglis *et al.*, 1995; Gilliam, 1979).

La investigación previa ha documentado la presencia, la identificación y la diversidad de estas levaduras en varios grupos de abejas, generando valiosa información (Brysch-Herzberg, 2004; Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003; Gilliam, 1979). Sin embargo, no existe evidencia experimental sobre su influencia en la nutrición de las abejas y en procesos críticos modulados por la nutrición como son las respuestas inmunes o la inmunidad social (Alberoni *et al.*, 2016; DeGrandi-Hoffman y Chen, 2015; Crotti *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2011). La información existente ha permitido hipotetizar que estas levaduras contribuyen al enriquecimiento nutrimental de la miel y el pan de abeja (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2003). Existen antecedentes de que la dieta de ciertos insectos incorpora lípidos y aminoácidos sintetizados por microorganismos asociados, como se documenta en la relación que establecen las moscas *Drosophila* y ciertas levaduras, y la relación entre áfidos y los simbiosomas del género *Buchnera* (Gibson y Hunter, 2010; Douglas, 1998; Starmer y Aberdeen, 1990). En las abejas, también se plantea que las comunidades microbianas asociadas son piezas fundamentales en la nutrición y la salud (Engel *et al.*, 2016; Anderson *et al.*, 2011).

La relación nutrimental entre las abejas y las levaduras asociadas es un área de investigación novedosa que puede generar alternativas para la nutrición suplementaria (Alberoni *et al.*, 2016; Crotti *et al.*, 2013). En este capítulo se evaluó experimentalmente el efecto de cinco dietas enriquecidas con cinco levaduras sobre marcadores biológicos del estado nutricional (cuerpos grasos, *vitelogenina*), y de la defensa individual (*profenoloxidasa*) y social (*glucosa oxidasa*) en abejas de *A. mellifera*. Se planteó que la alimentación enriquecida con levaduras incrementará los indicadores de salud, estado nutricional y de defensa en comparación con una dieta control sin adición de levaduras. Estos resultados contribuyen al conocimiento de la nutrición enriquecida con levaduras asociadas a las abejas y su influencia en la salud.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Levaduras asociadas a *Scaptotrigona pectoralis*

Previamente, nuestro grupo de trabajo realizó un extenso muestreo de levaduras en colonias de la abeja *Scaptotrigona pectoralis* ubicadas cerca de colonias de *A. mellifera*. Todas las cepas de levaduras cultivables fueron aisladas, purificadas y preservadas en glicerol al 15% (p/p) a -80°C. Este muestreo permitió identificar un grupo de levaduras asociadas al alimento larvario, al pan de abeja y la miel, que pueden ser suplementos novedosos en la nutrición de las abejas (Lizama, 2011). Posteriormente, las cepas fueron identificadas por métodos

moleculares con los cebadores NL1-NL4 y la secuenciación del gen LSU 26S rADN (dominio D1/D2) (Canto *et al.*, 2017). De las secuencias consenso obtenidas, cinco cepas de levaduras fueron seleccionadas para su evaluación en esta tesis: 1) CICY-RN-358, identificada como *Starmerella bombicola*, aislada en los potes de miel; 2) CICY-RN-386, identificada como *Starmerella etchellsii*, aislada en los potes con alimento larvario; 3) CICY-RN-413, identificada como *Starmerella bombicola* 2, aislada en los potes con pan de abeja; 4) CICY-RN-443, identificada como *Zygosaccharomyces mellis*, aislada en los potes de miel; y 5) CICY-RN-Sac2, identificada como *Saccharomyces cerevisiae*, una cepa comercial empleada en formulaciones para la alimentación de las abejas. Los números de accesoión del GenBank y las secuencias de nucleótidos de las levaduras se enlistan en el **Anexo**.

Las levaduras estudiadas se clasifican como ascomicetos y se han reportado en el néctar floral, el tracto digestivo, y el polen y la miel de abejas sin aguijón como *Frieseomelitta*, *Melipona* y *Tetragonisca* (Villegas-Plazas *et al.*, 2018; Canto *et al.*, 2017; Daniel *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2013; Kurtzman *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 1999; Rosa y Lachance, 1998; Inglis *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 1970), y en el tracto digestivo, el polen y la miel de *A. mellifera* (Villegas-Plazas *et al.*, 2018; Daniel *et al.*, 2013; James y Stratford, 2011; Carvalho *et al.*, 2010; Hajsig, 1958). *S. bombicola* es una especie del clado *Starmerella*, un grupo dentro de los ascomicetos que integra especies asociadas a flores efímeras, abejas y provisiones de alimento de las colonias (Lachance, 2011; Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003; Rosa y Lachance, 1998).

### 2.2.2 Formulación de dietas

En este experimento se formularon cinco dietas con levaduras. El control consistió en un sustituto de polen (SP) elaborado siguiendo los métodos estándar para criar abejas adultas de *A. mellifera* en condiciones de laboratorio (Williams *et al.*, 2013). El SP se elaboró de acuerdo a una relación peso/peso siguiendo la fórmula descrita por van der Steen (2007), para un gramo: harina de soya (14%), harina de levadura de cerveza (10%), harina de caseinato de calcio (15%), harina de proteína de suero (4%), solución de sacarosa (48%) y aceite de linaza (9%). En las dietas enriquecidas con levaduras, la harina de levadura de cerveza fue sustituida con una de las cinco cepas de levadura aisladas de las colonias de *S. pectoralis*. Antes de su incorporación a las dietas, las levaduras fueron liofilizadas. Y, se añadieron al SP en una proporción de 7% (peso/peso), que representó una densidad celular en la dosis final de alimento de aproximadamente 539 155 células/g, densidad similar a la observada en las

fuentes originales de alimento en donde se aislaron. La levadura *S. cerevisiae* se incluyó en el estudio porque es ampliamente usada en la apicultura debido a su contribución de proteínas y vitaminas.

### 2.2.3 Abejas y diseño experimental

Las veinte colonias de estudio correspondieron a abejas africanizadas de *A. mellifera* que se localizaron en el apiario experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Yucatán (20°51'51.62" N; 89°36'45.35" E). El apiario está rodeado por 28 hectáreas de selva baja caducifolia en donde crecen al menos 90 especies de plantas productoras de néctar y polen. El clima regional es subtropical con una temperatura anual promedio de 25°C, una precipitación anual de 948 mm y ocho metros de elevación sobre el nivel del mar.

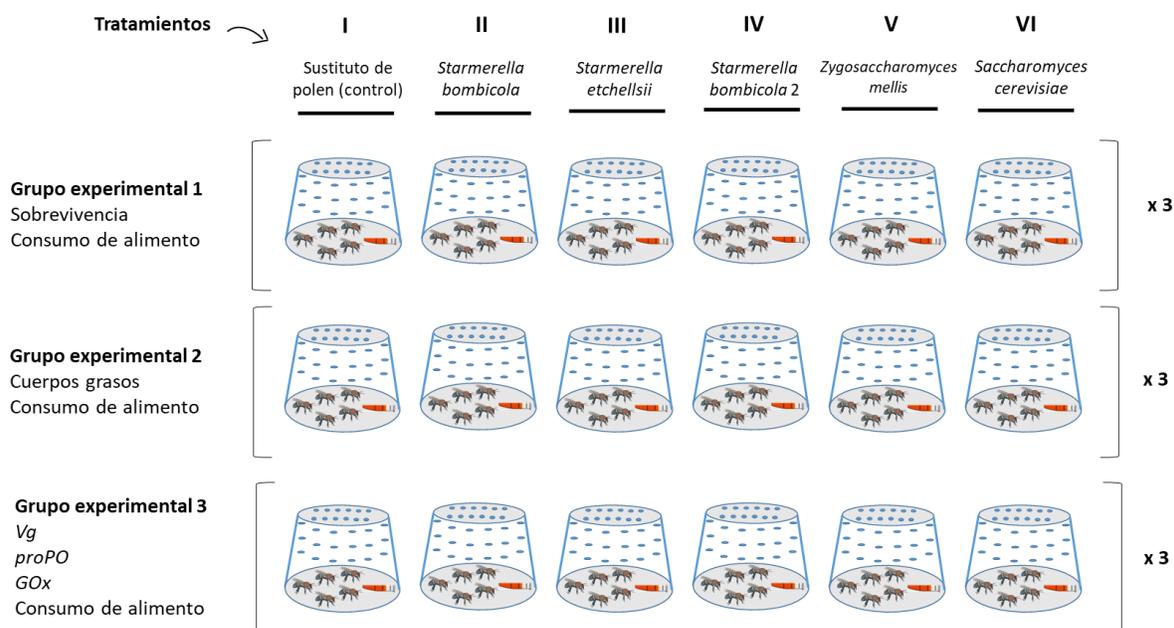


**Figura 2.1** Cajas experimentales con abejas recién emergidas de *A. mellifera* en condiciones de oscuridad, temperatura de 36°C, humedad relativa de 70% y flujo constante de aire.

En el verano de 2018, uno o dos cuadros con cría inmadura próxima a emerger fueron extraídos en cada una de 12 colonias, las cuales contaban con suficientes cuadros con cría (3-4). Los cuadros extraídos fueron incubados en condiciones de oscuridad constante a 36°C de temperatura, 70% de humedad relativa y un flujo continuo de aire para remover el CO<sub>2</sub>, hasta la emergencia de abejas adultas. Siguiendo protocolos estándar (Williams *et al.*, 2013), las abejas recién emergidas fueron colectadas después de 48 h y asignadas en grupos de 24-30 abejas en cajas individuales (contenedores plásticos, 11.0 x 7.5 x 9.0 cm). Las cajas fueron asignadas al azar a uno de seis tratamientos: 1) Sustituto de polen (SP, control); 2) SP + *S. bombicola*; 3) SP+ *S. etchellsii*; 4) SP + *S. bombicola* 2; 5) SP + *Z. mellis*; 6) SP + *S. cerevisiae* (**Fig. 2.1**). Las

cajas experimentales permanecieron en oscuridad permanente a 36°C de temperatura, 70% de humedad relativa y un flujo continuo de aire para remover el CO<sub>2</sub> durante todo el experimento. La cantidad de dieta suministrada a cada grupo experimental fue de 0.85 ± 0.4 g. Los alimentadores con cada dieta fueron reemplazados cada tres días con alimento fresco para evitar la fermentación o degradación microbiana. Asimismo, cada día se colocó agua fresca (2.0 g) en las cajas.

En cada tratamiento, tres cajas (réplicas) se establecieron para estimar la sobrevivencia (grupo 1), tres cajas para cuantificar los cuerpos grasos (grupo 2), y otras tres cajas para cuantificar la expresión relativa (grupo 3) (**Fig. 2.2**). El consumo de alimento fue medido en todas las cajas. En el diseño experimental, el tipo de dieta fue el principal factor, y se realizaron comparaciones pareadas entre la dieta control y una dieta específica para evaluar el efecto de la dieta. El tiempo (día) y las cajas experimentales se trataron como variables aleatorias para estimar la varianza debido a las diferencias inherentes dentro de los factores días y cajas. En total, se establecieron 54 cajas y se estudiaron 1 943 abejas recién emergidas. Las variables de respuesta analizadas en el día cero, tres, seis y nueve se describen a continuación.



**Figura 2.2** Diseño experimental de la evaluación de dietas enriquecidas con levaduras sobre el estado nutricional y los componentes de defensa en *A. mellifera*. En cada dieta, se establecieron nueve cajas experimentales, tres grupos con tres réplicas por grupo. El principal factor fue la dieta, y las réplicas y el tiempo se trataron como factores aleatorios.

## 2.2.4 Variables de estudio

### 2.2.4.1 Supervivencia

Para estimar la supervivencia, las cajas experimentales con abejas fueron monitoreadas por doce días. En cada tratamiento, las estimaciones se generaron considerando el número diario de abejas vivas y muertas en cada caja durante doce días. Estos datos se usaron para construir las curvas de probabilidad de supervivencia y para calcular la mediana del tiempo de supervivencia, esto es, el tiempo más corto en donde la supervivencia de las abejas es menor o igual a 0.5. Las abejas muertas se retiraron diariamente para prevenir alguna contaminación.

### 2.2.4.2 Consumo de alimento

En las cajas de todos los tratamientos, el consumo diario de alimento por abeja (% consumo/abeja/día) fue medido durante nueve días (Williams *et al.*, 2013). Los alimentadores se llenaron con el tipo de dieta correspondiente, se pesaron (peso inicial) y se colocaron en la caja respectiva. El tiempo en el que se colocó cada alimentador en la caja (tiempo inicial) y el número de abejas vivas (abejas\_inicio) fueron registrados. Después de tres días, se retiraron los alimentadores y se registró el tiempo (tiempo final) y el número de abejas vivas en la caja (abejas\_final). Se registró el peso del alimentador (peso final) y se calculó la cantidad total de alimento consumido restando el peso final al peso inicial. Este proceso se repitió con un grupo control de alimentadores empleados para estimar la evaporación promedio en las dietas, se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales, pero sin abejas. El consumo de alimento fue calculado restando los valores de evaporación de las diferencias de peso observadas en las dietas evaluadas. El tiempo (horas) que los alimentadores estuvieron en las cajas se calculó restando el tiempo inicial al tiempo final. El consumo por hora por caja se calculó dividiendo el peso de alimento consumido por el tiempo de alimentación en la caja, y el consumo por hora por abeja se calculó dividiendo el consumo por hora de cada caja por el número de abejas final. El consumo diario por abeja se calculó multiplicando el consumo por abeja en una hora por 24.

### 2.2.4.3 Cuerpos grasos

El porcentaje acumulado de cuerpos grasos en cada abeja se midió siguiendo el método de Wilson-Rich *et al.* (2008). Durante nueve días, a intervalos de tres días, se tomó un grupo de tres abejas de cada caja. Las abejas fueron anestesiadas en frío, luego se sacrificaron

separando la cabeza del abdomen y los abdómenes se secaron por tres días a 24°C en silica gel. Los abdómenes se pesaron individualmente (peso inicial) en una balanza analítica con una precisión de 0.001 g (Ohaus), y se trataron con éter dietílico durante 24 h para disolver el tejido graso. Se secaron durante tres días y se registró el peso (peso final). La proporción de cuerpos grasos por abeja se calculó dividiendo el peso abdominal final por el peso abdominal inicial.

#### 2.2.4.4 Expresión relativa de los genes *Vg*, *proPO* y *GOx*: extracción de ARN, síntesis de cADN y RT-qPCR

La expresión de *Vg*, *proPO* y *GOx* fue medida en las abejas por RT-qPCR. Durante nueve días, tres abejas de cada caja fueron retiradas cada tres días, estas abejas fueron sacrificadas y disectadas. La expresión de *Vg* y *proPO* fue medida en el abdomen y la expresión de *GOx* en la cabeza. Las muestras de cabeza y de abdomen se agruparon según la caja de origen, se maceraron y se homogenizaron en reactivo TRIzol (Invitrogen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener el ARN total. La contaminación por ADN genómico se eliminó de las muestras usando ADNasa I (kit sin ADN, Ambion, EEUU), y la concentración y pureza del ARN fueron medidas en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, EEUU). La calidad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%). Para la síntesis de ADN complementario (cADN), se empleó un protocolo de transcripción inversa utilizando 300 ng de ARN purificado de cada muestra y una concentración final de 50 U/μL de MultiScribe Reverse Transcriptase (Invitrogen/Life Technologies, EEUU). La síntesis de cADN se realizó a 42°C durante 50 min. El cADN sintetizado se utilizó para realizar la RT-qPCR usando cebadores específicos para *Vg*, *proPO* y *GOx*, así como el gen de referencia *RPS5*.

Para *Vg*, se generó un fragmento de 150 pb con los cebadores: NM\_001011578.1-F (5'-GTTGGAGAGCAACATGCAGA-3') y NM\_001011578.1-R (3'-TCGATCCATTCCTTGATGGT-5') (Tsuruda *et al.*, 2008). En este trabajo, se utilizó el software Primer Express ver.3 (Applied Biosystems, EEUU) para desarrollar un par de cebadores específicos para *proPO* que generaron un fragmento de 130 pb: AY242387.2-F (5'-GAACGGCTATGTAATCGTCTTGGA-3') y AY242387.2-R (3'-TACCGCTGGGTCGAAATGG-5'). Para *GOx*, se generó un fragmento de 201 pb con los cebadores: AB022907.1-F (5'-GAGCGAGGTTTCGAATTGGA-3') y AB022907.1-R (3'-GTCGTTCCCCGAGATTCTT-5') (Yang y Cox-Foster, 2005). Como gen de referencia, se utilizó un par de cebadores que generaron un fragmento de 115 pb de la proteína ribosomal S5 (gen *RPS5*): XM\_006570237.2-F (5'-AATTATTTGGTCGCTGGAATTG-3') y

XM\_006570237.2-R (3'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA-5') (Evans, 2006). La RT-qPCR se realizó en un termociclador StepOne Real-Time PCR System usando el software StepOne ver. 2.3 (Applied Biosystems, EEUU). Las muestras de cada caja tuvieron tres réplicas internas, las cuales se analizaron por RT-qPCR en una placa de 48 pozos. La amplificación del cADN se realizó utilizando SYBR Green Master Mix como señal de detección (Applied Biosystems, EEUU), 2  $\mu$ L de cADN y 4  $\mu$ M de cada cebador específico en una concentración de 0.4  $\mu$ M en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L. Los ciclos de amplificación fueron: 95°C durante 3 min; y 40 ciclos de 95°C durante 30 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 1 min. La especificidad de los productos de RT-qPCR de todas las muestras se verificaron analizando las curvas de disociación (*melt curves*). Los niveles de expresión relativa (REL) de *Vg*, *proPO* y *GOx* se calcularon usando el método comparativo Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) (Schmittgen y Livak, 2008). La cuantificación relativa de los genes se normalizó a los valores de expresión del gen de referencia RPS5.

### 2.2.5 Análisis estadísticos

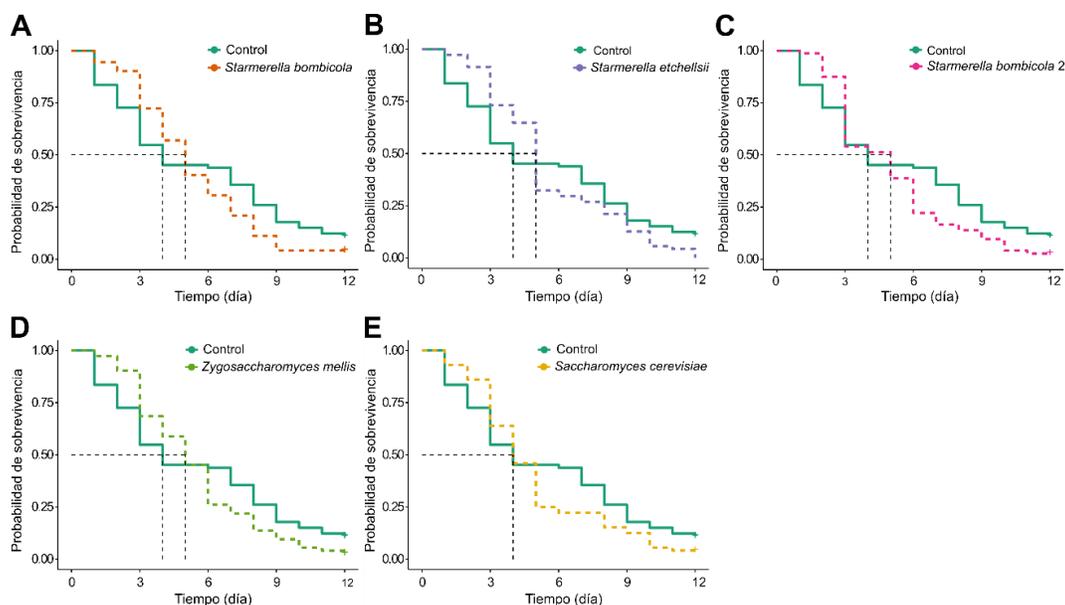
Los datos del día cero aparecen en las figuras, pero fueron excluidos de los análisis estadísticos. En el día cero, la primera dosis de alimento se administró a las abejas en tiempos diferentes (1-3 h). En los siguientes días la alimentación tuvo un margen de diferencia de 30 minutos en todas las cajas. Los datos fueron analizados para probar la normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov), la homogeneidad de varianza (prueba de Levene) y se transformaron si fue necesario antes de efectuar los análisis. Las curvas de sobrevivencia y la mediana del tiempo de sobrevivencia fueron comparadas entre el control (SP) y cada dieta con levaduras con el análisis no paramétrico de Kaplan-Meier y la prueba Log-Rank. Las curvas de sobrevivencia se construyeron con los paquetes *survival* (Therneau, 2019) y *survminer* (Kassambara y Kosinski, 2019). En cada dieta, el estimador de Kaplan-Meier se usó para calcular la probabilidad de sobrevivencia de cada abeja en un tiempo determinado. La prueba de Log-Rank comparó la probabilidad de sobrevivencia de un tratamiento específico con el tiempo de sobrevivencia del control. Para evaluar estadísticamente el efecto de la dieta en el consumo de alimento (raíz cuadrada), la acumulación de cuerpos grasos y la expresión de los genes *Vg*, *proPO* y *GOx* (Log10 de REL), se efectuaron análisis usando modelos lineales de efectos mixtos (LMM) y contrastes para probar hipótesis específicas sobre las diferencias entre el control y cada dieta. Los análisis se realizaron con el paquete *ImerTest* (Kuznetsova *et al.*, 2019). Los modelos LMM se ajustaron con máxima verosimilitud con la función *Imer* y se utilizó la suma de cuadrados Tipo III para diseños no balanceados para calcular los valores F y *p*. El

método de *Satterthwaite* se usó para aproximar los grados de libertad efectivos. El tipo de dieta se estableció como un factor fijo y el día y las cajas como variables aleatorias. El análisis se basó en el siguiente modelo sin interacción: variable de respuesta = tipo de dieta + (1 | día) + (1 | caja). Se aplicaron contrastes ortogonales para comparar cada una de las ocho dietas con el control utilizando la función *contest*. Se usó la prueba de Dunnett para comparar cada tratamiento con el control y el método de Kenward-Roger para aproximar los grados de libertad. Los análisis se realizaron en RStudio (RStudio Team, 2006).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Sobrevivencia

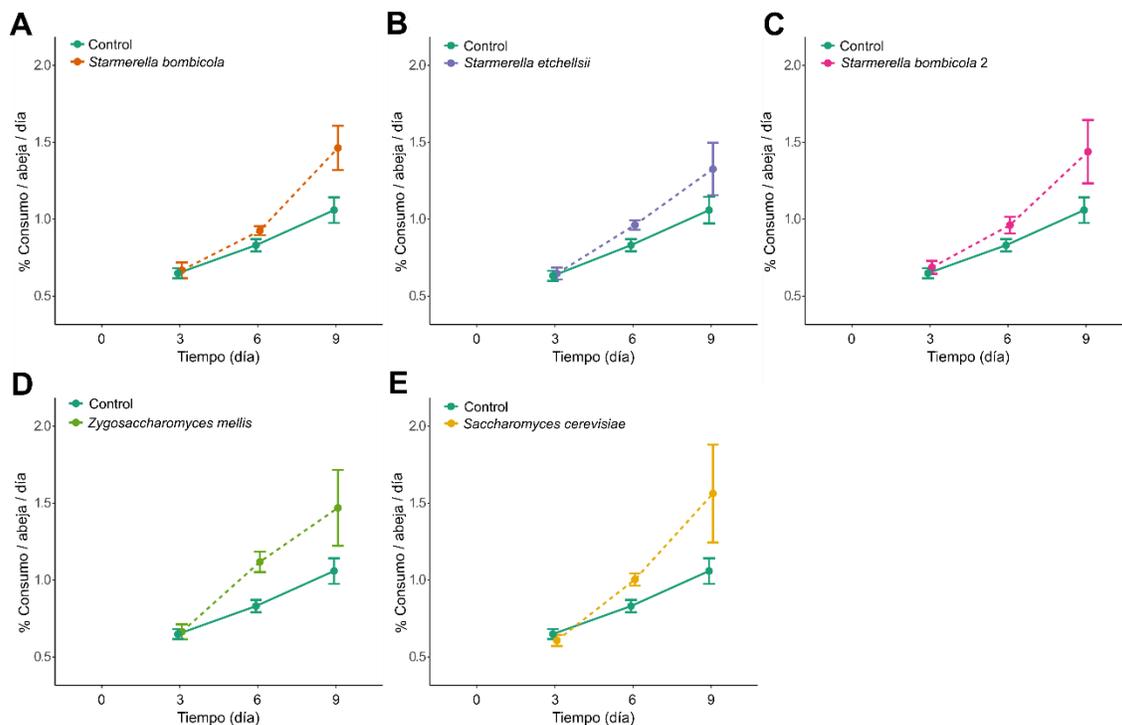
Aunque la sobrevivencia en todos los tratamientos tuvo curvas de probabilidad de sobrevivencia más bajas que el control (**Fig. 2.3**), no existieron diferencias estadísticas (Kaplan-Meier, prueba de Log-Rank,  $p > 0.05$ ). No obstante, el tiempo medio de sobrevivencia (línea discontinua negra, **Fig. 2.3**) fue mayor en las abejas que recibieron dietas con levaduras (mediana = 5 días) que el control (mediana = 4 días), exceptuando la dieta con *S. cerevisiae* (mediana = 4 días).



**Figura 2.3** Curvas de sobrevivencia de abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales doce días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola* 2, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*. Las líneas discontinuas en color negro indican el tiempo medio de sobrevivencia.

### 2.3.2 Consumo de alimento

El consumo de las dietas con levaduras aumentó entre los días hasta alcanzar un aumento de 5.5 veces el día nueve ( $2.47 \pm 2.57\%$ ) (**Fig. 2.4**). El tipo de dieta tuvo un efecto determinante en el consumo por abeja. El modelo LMM fue significativo en las dietas con *S. bombicola* ( $F_{1,52} = 9.90$ ,  $p = 0.0025$ ), *S. etchellsii* ( $F_{1,63} = 5.09$ ,  $p = 0.0276$ ), *S. bombicola 2* ( $F_{1,59} = 6.85$ ,  $p = 0.0113$ ), *Z. mellis* ( $F_{1,61} = 10.73$ ,  $p = 0.0017$ ) y *S. cerevisiae* ( $F_{1,63} = 4.63$ ,  $p = 0.0352$ ). El consumo de alimento fue mayor en las dietas con *S. bombicola* ( $1.07 \pm 0.91\%$ ,  $t = 3.15$ ,  $df = 62$ ,  $p = 0.0025$ ), *S. etchellsii* ( $1.04 \pm 0.92\%$ ,  $t = 2.26$ ,  $df = 63$ ,  $p = 0.0275$ ), *S. bombicola 2* ( $1.03 \pm 1.05\%$ ,  $t = 2.62$ ,  $df = 59$ ,  $p = 0.0112$ ), *Z. mellis* ( $1.34 \pm 1.48\%$ ,  $t = 3.28$ ,  $df = 61$ ,  $p = 0.0017$ ) y *S. cerevisiae* ( $1.41 \pm 2.52\%$ ,  $t = 2.15$ ,  $df = 63$ ,  $p = 0.0351$ ) que en el control ( $0.76 \pm 0.48\%$ ).

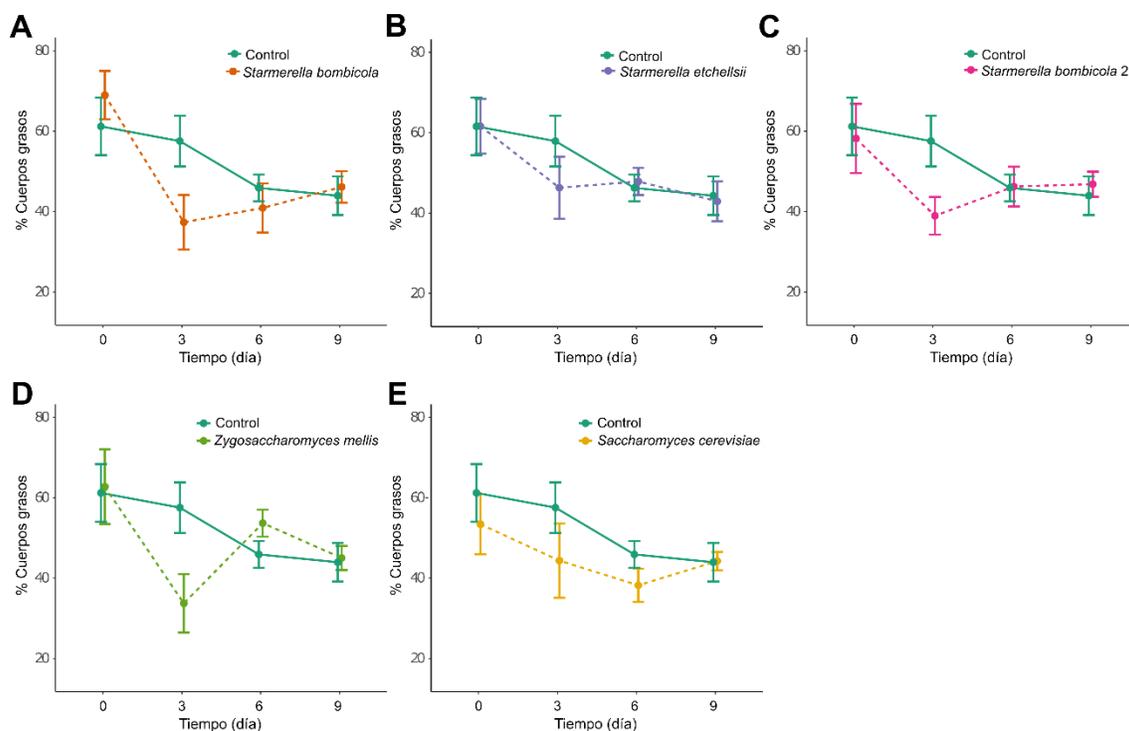


**Figura 2.4** Consumo de alimento (promedio  $\pm$  EE) en abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola 2*, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.

Aunque el tipo de dieta fue determinante en el consumo de alimento, la estimación de las variables aleatorias identificó una alta variación entre los días y una menor variación entre las cajas: *S. bombicola* (Día = 42.47%, Caja = 23.72%); *S. etchellsii* (Día = 38.76%, Caja = 23.37%); *S. bombicola 2* (Día = 39.84%, Caja = 22.18%); *Z. mellis* (Día = 36.13%, Caja = 20.76%); y *S. cerevisiae* (Día = 34.28%, Caja = 19.16%).

### 2.3.3 Cuerpos grasos

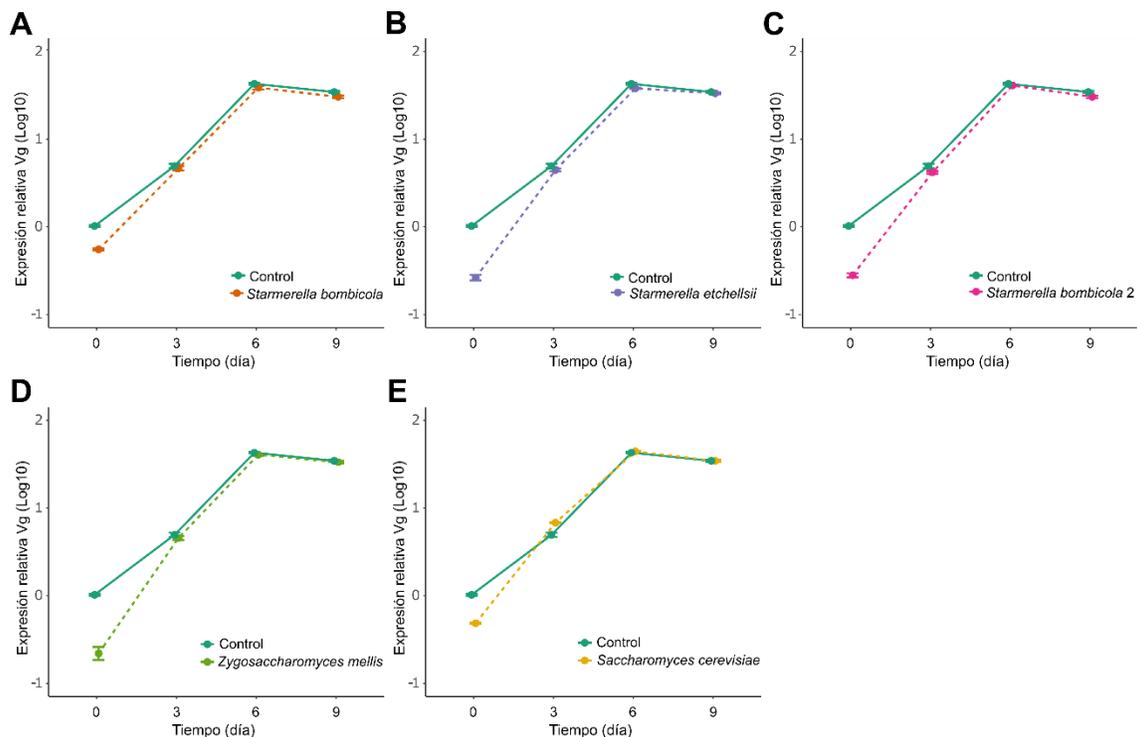
El tipo de dieta afectó el porcentaje acumulado de cuerpos grasos en las abejas (**Fig. 2.5**). El modelo LMM fue significativo solo en la dieta con *S. cerevisiae* ( $F_{1,55} = 4.15$ ,  $p = 0.0463$ ), mientras que no fue significativo en las dietas con *S. bombicola* ( $F_{1,55} = 4.00$ ,  $p = 0.0502$ ), *S. etchellsii* ( $F_{1,56} = 1.23$ ,  $p = 0.2713$ ), *S. bombicola 2* ( $F_{1,58} = 2.31$ ,  $p = 0.1336$ ) y *Z. mellis* ( $F_{1,57} = 1.64$ ,  $p = 0.2053$ ). En la mayoría de dietas con levaduras, la acumulación de cuerpos grasos no difirió del control ( $50.10 \pm 17.15\%$ , todos los valores de pruebas  $t$  con  $p > 0.05$ ). La única excepción fue la dieta con *S. cerevisiae* ( $41.86 \pm 17.67\%$ ,  $t = -2.04$ ,  $df = 55$ ,  $p = 0.0463$ ) que tuvo un efecto negativo marginal. La variación observada en los cuerpos grasos entre los días y entre las cajas experimentales fue moderada: *S. bombicola* (Día = 28.76%, Caja = 0%); *S. etchellsii* (Día = 17.98%, Caja = 23.26%); *S. bombicola 2* (Día = 16.66%, Caja = 20.81%); *Z. mellis* (Día = 18.48%, Caja = 26.70%); y *S. cerevisiae* (Día = 17.98%, Caja = 23.26%).



**Figura 2.5** Cuerpos grasos (promedio  $\pm$  EE) de abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola 2*, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.

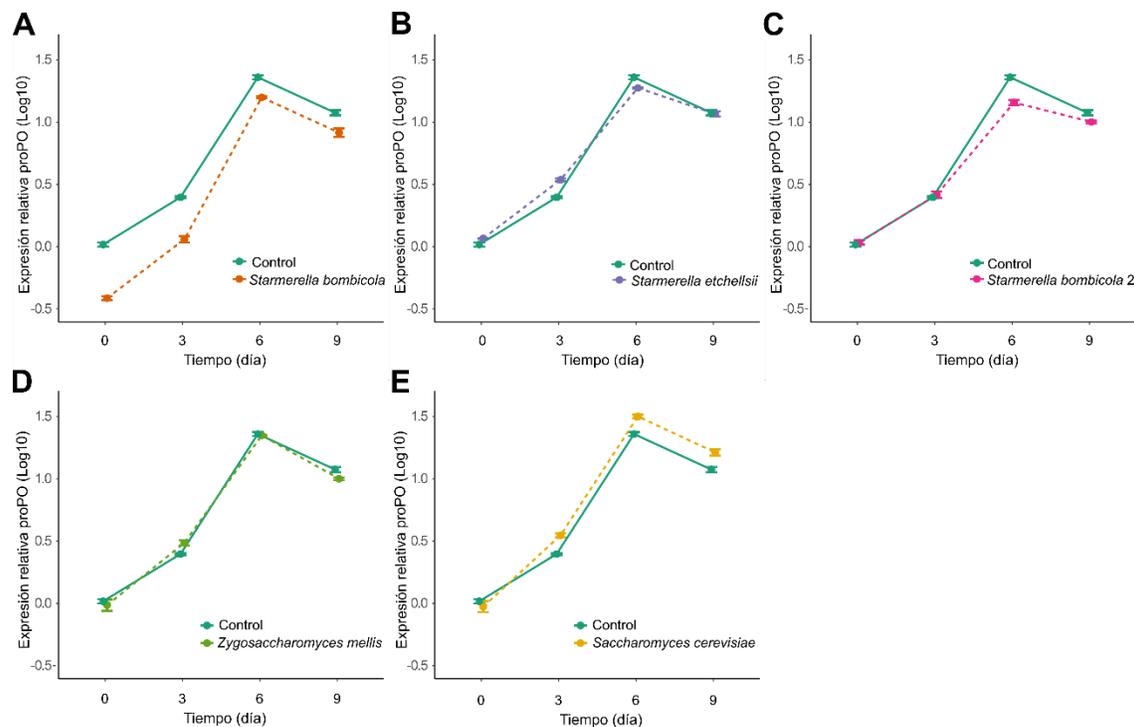
### 2.3.4 Expresión relativa de los genes *Vg*, *proPO* y *GOx*

La mayor expresión de los genes *Vg*, *proPO* y *GOx* en las abejas ocurrió el día seis en todas las dietas con levaduras (**Fig. 2.6**). El tipo de dieta afectó la expresión del gen *Vg*. El modelo LMM fue significativo en las dietas con *S. bombicola* ( $F_{1,15} = 8.62$ ,  $p = 0.0102$ ), *S. etchellsii* ( $F_{1,15} = 10.69$ ,  $p = 0.0052$ ), *S. bombicola* 2 ( $F_{1,15} = 14.75$ ,  $p = 0.0016$ ) y *S. cerevisiae* ( $F_{1,15} = 7.23$ ,  $p = 0.0168$ ), y no fue significativo en la dieta con *Z. mellis* ( $F_{1,15} = 3.77$ ,  $p = 0.0713$ ). La expresión fue moderadamente baja respecto al control ( $27.76 \pm 17.29$  REL) en las dietas con *S. bombicola* ( $24.64 \pm 15.51$  REL,  $t = -2.94$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.0102$ ), *S. etchellsii* ( $25.30 \pm 15.79$  REL,  $t = -3.27$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.0051$ ) y *S. bombicola* 2 ( $25.25 \pm 16.49$  REL,  $t = -3.84$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.0016$ ). Mientras que, la expresión de *Vg* fue similar al control en la dieta con *Z. mellis* ( $26.19 \pm 16.59$  REL,  $t = -1.94$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.0712$ ) y fue mayor en la dieta con *S. cerevisiae* ( $28.54 \pm 16.88$  REL,  $t = 2.69$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.0167$ ). La variación fue alta entre los días y nula entre las cajas: *S. bombicola* (Día = 99.48%), *S. etchellsii* (Día = 99.68%), *S. bombicola* 2 (Día = 99.62%), *Z. mellis* (Día = 99.60%) y *S. cerevisiae* (Día = 79.17%). En el día seis, los valores fueron:  $42.8 \pm 1.6$  en el control y  $40.6 \pm 2.4$  en las dietas con levaduras.



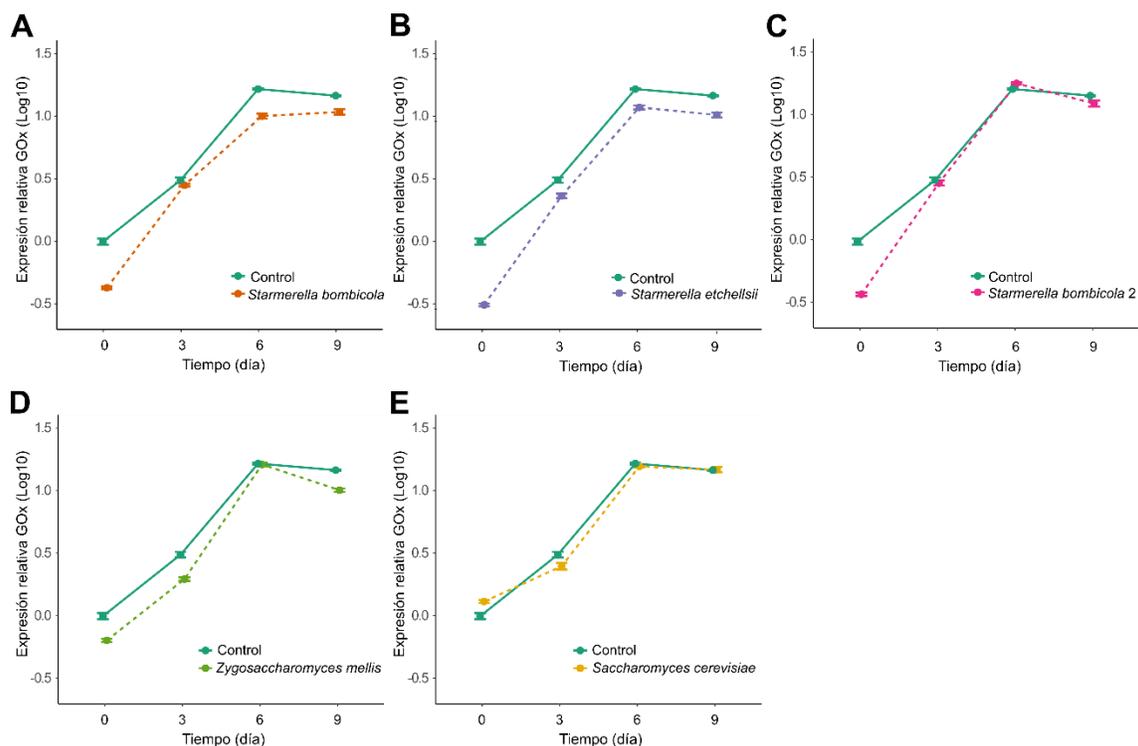
**Figura 2.6** Expresión relativa (Log10, promedio  $\pm$  EE) de *vitelogenina* (*Vg*) en abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola* 2, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.

El tipo de dieta también afectó la expresión del gen *proPO* (**Fig. 2.7**). El modelo LMM fue significativo en las dietas con *S. bombicola* ( $F_{1,15} = 68.37$ ,  $p < 0.00001$ ), *S. bombicola 2* ( $F_{1,15} = 9.91$ ,  $p = 0.0066$ ) y *S. cerevisiae* ( $F_{1,15} = 121.47$ ,  $p < 0.0001$ ), y no fue significativo en las dietas con *S. etchellsii* ( $F_{1,15} = 0.34$ ,  $p = 0.5685$ ) y *Z. mellis* ( $F_{1,15} = 0.0057$ ,  $p = 0.9407$ ). La expresión de *proPO* en las dietas con *S. bombicola* ( $8.41 \pm 6.37$  REL,  $t = -8.27$ ,  $df = 15$ ,  $p < 0.0001$ ) y *S. bombicola 2* ( $9.02 \pm 5.20$  REL,  $t = -3.15$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.0066$ ) fue menor que el control ( $12.44 \pm 8.90$  REL). Las dietas con *S. etchellsii* ( $11.30 \pm 6.67$  REL,  $t = 0.58$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.57$ ) y *Z. mellis* ( $11.81 \pm 8.45$  REL,  $t = 0.08$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.94$ ) no difirieron del control. La dieta con *S. cerevisiae* ( $17.19 \pm 12.28$  REL,  $t = 11.02$ ,  $df = 15$ ,  $p < 0.0001$ ) tuvo un efecto positivo comparado con el control. En todas las dietas, la variación de la expresión fue alta entre los días y negligible entre las cajas: *S. bombicola* (Día = 88.74%); *S. etchellsii* (Día = 86.30%); *S. bombicola 2* (Día = 86.27%); *Z. mellis* (Día = 89.67%); y *S. cerevisiae* (Día = 93.60%). Los valores de *proPO* el día seis fueron:  $22.9 \pm 1.5$  REL en control y  $20.6 \pm 6.9$  REL en dietas con levaduras.



**Figura 2.7** Expresión relativa (Log10, promedio  $\pm$  EE) de *profenoloxidasa* (*proPO*) en abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola 2*, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.

El tipo de dieta afectó la expresión del gen *GOx* (**Fig. 2.8**). El modelo LMM fue significativo en las dietas con *S. bombicola* ( $F_{1,15} = 34.68$ ,  $p < 0.0001$ ), *S. etchellsii* ( $F_{1,13} = 253.49$ ,  $p < 0.00001$ ), *Z. mellis* ( $F_{1,15} = 26.63$ ,  $p < 0.0001$ ) y *S. cerevisiae* ( $F_{1,15} = 5.16$ ,  $p = 0.0383$ ), pero no en la dieta con *S. bombicola 2* ( $F_{1,15} = 0.6826$ ,  $p = 0.4217$ ). La expresión de *GOx* fue menor en las dietas con levaduras que en el control ( $11.38 \pm 6.28$  REL). Las dietas con *S. bombicola* ( $7.89 \pm 3.88$  REL,  $t = -5.89$ ,  $df = 15$ ,  $p < 0.0001$ ), *S. etchellsii* ( $8.10 \pm 4.43$  REL,  $t = -15.92$ ,  $df = 13$ ,  $p < 0.0001$ ), *Z. mellis* ( $9.42 \pm 6.21$  REL,  $t = -5.16$ ,  $df = 15$ ,  $p < 0.0001$ ) y *S. cerevisiae* ( $10.95 \pm 6.38$  REL,  $t = -2.27$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.0383$ ) resultaron en una ligera reducción de la expresión, mientras que, la dieta con *S. bombicola 2* ( $11.27 \pm 6.75$  REL,  $t = -0.83$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.42$ ) no difirió del control. La variación de la expresión de *GOx* fue mayor entre los días y menor entre las cajas en todos los tratamientos con levaduras: *S. bombicola* (Día = 42.47%, Caja = 23.72%); *S. etchellsii* (Día = 38.76%, Caja = 23.37%); *S. bombicola 2* (Día = 39.84%, Caja = 22.18%); *Z. mellis* (Día = 36.13%, Caja = 20.76%); y *S. cerevisiae* (Día = 34.28%, Caja = 19.16%). Los valores de expresión de *GOx* en el día seis fueron:  $16.5 \pm 0.5$  REL en control y  $14.4 \pm 3.4$  REL en dietas con levaduras.



**Figura 2.8** Expresión relativa (Log10, promedio  $\pm$  EE) de *glucosa oxidasa* (*GOx*) en abejas *A. mellifera* alimentadas con dietas enriquecidas con levaduras. Las abejas permanecieron en cajas experimentales nueve días y las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (SP, control), A) SP + *S. bombicola*, B) SP + *S. etchellsii*, C) SP + *S. bombicola 2*, D) SP + *Z. mellis* y E) SP + *S. cerevisiae*.

## 2.4 DISCUSIÓN

Este trabajo experimental es un precedente en el conocimiento de la importancia de las levaduras asociadas al pan de abeja, la miel y alimento larvario en la nutrición y la salud de abejas *A. mellifera* bajo condiciones de laboratorio.

La baja sobrevivencia observada en todas las dietas, incluyendo el control, indicó la presencia de un factor no documentado que probablemente disminuyó el tiempo de vida de las abejas. Una posible explicación es la cantidad de proteína en las dietas. Dietas ricas en nitrógeno (proteínas/aminoácidos) tienen efectos deletéreos en la sobrevivencia y causan una alta mortalidad en las abejas mantenidas en cajas experimentales (Pirk *et al.*, 2010; Archer *et al.*, 2014; Gregorc *et al.*, 2019). Los mecanismos específicos de esta respuesta aún no son claros, pero las dietas ricas en nitrógeno podrían incrementar el estrés oxidativo mediante la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés). Dietas con una proporción 1:5 de proteína:carbohidratos fuertemente reducen la sobrevivencia de las abejas en laboratorio (Archer *et al.*, 2014). En el presente estudio, la proporción fue aproximadamente 1:1; esto significa una alta cantidad de nitrógeno para las abejas y puede explicar las bajas tasas de sobrevivencia obtenidas. Más investigación es necesaria para esclarecer directamente los efectos negativos de las dietas proteicas en la sobrevivencia de las abejas.

Aunque los valores de sobrevivencia fueron bajos, fue posible determinar que las levaduras estudiadas aquí tuvieron un ligero efecto positivo en la sobrevivencia de las abejas si lo comparamos con la dieta control, la cual que no fue enriquecida con ninguna levadura. Esto sugiere que las levaduras naturalmente asociadas a las reservas de alimento de las colonias no disminuirán el estado nutricional de las abejas cuando se usan como componentes alimenticios. Cuando se añade al polen, la levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) afecta positivamente los parámetros de salud de las colonias como la postura de cría (van der Steen, 2007; Herbert y Shimanuki, 1977). Estudios pioneros que estudiaron abejas en laboratorio también encontraron que el uso de levadura de cerveza en el alimento resultó en tasas de sobrevivencia similares a las de abejas alimentadas con polen (Standifer *et al.*, 1960). Estudios recientes han encontrado que la adición de levadura de cerveza en sustitutos de polen puede mantener la longevidad de las abejas en laboratorio, resultando en tasas de sobrevivencia similares a las observadas en abejas alimentadas con pan de abeja (Amro *et al.*, 2020; Esanu *et al.*, 2018; Smodiš-Škerl y Gregorc, 2014). Estos estudios y los nuestros, sugieren que los nutrimentos que se encuentran en las levaduras asociadas a las abejas son una fuente de

alimento adecuada que podría mejorar la salud. Según los resultados, las levaduras asociadas a las abejas parecen ser alimentos seguros para sostener la alimentación de las abejas en laboratorio sin impactos negativos en la sobrevivencia.

En condiciones de laboratorio, el consumo de alimento en las abejas puede reducirse en respuesta a factores como la manipulación, el estrés por el confinamiento y la alimentación artificial (Even *et al.*, 2012). En este estudio, la ingestión de alimento fue similar a la reportada en condiciones naturales, sugiriendo que las abejas consumieron suficiente alimento para mantener sus procesos fisiológicos. Comparado con el control, el consumo de alimento fue más alto en las dietas enriquecidas con levaduras (excepto *S. etchellsii*). Este alto consumo de las dietas con levaduras coincide con el alto consumo de dietas adicionadas con *S. cerevisiae* reportado en laboratorio (Amro *et al.*, 2020) y fue similar con el consumo reportado en colonias en condiciones de campo (Sihag y Gupta, 2011). El alto consumo de nuestras dietas con levaduras pudo ser por los componentes nutricionales presentes en las células de las levaduras (p. ej., lípidos o proteínas) (Herbert *et al.*, 1977) y/o por los volátiles producidos durante el metabolismo microbiano (Christiaens *et al.*, 2014).

Las dietas con levaduras no incrementaron la acumulación de cuerpos grasos en el abdomen de las abejas, aunque su porcentaje permaneció sin cambios durante el experimento. Estudios previos se han enfocado en evaluar como el polen, fuente natural de proteínas y lípidos para las abejas, puede afectar la acumulación de cuerpos grasos. Por ejemplo, dietas enriquecidas con polen tienden a incrementar las reservas de grasa corporal a diferencia de dietas ricas en azúcar (Barragán *et al.*, 2015), y las variaciones en la calidad del polen también pueden afectar los cuerpos grasos. En un estudio, la cantidad de tejido graso fue mayor en las abejas alimentadas con polen multifloral que en las alimentadas con polen monofloral, a pesar de que el consumo fue similar (Alaux *et al.*, 2010a). Los resultados presentados indicaron que las dietas con levaduras ayudaron a mantener un porcentaje constante de cuerpos grasos. Las dietas enriquecidas con levaduras contienen las cantidades de lípidos y proteínas necesarias para una acumulación constante de cuerpos grasos (Di Pasquale *et al.*, 2013). Adicionalmente, el alto consumo observado de las dietas con levaduras proporcionó a las abejas un excedente de nutrimentos para su metabolismo, favoreciendo una acumulación constante de cuerpos grasos. Lo anterior es crítico, porque en el laboratorio, las abejas pueden experimentar una drástica reducción de cuerpos grasos (Toth *et al.*, 2005). Nuestros resultados confirmaron previos reportes (Ramsey *et al.*, 2019) de la preexistencia de reservas de cuerpos grasos en las abejas recién emergidas (día cero), probablemente acumuladas durante las etapas de larva

y pupa. La mayoría de las abejas examinadas exhibieron porcentajes similares de tejido graso, indicando que tenían los recursos necesarios para producir moléculas relacionadas con la función inmune inmediatamente después de emerger (Wilson-Rich *et al.*, 2008).

La expresión de los genes *Vg*, *proPO* y *GOx* no fue afectada negativamente por las dietas con levaduras. Esta información es vital para el entendimiento de los efectos que pueden ejercer estos microorganismos sobre la función inmune y la salud de las abejas cuando se incorporan en la nutrición. El patrón de expresión de *Vg* no difirió entre los tipos de dieta, incluso en el día seis cuando alcanzó los mayores niveles. Al inicio los niveles fueron bajos y se incrementaron gradualmente. Este perfil de *Vg* se espera que ocurra durante la primera semana de desarrollo de las abejas nodrizas porque en esta etapa necesitan altos niveles de vitelogenina para sintetizar jalea real y alimentar a las crías y la reina. (Bitondi y Simões, 1996). Se ha observado que la expresión del gen *Vg* puede ser regulada nutricionalmente usando dietas ricas en proteínas. Aunque el polen y el pan de abeja son dietas aceptables para estimular la expresión de *Vg* y sus niveles proteicos (Di Pasquale *et al.*, 2016; Cremonez *et al.*, 1998), los sustitutos de polen adicionados con levaduras nativas también pueden promover esta estimulación. Por ejemplo, abejas alimentadas con un sustituto adicionado con levaduras y soja mostraron niveles similares de *Vg* que las abejas alimentadas con pan de abeja (Cremonez *et al.*, 1998). En otro estudio, sin embargo, abejas alimentadas con una dieta suplementada con levaduras y soja mostraron niveles bajos de *Vg* que las abejas alimentadas naturalmente en la colonia (Bitondi y Simões, 1996). En otro reporte, abejas alimentadas con un sustituto de polen fermentado por microorganismos aislados del pan de abeja (bacterias y levaduras) mostraron niveles de *Vg* similares a los de abejas alimentadas con pan de abeja, indicando que los microorganismos asociados pueden ayudar a enriquecer las dietas artificiales (Dias *et al.*, 2018). Aunque es necesario mayor investigación, los resultados expuestos sugieren que las levaduras asociadas a las abejas pueden ser una fuente segura de proteínas para mantener niveles saludables de *Vg* y un novedoso sustituto de polen en dietas artificiales.

El perfil general de expresión de *proPO*, independientemente de la dieta, fue diferente de los genes *Vg* y *GOx*, mostrando un incremento gradual hasta el día seis y una leve reducción el día nueve. En las abejas adultas, la expresión de *proPO* alcanza un nivel constante durante la primera semana de vida, y se mantiene en niveles similares en las abejas nodrizas y forrajeras, con leves variaciones (Schmid *et al.*, 2008; Lourenço *et al.*, 2005). La función inmune en los insectos tiene un alto costo en términos de nutrientes y energía, y ambas, son dependientes del consumo de dietas ricas en proteína (Lee *et al.*, 2008). Debido a que la *proPO* es una enzima

(i.e., proteína), esta misma dinámica puede esperarse en el sistema *proPO* (gen-enzima) de las abejas. Aunque, no existen reportes previos de una clara influencia de la nutrición en la expresión de *proPO* en las abejas. No obstante, en los insectos modelo *Spodoptera littoralis* y *Anabrus simplex*, se ha confirmado una influencia positiva de dietas ricas en proteínas en la expresión de *proPO* (Cotter *et al.*, 2019; Srygley *et al.*, 2009). Entre las dietas con levaduras, solo la enriquecida con *S. cerevisiae* causó un efecto positivo en la expresión de *proPO*. Esto no es inusual, ya que esta levadura se ha comercializado como un suplemento alimento con alto contenido de proteínas y vitaminas (Standifer *et al.*, 1960). El sistema *proPO* es la primera línea de defensa humoral y también regula las respuestas celulares inmunes (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012), la reducción en su expresión incrementa la susceptibilidad de los individuos al ataque de patógenos como *Nosema* y ciertos virus.

En todas las dietas, el perfil de expresión de *GOx* fue inicialmente indetectable en las abejas recién emergidas, pero se incrementó gradualmente con la edad. Esto coincide con hallazgos previos que indican que la expresión de *GOx* y la secreción de glucosa oxidasa en las glándulas hipofaríngeas (HPG) depende de la edad y alcanzan niveles altos en las abejas nodrizas y abejas forrajeras (Takenaka *et al.*, 1990). La expresión de *GOx* muestra una dependencia nutrimental (Buceckova *et al.*, 2014), por ejemplo, los niveles de *GOx* se observan altos en abejas alimentadas con una dieta multifloral que con una dieta monofloral o una dieta rica en azúcares (Alaux *et al.*, 2010a). Esta respuesta es apoyada por el estudio realizado con el insecto modelo *Spodoptera exigua*, en donde los altos niveles de *GOx*, solo se observaron en los insectos alimentados con una dieta artificial rica en nutrimentos (Merkx-Jacques y Bede, 2005). Nuestras dietas con levaduras tuvieron un ligero efecto negativo en la expresión de *GOx*, aunque diferentes densidades celulares o cócteles de levaduras podrían mejorar la respuesta. Hasta ahora, no existen reportes sobre el uso de levaduras asociadas a las abejas en sustitutos de polen como moduladores nutricionales de *GOx*. Solo un estudio encontró que las glándulas hipofaríngeas, principales sitios de síntesis de *GOx* (Ohashi *et al.*, 1999), fueron estimulados en las abejas después de alimentarse con un sustituto de polen adicionado con la levadura *C. tropicalis* (Amro *et al.*, 2020). Los efectos negativos en *GOx* merecen atención, porque puede disminuir la capacidad de las abejas para esterilizar el alimento de cría y la miel, llevando a las colonias a ser más susceptibles al ataque de patógenos.

Aunque los resultados presentados no son concluyentes en demostrar que las dietas suplementadas con levaduras mejoran la salud de las abejas, si muestran que pueden sostener la sobrevivencia, son altamente apetecibles para las abejas y que mantienen la acumulación de

cuerpos grasos. Además, las dietas suplementadas con levaduras pueden mantener los genes relacionados con la función inmune dentro de un rango de expresión aceptable y óptimo. Por ejemplo, la adición de *S. cerevisiae* a la dieta puede incrementar la expresión de *proPO*. En un futuro, los estudios sobre dietas enriquecidas con levaduras pueden explorar el uso de diferentes densidades celulares y cocteles definidos de especies, así como la evaluación de la capacidad antagonista de las levaduras contra patógenos intestinales de las abejas tales como *Nosema* spp. Finalmente, este estudio representa una contribución al conocimiento de las levaduras nativas y su uso como moduladores para mejorar la nutrición, y como parte de una estrategia para mejorar la salud y la función inmune en las colonias de *A. mellifera*.



## CAPÍTULO III

### PROTEIN NUTRITION INCREASES MIXED *Nosema* INFECTION AND MODULATES THE EXPRESSION OF IMMUNE RELATED GENES IN AFRICANIZED *Apis mellifera*

Canché-Collí<sup>1</sup>, C., Rodríguez<sup>1</sup>, R., Estrella-Maldonado<sup>1</sup>, H., Medina-Medina<sup>2</sup>, L.A., Canto<sup>1\*</sup>, A.

<sup>1</sup> Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Unidad de Recursos Naturales, Calle 43 # 130, x 32 y 34 Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida CP 97205, Yucatán, México;

<sup>2</sup> Departamento de Apicultura, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán Apdo, Postal 4-116, 97100, Merida, Yucatan, Mexico

#### ABSTRACT

The intestinal disease nosemosis causes considerable damage to the physiology of bees, affecting their health, nutrition, and defense. In Yucatan, Mexico, this infection occurs in the apiaries as a mixed *Nosema ceranae* and *Nosema apis* spores. There is evidence that diet quality influences the levels of disease; however, more experimental studies are needed to confirm this. In this study, we tested two types of diet (free protein and protein diets) as a factor that can modify infection levels (spore density) in Africanized *Apis mellifera*. We also tested how these mixed infections alter expression of *vitellogenin* (*Vg*), *prophenoloxidase* (*proPO*) and *glucose oxidase* (*GOx*) genes, critical components of nutrition, immunity, and social immunity in bees. A collective inoculation method with a mixture of *N. ceranae* and *N. apis* spores was conducted under controlled conditions to infect newly emerged bees. After the infection procedure, infected and no infected (control) groups of bees were fed one of two types of diet: 50%-sucrose syrup and pollen substitutes. We observed that pollen substitute diet promoted high spore densities and high levels of expression of the genes of *N. ceranae* and *N. apis* in the gut of bees. The survival of bees was lower in bees fed the pollen substitute diet than those that consumed 50%-sucrose syrup. In addition, *Nosema* spore inoculation induced a rapid decrease in expression of *Vg*, *proPO*, and *GOx* genes.

#### KEYWORDS

*Apis mellifera*, gene expression, collective inoculation, infection, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*

### 3.1 INTRODUCTION

*Nosema ceranae* and *Nosema apis* are (Fungi: Microsporidia) intracellular spore-forming parasites that destroy the midgut epithelium in bees, disrupting nutrient absorption and resulting in the early death of bees (Higes *et al.*, 2008). These species, recognized as prevalent pathogens of *Apis mellifera*, also parasitize stingless bees (Meliponini) and bumblebees (Bombini) (Porrini *et al.*, 2017; Plischuk *et al.*, 2009), becoming a major threat to bee health globally. *Nosema* infections cause energetic stress in worker bees altering the regulatory Vg-JH, antibacterial peptides, and defensive enzyme networks. This physiological and gene expression alterations promote precocious foraging and reduce the lifespan of worker bees (Goblirsch *et al.*, 2013; Mayack y Naug, 2009; Antúnez *et al.*, 2009).

In bees, the infection level is a crucial factor that influences the initiation of physiological alterations. The standard procedure to determine the infection level is exploring the density of *Nosema* spores in the bee guts. Monitoring infection levels helps understand the relationship between the number of pathogens and the level of critical variables such as vitellogenin (Vg), prophenoloxidase (proPO), and glucose oxidase (GOx). Vg is a lipoprotein that modulate lifespan, behavioral tasks, and immune responses (Salmela *et al.*, 2015); likewise, proPO is the zymogen of phenoloxidase (PO) an enzyme involved in immune responses (González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012); GOx enzyme protects entire colonies due to trigger antiseptic benefits when is added by worker bees to stored honey and brood food (Bucekova *et al.*, 2014). Infections caused by *Nosema* species can suppress the expression of Vg, proPO, and GOx genes.

Most of the *Nosema* studies use individual inoculation (IN) method, which consists in inoculate each worker bee with a small volume of sugar solution contaminated with *Nosema* spores. The IN method produces homogeneous infection levels among bees, however, it induces a considerable stress and yielded low numbers of inoculated bees. Collective inoculation (CI) is an alternative method where caged bees are inoculated collectively by feeding with food contaminated with spores. Although not widely documented, a disadvantage attributed to CI method is the heterogenous infection levels observed among bees (Fries *et al.*, 2013). Conversely, the main advantage is that CI method allows to inoculate many groups of worker bees in relatively short periods of time. Research efforts focused on studying *Nosema* infections using collective inoculation protocols are valuable because they allow increasing the number of

samples, which helps to make a comprehensive assessment of the impacts of *Nosema* on the physiology of bees.

*Nosema* pathogens obtain resources and energy from the bee they infect, and it is reasonable to think that the diet ingested affect the infection levels and the onset of alterations. Fleming *et al.* (2015) showed that the quality/quantity of diets used to feeding bees affects *Nosema* infections. They evidenced that ingestion of rich-protein diets, such as pollen substitutes (PS), promote high spore numbers in infected bees. Pollen substitutes are artificial food formulations containing essential vitamins and proteins derived from soja, yeast, or wheat. The beekeepers use these artificial PS to feed colonies when access to pollen and nectar are limited. This artificial nutrition in managed colonies may be promoting high infection levels of *Nosema*. Interestingly, this topic remains poor explored in *Nosema* research.

In this work, we tested the effect of diet (sucrose and pollen substitute) on the infection level (spore density) by studying infections caused by *Nosema ceranae* and *N. apis* in *Apis mellifera* worker bees. Also, the effect of these infections on health, nutrition, and immunity responses was evaluated. We used a collective inoculation method to infect bees with *Nosema* spores. *Nosema* pathogens are nutritionally dependent on the bee they infect, so we hypothesized that those bees fed a protein diet will show high infection levels. Also, in infected bees is expected a negative effect on variables related to health, nutrition, and immunity) We established three objectives; first, we obtained the proportion of infected bees from groups inoculated with sucrose (free protein food) and pollen substitute (PS, protein food). Second, we measured *Nosema* spore density at six-time points and the gene expression of *N. ceranae* and *N. apis* in bees fed sucrose and pollen substitute. Third, we determined the impact of *Nosema* infections on worker survival, food intake, and expression of *Vg*, *proPO* and, *GOx* genes.

## **3.2 MATERIALS AND METHODS**

### **3.2.1 Bees and hoarding cages**

Africanized *A. mellifera* bees were obtained from five-frame nucleus colonies in the experimental apiary of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny (FVMZ) of the Autonomous University of Yucatan, Mexico (20°51'51.62" N, 89°36'45.35" W). During summer 2018, two frames of sealed brood was obtained from four colonies and maintained at 36 °C and 70% air humidity during 24 h until the emergence of worker bees. The newly emerged bees from all frames were collected, mixed, and randomly assigned in groups of 30-40 in transparent

plastic cages (11.0 × 9.0 × 7.5 cm) (**Fig. 3.1**). The bottom of each plastic cage was covered with a disc of sterilized filter paper to absorb excess of humid and bee's droppings. We add a sterilized piece of wax (3.5 × 5.5 cm), inner attached at the top of the cage to allow the bees to hold onto something, as happens in the colony. Each cage has approximately 200 holes of 3.0 mm diameter to allow sufficient ventilation. A 2 cm diameter hole was cut in the side of each cage and sealed with adhesive tape to allow feeding and handling of bees. Two plastic containers were placed into the cage, one for food and the other for water. We put two feeders on the bottom of each cage. Food supply was every two days by replacing the old feeder with a new one filled with fresh food. Water was provided and dead bees were removed every day from the cages. All cages were maintained in the darkness at 30 °C and 70% air humidity during the experiments with constant airflow.



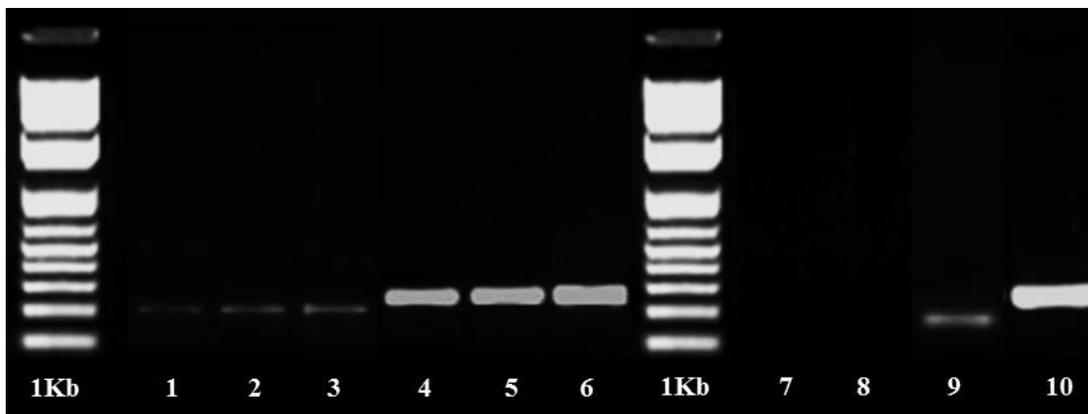
**Figure 3.1** Standard plastic cage designed to confine newly emerged bees infected with *Nosema* spores.

### 3.2.2 Diets

We tested two different types of diet, sucrose syrup, and a pollen substitute, to evaluate their effects on the infection level of *Nosema* spp. One free-protein diet tested was 50% (w/w) sucrose elaborated with sterile tap water and sucrose under aseptic conditions and autoclaved. The second diet was a proteinaceous pollen substitute (PS) with pasty consistence formulated according with van der Steen (2007). The PS was elaborated on a weight/weight basis (proportion of total mass) as follow for one gram: soya flour (14%), beer yeast flour (10%), calcium caseinate flour (15%), whey protein flour (4%), sucrose syrup (48%) of 50% weight/weight of sugar dissolved in tap water), and linseed oil (9%).

### 3.2.3 Identification of *Nosema ceranae* and *N. apis* in experimental colonies

Before preparing the spore inoculum, the identification of the *Nosema* species in the colonies of the experimental apiary was carried out using the PCR method. Ten foraging bees captured from all colonies were sacrificed, pooled, and stored at -20 °C for further DNA spore extraction. We cut abdomens and they were ground and homogenized in 10 mL of sterilized water. This abdomens solution was filtered using nylon honey filter (pore size of 177 µm; Better Bee Supplies, Cambridge, Ontario, CA) to remove tissue debris. The filtered solution was centrifuged at 4 °C for 10 min at 10, 000 rpm to obtain a pellet of *Nosema* spores, and the supernatant was discarded. *Nosema apis* and *N. ceranae* were confirmed (**Fig. 3.2**) in each pellet of spores using a conventional PCR method as reported Martín-Hernández *et al.* (2012). DNA was extracted from the pellets of spores using the Zymo Research Quick-DNA Tissue/Insect Miniprep Kit, according to the manufacturer's instructions. One microliter of each DNA sample was examined using a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE, USA), and the quality was confirmed by agarose gel electrophoresis (1.5 %) during 30 min at 80 V. DNA pellet was suspended in 50 µL of DNA Elution Buffer and the samples were stored at -20 °C until PCR amplification. The primers sequences used in this study were: *N. ceranae* (5'-CGGATAAAAGAGTCCGTTACC-3' and 3'-TGAGCAGGGTTCTAGGGAT-5' with 250-bp amplicon; Chen *et al.*, 2008) and *N. apis* (5'-TGAGGGAGGTCAGGCATGAT-3' and 3'-AGGCCTTGCTTGTAGGAGAAAAG-5' with 208-bp amplicon; designed in this work). PCR reactions contained 5 µL 10x PCR Buffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.8 µL dNTPs (10 mM), 0.2 µL Taq polymerase, 1 µL DNA template (300 ng total in 1 µL), 1 µL for each primer (10 mM of each primer) and 39 µL of ultra-pure H<sub>2</sub>O, in a total volume of 50 µL. The thermocycler was programmed to run at 95 °C for 3 min, followed by 38 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C (for *N. apis*) or 61 °C (for *N. ceranae*) 1 min at 72 °C and final extension step at 72 °C for 5 min, holding reactions at 4 °C. To positive control was used a macerate with 100, 000 spores in 1.0 mL obtained from pooled abdomens of infected foragers, likewise, to the negative control was used pooled abdomens of newly emerged bees (*Nosema* free bees). Positive and negative (no template) controls were analyzed to detect possible contamination or amplification failures.



**Figure 3.2** PCR amplification of representative forager bees sampled from different colonies during summer 2018 in the experimental apiary of the FVMZ. Lanes 1-3 indicates three different colonies amplified with *N. apis* primer (208-bp) and lane 4-6 with *N. ceranae* primer (250-bp). Lane 7 and 8 were used as negative control (NC) for both primers. Spore solution (100, 000 spores) obtained from infected bees was used as positive control for amplify *N. apis* (lane 9) and *N. ceranae* (lane10). 1 Kb was used as DNA ladder.

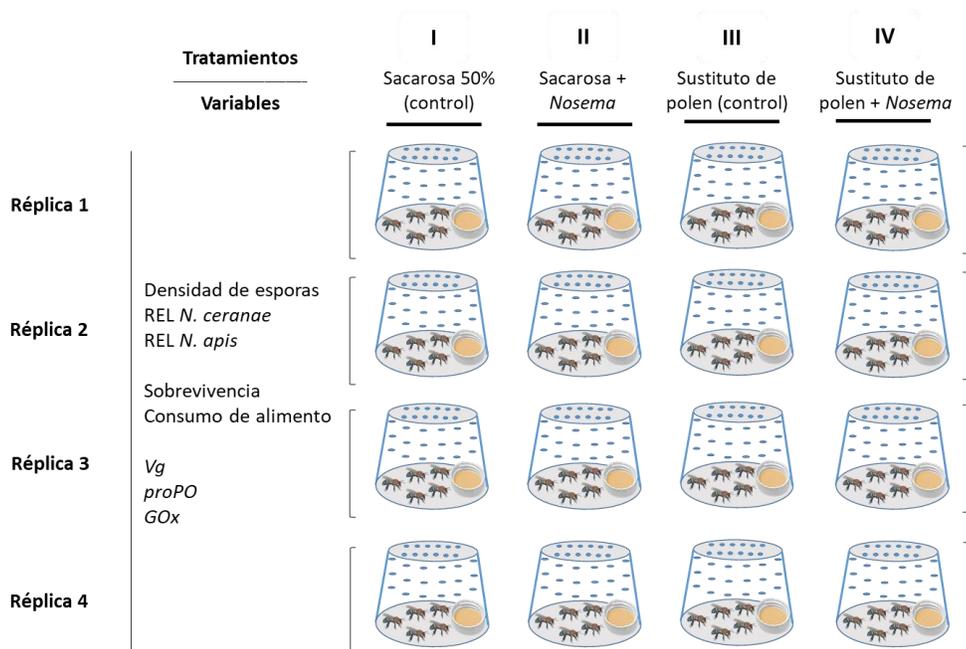
#### 3.2.4 *Nosema* inoculum

To carry out the collective inoculation protocol, *Nosema* spores (*N. ceranae* and *N. apis*) were obtained from an infected colony previously identified with high level of infection ( $10 \times 10^6$  spores/bee). Ten forager bees were captured, sacrificed and their guts were extracted and pooled. The guts were crushed and homogenized in 10 mL of sterilized water and spore density was estimated by counting spores using a microscope (Olympus CX31) and a Neubauer chamber (Marienfeld, 0.1 mm depth; counting area 0.2x0.2 mm) at 400X magnification. Spore density was set at  $1.0 \times 10^6$  spores/mL by diluting the spore suspension in 50% (w/w) sucrose solution. This inoculum of spores was refrigerated 24 h before applying the inoculation procedures.

#### 3.2.5 Experimental design and collective inoculation method

We established four treatment groups and assigned to each group four cages with newly emerged bees, resulting in 16 cages and approximately 509 bees. The worker bees were food-restricted during three hours after emerging to ensure the ingestion of inoculum. After three hours of fasting each group of bees fed 24 h with their respective treatment with and without inoculum. The diets were supplied to all groups of bees at the same time and using sterilized plastic feeders (described above), ensuring that all bees within each cage had free and simultaneous access to the feeder. The treatments were: Syrup + *Nosema*: 50% sucrose (2.1 g) with  $2 \times 10^6$  *Nosema* spores/mL; Pollen substitute + *Nosema*: pollen substitute (2.0 g) mixed with

50% sucrose (2.0 g) with  $2 \times 10^6$  *Nosema* spores/mL. Syrup (energetic control): 50% sucrose (2.1 g); Pollen substitute (protein control): pollen substitute (2.0 g) mixed with 50% sucrose (2.0 g) (Fig. 3.3). Once inoculation procedure has done, cages with bees were kept for 24 h in darkness at 30 °C, 70% air humidity and constant airflow. The collective inoculation method allows each bee to receive an approximate dose of 66, 666 spores for 24 h. After inoculation procedure, worker bees fed for 10 days their corresponding diet but with no *Nosema* spores added.



**Figure 3.3** Diseño experimental de la evaluación del efecto del tipo de dieta sobre el nivel de infección de *Nosema* en abejas africanizadas de *A. mellifera*.

### 3.2.6 Proportion of infected bees and *Nosema* spore density

The proportion of infected bees and the spore density per bee were estimated from groups fed and inoculated with spores using sucrose and pollen substitute. We randomly collected a subsample of two bees per treatment on 0, 2, 4, 6, 8, and, 10-day post-inoculation. Briefly, each bee was anesthetized with cold, their gut was removed, crushed, and homogenized in 1-mL sterilized water, and an aliquot (8.0  $\mu$ L) was examined under microscope in triplicate. The proportion of infected bees per treatment group was obtained from the number of individuals positive to *Nosema* spores over total number of inoculated bees. Spore density per bee in each treatment group was determined by counting *Nosema* spores using a microscope (Olympus CX31) and a Neubauer chamber (Marienfeld, 0.1 mm depth; counting area 0.2x0.2 mm) at 400X magnification.

### 3.2.7 Gene expression analysis

Expression of *N. ceranae*, *N. apis*, *Vg*, *proPO*, and *GOx* genes was measured using RT-qPCR. During ten days, three bees were removed every two days from each cage, killed and dissected. Expression of *N. ceranae* and *N. apis* were measured using abdomen samples. Expressions of *Vg* and *proPO* were measured using abdomens and *GOx* expression using heads. The abdomens and heads were each pooled by cage, ground and homogenized in TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) following manufacturer instructions for isolation of total RNA. Genomic DNA contamination was extracted from the samples using DNase I (DNA-free kit, Ambion, USA), and RNA concentration and purity measured with a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE, USA). Quality of the RNA was checked by electrophoresis in agarose gel (1.5%). A well-established, in-house protocol was used to produce single-strand complementary DNA (cDNA) from 300 ng purified RNA of each sample by reverse transcription using a final concentration of 50 U/μL MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Invitrogen/Life Technologies, CA, USA). Synthesis of cDNA was done at 42 °C for 50 min. The first-strand cDNA was analyzed by RT-qPCR using primers for *N. ceranae*, *N. apis*, *Vg*, *proPO*, *GOx*, and the RPS5 reference gene. A 250-bp *N. ceranae* amplicon was generated with KF607066.1-F (5'-CGGATAAAAGAGTCCGTTACC-3') and KF607066.1-R (3'-TGAGCAGGGTTCTAGGGA-5') (Chen *et al.*, 2008). In this study, we developed a primer pair enzyme-specific and used it to generate a 208-bp *N. apis* amplicon with the Primer Express ver. 3 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): U97150.1-F (5'-TGAGGGAGGTCAGGCATGAT-3') and U97150.1-R (3'-AGGCCTTGCTTGTAGGAGAAAA-5'). A 150-bp *Vg* amplicon was generated with NM\_001011578.1-F (5'-TTGGAGAGCAACATGCAGA-3') and NM\_001011578.1-R (3'-TCGATCCATTCTTGATGGT-5') (Tsuruda *et al.*, 2008). In this study, we developed a primer pair enzyme-specific and used it to generate a 130-bp *proPO* amplicon: AY242387.2-F (5'-GAACGGCTATGTAATCGTCTTGA-3') and AY242387.2-R (3'-TACCGCTGGGTCGAAATGG-5'). A 201-bp *GOx* amplicon was generated with AB022907.1-F (5'-GAGCGAGGTTTCGAATTGGA-3') and AB022907.1-R (3'-GTCGTTCCCCGAGATTCTT-5') (Yang and Cox-Foster, 2005). One pair of internal reference primers was used for generating a 115-bp amplicon of ribosomal protein S5 (reference gene RPS5): XM\_006570237.2-F (5'-AATTATTTGGTCGCTGGAATTG-3') and XM\_006570237.2-R (3'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA-5') (Evans, 2006) (more details in Appendix). Analysis by RT-qPCR was run with a thermocycler StepOne™ Real-Time PCR System using the StepOne ver. 2.3 software (Applied Biosystems). Each sample per cage was run in three internal

replicates, which were analyzed with RT-qPCR using a 48-well PCR plate. Amplification of cDNA was done using SYBR Green Master Mix as a detection signal (Applied Biosystems), 2  $\mu$ L cDNA, and 4  $\mu$ M of each gene-specific primer at a 0.4  $\mu$ M concentration in a 20  $\mu$ L reaction volume. Amplification runs were: 95 °C for 3 min; and 40 cycles of 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. The specificity and accuracy of the RT-qPCR products for all samples were verified with melting curve analysis. Relative expression levels (REL) of *N. ceranae*, *N. apis*, *Vg*, *proPO* and *GOx* genes were calculated using the comparative Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) method (Schmittgen and Livak (2008)). The relative quantification of the target genes was normalized to RPS5 expression.

### **3.2.8 Survival**

To measure survival all cages were monitored for 20 days. Estimates of bee survival by cage in the corresponding treatment were generated by the number of living and dead bees per cage per day during the 20-day experiment. These data were used to construct survival probability curves and to calculate median survival time, that is, the shortest time for which bee survival was less than or equal to 0.5. Dead individuals were removed daily to prevent contamination.

### **3.2.9 Food intake**

For all cages in all treatment groups, average daily food intake per bee (% food intake/bee/day) was measured over ten days Williams *et al.* (2013). Feeders were filled with the respective diet type, weighed (initial mass), and placed in the corresponding cage. The time (h) at which each feeder was placed into a cage and the number of living bees in the cage (initial bees) were recorded. After two days, the feeders were removed, recording the time (final time) and the number of living bees in the cage (final bees). Feeder weight (final mass) was measured and the total amount of food consumed calculated by subtracting final mass from initial mass. Average food evaporation was estimated by placing control feeders in cages under the same conditions as the treatment feeders but without bees. Food intake was calculated by subtracting the average evaporation value from the observed differences in mass in the experimental diets. The time during which the feeders were inside the cages was calculated by subtracting initial time from final time. Hourly intake by cage was calculated by dividing food intake mass by feeder time in the cage, and hourly intake per bee was calculated by dividing hourly cage intake by the final number of living bees in a cage. Daily bee intake was calculated by multiplying hourly bee intake by 24.

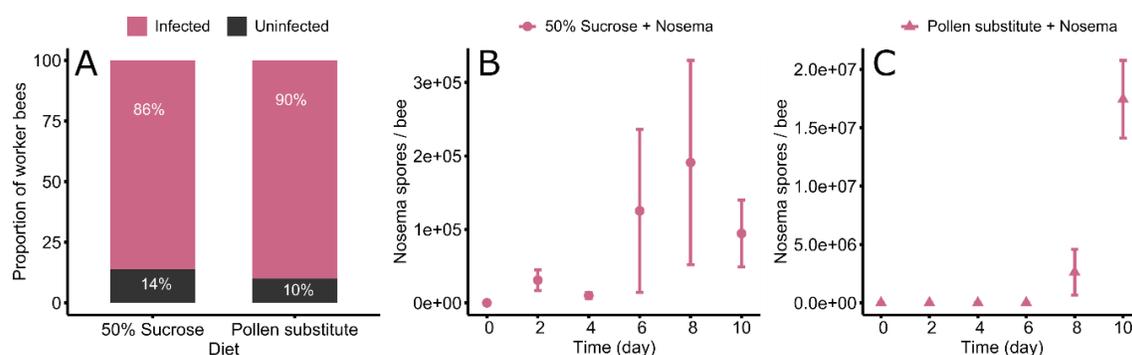
### 3.2.10 Data analysis

The data was tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test), homogeneity of variance (Levene's test), and transformed if needed before run the analyses. If the data did not have a normal distribution, we used Generalized Linear Models (GLMs). The values obtained on day zero were excluded from the statistical analyses. Differences in the proportion of infected bees between treatment groups inoculated with sucrose and pollen substitute were analyzed using the Barnard's unconditional test. The effect of treatment and time on spore density (infection level) was analyzed using a GLM with negative binomial distribution and the log link function because this data showed considerable over-dispersion; the model used was:  $\text{spore density} \sim \text{Treatment} * \text{Day}$ . The GLM were fitted using the *glm.nb* function from the package *MASS* (Venables and Ripley, 2002). The effect of treatment and time on the relative expression of *N. ceranae* and *N. apis* genes was explored using a GLM with gamma distribution and the log link function; the model used was:  $\text{REL} \sim \text{Treatment} + \text{Day}$ . The bee survival curves and median survival time obtained from inoculated and uninoculated groups fed sucrose and pollen substitute were compared using the non-parametric Kaplan-Meier survival analysis and the Log-Rank test. Survival curves for each treatment group were built with the *survival* (Therneau, 2019) and the *survminer* (Kassambara and Kosinski, 2019) packages. In each group, the Kaplan-Meier estimator was applied to calculate the probability that an individual bee would survive at a particular time. The Log-Rank test was used to compare survival probability between the treatment groups. The influence of treatment and time on food intake (Log10-transformed) was analyzed using Linear Mixed Effects Models (LMM) using the *lmerTest* package (Kuznetsova *et al.*, 2019). In the analyses, treatment and day were treated as fixed effects, and the cage was treated as random factor. The model used was:  $\text{food intake} \sim \text{Treatment} + \text{Day} + (1|\text{cage})$ . To statistical test the effect of treatments and time on the expression of *vitellogenin*, *prophenoloxidase* and *glucose oxidase* genes we conducted a GLM with gamma distribution and the log link function; the model used was:  $\text{REL} \sim \text{Treatment} * \text{Day}$ . For the analyses of each variable, we compared models with and without the interaction of factors. For comparisons, we considered the values of the Akaike informative criterion (AIC) and Bayesian informative criterion (BIC). The models with the lowest values (AIC and BIC) fit the data better and were chosen for the analyzes. All analyses were conducted in RStudio (RStudio Team, 2006) and the p values below 0.05 were considered significant.

### 3.3 RESULTS

#### 3.3.1 Proportion of infected bees

After ten days post-inoculation, bee groups fed sucrose + *Nosema* and bees fed pollen substitute + *Nosema* showed a similar proportion of infected bees (86 and 90%, Score statistic = -0.04,  $p > 0.05$ ) meaning that both diets were suitable vehicles to inoculate spores (**Fig. 3.4**). Likewise, both groups showed a similar spore density among individuals.



**Figure 3.4** Proportion of uninfected (grey) and infected (pink) worker bees after ten days post-inoculation (A) with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose and pollen substitute. *Nosema* spore density (average  $\pm$  SE) in worker bees inoculated with 50% sucrose (B) and pollen substitute (C).

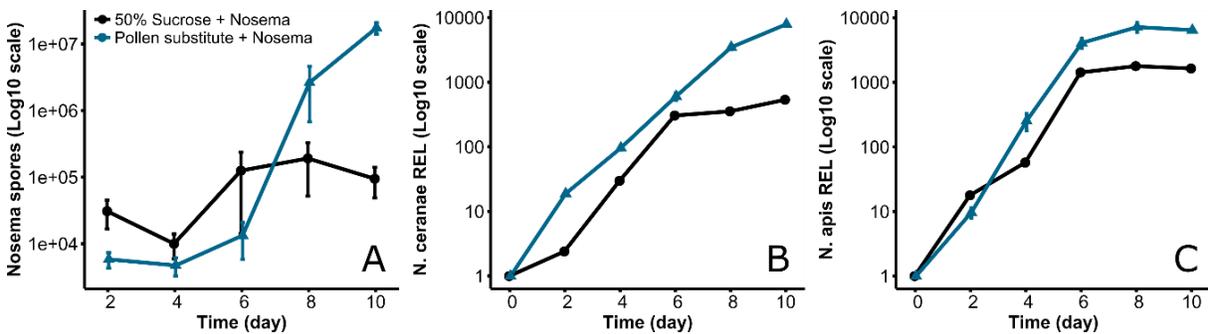
#### 3.3.2 *Nosema* spore density

Spore density was affected by the diet used for inoculation and fed bees (Intercept value =  $9.69 \pm 0.84$ ; Pollen substitute + *Nosema*, GLM negative-binomial: Estimate =  $-3.77 \pm 1.21$ ,  $Z = -3.11$ ,  $p = 0.0018$ ), the day (GLM negative-binomial: Estimate =  $0.25 \pm 0.12$ ,  $Z = 1.97$ ,  $p = 0.0479$ ) and the combination of both factors (GLM negative-binomial: Estimate =  $0.79 \pm 0.18$ ,  $Z = 4.26$ ,  $p = 0.000$ ). Bees fed pollen substitute + *Nosema* showed increased spore densities, particularly on day ten ( $17 \times 10^6$  spores/bee), unlike the low values recorded in bees fed sucrose + *Nosema* ( $9.4 \times 10^4$  spores/bee) (**Fig. 3.5A**). Few control bees showed one or two spores in the samples (data not shown).

#### 3.3.3 Relative expression level (REL) of *Nosema ceranae* and *N. apis*

The expression level of *N. ceranae* did differ by the diet used for inoculation and fed bees (Intercept value =  $0.40 \pm 0.38$ ; Pollen substitute + *Nosema*, GLM gamma: Estimate =  $1.73 \pm 0.29$ ,  $t = 5.81$ ,  $p = 0.000$ ) and also a time-dependent increase was observed (Day, GLM gamma: Estimate =  $0.92 \pm 0.05$ ,  $t = 17.58$ ,  $p < 0.000$ ). Respect to expression of *N. apis*, the

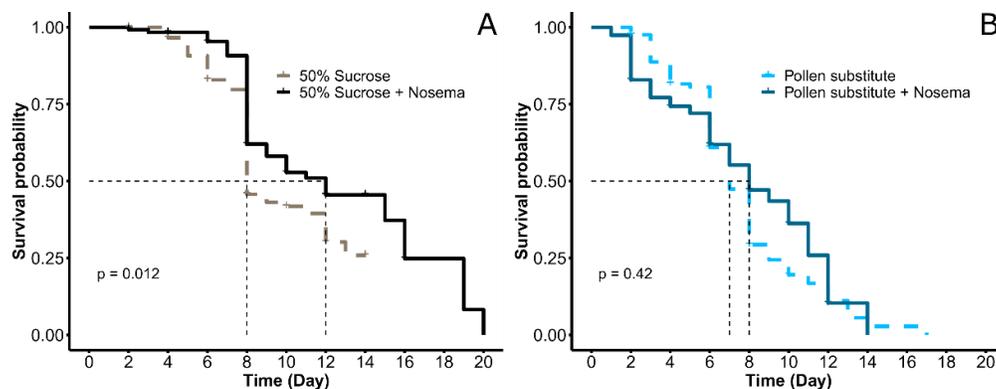
level was affected independently by the diet (Intercept value =  $1.84 \pm 0.48$ ; Pollen substitute + *Nosema*, GLM gamma: Estimate =  $1.07 \pm 0.38$ ,  $t = 2.83$ ,  $p = 0.008$ ) and the day (GLM gamma: Estimate =  $0.72 \pm 0.06$ ,  $t = 10.85$ ,  $p = 0.000$ ). *Nosema ceranae* and *N. apis*, showed a similar increase along the time. Both data, spore density per bee and REL values confirmed high levels of infection in bees fed pollen substitute + *Nosema*; for bees fed sucrose + *Nosema*, spore density and REL data showed low correspondence (**Fig. 3.5B-C**).



**Figure 3.5** Spore density (A) and Relative Expression Levels (REL) of *Nosema ceranae* (B) and *N. apis* (C) in worker bees inoculated with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose and pollen substitute. For visualization, the Y-axis of each plot was Log10 transformed. Each data point represents the average  $\pm$  SE.

### 3.3.4 Survival

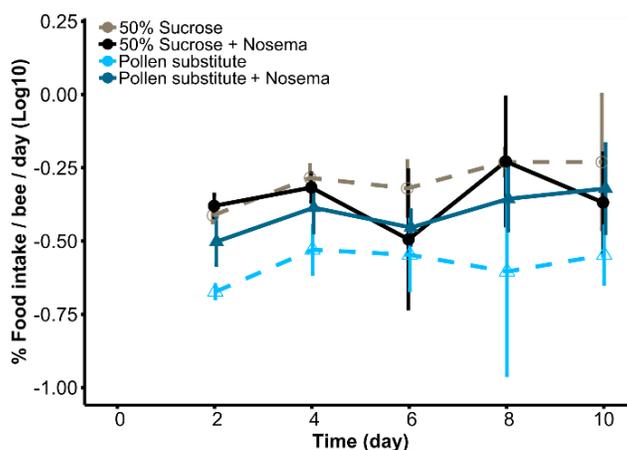
Differences in survival times were observed between bees fed sucrose and bees fed sucrose + *Nosema* (Log-Rank,  $p < 0.5$ ), the latter showed higher lifespan (**Fig. 3.6**). In bees fed pollen substitute and bees fed pollen substitute + *Nosema*, the survival times did not differ (Log-Rank,  $p > 0.5$ ) (**Fig. 3.6**). In general, all bee groups fed pollen substitute (median = 6 days) showed lower survival times.



**Figure 3.6** Survival curves of uninoculated and inoculated bees with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose (A) and pollen substitute (B). The survival curves were compared according to Log-Rank test with  $p < 0.05$ . Dashed lines indicate median survival time.

### 3.3.5 Food intake

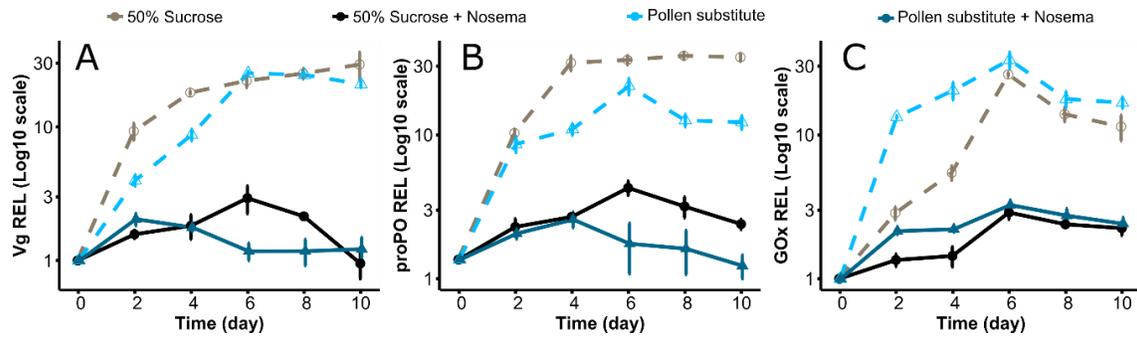
Treatment diets affected average daily food intake per bee (LMM, Intercept value =  $-0.36 \pm 0.09$ ; Sucrose + *Nosema*, Estimate =  $-0.06 \pm 0.07$ ,  $df = 73$ ,  $t = -0.94$ ,  $p = 0.346$ ; Pollen substitute, Estimate =  $-0.29 \pm 0.07$ ,  $df = 73.04$ ,  $t = -4.01$ ,  $p = 0.0001$ ; Pollen substitute + *Nosema*, Estimate =  $-0.11 \pm 0.07$ ,  $df = 73.04$ ,  $t = -1.61$ ,  $p = 0.110$ ), but the effect of days did not alter this response (Day, Estimate =  $0.013 \pm 0.009$ ,  $df = 73$ ,  $t = 1.40$ ,  $p = 0.163$ ). Differences occur between bees fed sucrose and bees fed pollen substitute, the latter showed the lowest food intake (**Fig. 3.7**). All the bees inoculated with *Nosema* spores did not alter their food intake response.



**Figure 3.7** Daily food intake (%) of uninoculated and inoculated bees with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose and pollen substitute. Each data point represents the average  $\pm$  SE.

### 3.3.6 Relative expression level (REL) of *Vg*, *proPO*, and *GOx* genes

The REL of *Vg*, *proPO* and *GOx* genes was significantly affected by the diets used for inoculation and fed bees, the day and, the interaction of both factors. The detailed statistical values for each gene are shown in the **Table 1**. Notably, the three genes were down-regulated at second day post-inoculation in bees fed sucrose + *Nosema* and bees fed pollen substitute + *Nosema* (**Fig. 3.8A-C**); at day ten, the level of the three genes remained lowered. Conversely, worker bees free of *Nosema* showed increased levels of these genes and reach high values on day six.



**Figure 3.8** Relative Expression Levels (REL) of *Vg* (A), *proPO* (B), and *GOx* (C) in worker bees inoculated and uninoculated with *Nosema* (66, 666 spores per bee) using 50% sucrose and pollen substitute. For visualization, the Y-axis of each plot was Log<sub>10</sub> transformed. Each data point represents the average  $\pm$  SE.

**Table 3.1** Statistical results of Generalized Lineal Models (GLMs) with gamma distribution (link = *log*) for *Vg*, *proPO*, and *GOx* genes.

Response variable	Independent variable	Estimate $\pm$ SE	Intercept value	<i>p</i> value
REL <i>Vg</i>	Diet B	-1.37 $\pm$ 0.32	2.20 $\pm$ 0.22	0.000
	Diet C	-0.85 $\pm$ 0.32		0.010
	Diet D	-1.40 $\pm$ 0.32		0.000
	Day	0.12 $\pm$ 0.03		0.0004
	Diet B*Day	-0.16 $\pm$ 0.04		0.001
	Diet C*Day	0.09 $\pm$ 0.04		0.061
	Diet D*Day	-0.20 $\pm$ 0.04		0.0001
REL <i>proPO</i>	Diet B	-1.58 $\pm$ 0.30	2.25 $\pm$ 0.21	0.000
	Diet C	-0.30 $\pm$ 0.30		0.325*
	Diet D	-1.53 $\pm$ 0.30		0.000
	Day	0.11 $\pm$ 0.03		0.001
	Diet B*Day	-0.09 $\pm$ 0.04		0.042
	Diet C*Day	-0.06 $\pm$ 0.04		0.138*
	Diet D*Day	-0.18 $\pm$ 0.04		0.0002
REL <i>GOx</i>	Diet B	-1.02 $\pm$ 0.40	1.26 $\pm$ 0.28	0.014
	Diet C	1.66 $\pm$ 0.40		0.0001
	Diet D	-0.46 $\pm$ 0.40		0.252*
	Day	0.18 $\pm$ 0.04		0.000
	Diet B*Day	-0.11 $\pm$ 0.06		0.068
	Diet C*Day	-0.17 $\pm$ 0.06		0.005
	Diet D*Day	-0.16 $\pm$ 0.06		0.008

### 3.4 DISCUSSION

In this study, we explored the links between the type of diet and mixed infections of *Nosema ceranae* and *N. apis*, and the response of immune and social immune-related genes to these mixed infections in *A. mellifera* worker bees.

The sucrose and pollen substitute used in our CI method resulted in high proportion of infected bees (86 and 90%, respectively). It is assumed that CI leads to unequal ingestion of spores among bees causing low prevalence (23.3-35.8%, Jack *et al.*, 2016). However, similar to our results, recent studies report a prevalence of 90-100% using CI (Badaoui *et al.*, 2017; Lecocq *et al.*, 2016; Urbietta-Magro *et al.*, 2019) confirming the validity of this method to inoculate spores. These studies and ours use an inoculum of 30, 000-114, 000 spores/bee, which possibly favors the transmission of spores among bees. On the other hand, sucrose syrup has been the gold standard to inoculate spores, but our results suggest that pasty proteins like pollen substitute can be useful. Possibly, the nutritional environment (e.g., pH) of substitutes promotes high spore germination as suggested Fleming *et al.* (2015), but more evaluation is needed. Also, contrary to expected, the spore density variation was lower in our infected bees.

We noticed that pollen substitute promotes high spore densities in infected bees than sucrose and this response was also reported in infected bees fed natural pollen (Jack *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2014) or artificial proteins (Fleming *et al.*, 2015) and confirm that protein nutrition favored *Nosema* infection levels. Worker bees fed proteins reach a high nutritional condition and represent an attractive host to exploit by the pathogens. Here, the maximum spore density observed after ten days post-inoculation ( $17 \times 10^6$ ) agree with values reported ( $20 \times 10^6$ ) at similar times by Forsgren and Fries (2010a) and Williams *et al.* (2014), indicating that at this time the infection was fully developed.

The expression level of *N. ceranae* and *N. apis* genes confirmed that pollen substitute yielded high infection levels as indicated spore density values. But, for bees fed sucrose + *Nosema* a weak relationship was observed between spore density and REL data. The RT-qPCR technique accurately quantifies DNA irrespective of the species development meaning that the DNA from all life stages of *Nosema* (i.e., vegetative cells and spores) established in the bee guts will contribute to the gene expression estimated (Bourgeois *et al.*, 2010). Possibly, bees fed sucrose + *Nosema* harbored a high number of vegetative cells, these cells were undetected during microscopic analysis but were detected by the RT-qPCR. We observed that levels of *N. ceranae*

and *N. apis* genes were similar along the experimental time suggesting that competition interference between them was absent and this agree with other experimental assays (Forsgren and Fries, 2010a; Milbrath *et al.*, 2015). This response could be explained by several factors like similar pathogenicity or abundant host nutritional resources available for both parasites.

We showed that mixed infections of *N. ceranae* and *N. apis* had a weak influence on worker survival. It is known that *Nosema* infections reduces the lifespan (Goblirsch *et al.*, 2013), but this response occurs when the infection imposes high energetic stress (Mayack and Naug, 2009). Here, bees fed sucrose + *Nosema* harbored low spore densities and, presumably, the energetic stress was low or absent and could led to increased lifespan. The bees fed pollen substitute + *Nosema* (with high spore densities) showed similar survival times than bees fed pollen substitute suggesting that pollen substitute itself reduced bee lifetime. When bees fed pollen substitute, this diet stimulated the *vitellogenin* gene, a factor related to lifespan, indicating that other causes altered the bee health. There is evidence that protein diets, like our pollen substitute, can diminish worker survival (Pirk *et al.*, 2010). The excessive proteins are poorly digested and accumulate in the rectum of bees altering the normal excretion process (Altaye *et al.*, 2010).

It is reported that infected bees with *Nosema* show severe hunger because the parasites steal nutrients from the host causing energetic stress. There is evidence that hunger bees show a high consumption of sucrose syrup (Naug and Gibbs, 2009). In our study, the bees fed sucrose + *Nosema* ingested similar amounts of diet than bees fed sucrose only, as reported other authors (Tritschler *et al.*, 2017). Our findings can be associated with the low spore densities observed in bees fed sucrose + *Nosema*, possibly the low number of parasites imposed a lower demand for resources. Although bees fed pollen substitute + *Nosema* showed high spore densities, a greater consumption of diet was not detected. Previously, Höcherl *et al.* (2012) observed that the pollen substitute we used in our study was less palatable to bees and this finding could explain the lesser feed intake measured here.

We showed evidence that independent of the diet (sucrose or pollen substitute) mixed infections of *N. ceranae* and *N. apis* reduced the expression of *Vg*, *proPO*, and *GOx* genes at early stages of infection. We hypothesize that factors released by the spores ingested imprint quick and significant changes in the transcriptional pathways of these genes; conversely, uninfected bees display a relative increase of these genes. In *A. mellifera* workers, the early activation of the immune system is a systematic response after becoming infected with *Nosema* spores (Antúnez

*et al.*, 2009; Arismendi *et al.*, 2020; Schwarz and Evans, 2013). This response is attributed to certain effectors proteins released by *Nosema* spores immediately after oral ingestion (Lalik, 2015). These proteins that activate immune responses at early infections also can suppress them (Huang *et al.*, 2016) and possibly can impact other physiological responses like *Vg* and *GOx* genes.

Several studies corroborate that *Vg* gene is suppressed in worker bees infected with *Nosema* spores. (Antúnez *et al.*, 2009; Arismendi *et al.*, 2020; Goblirsch *et al.*, 2013). In fat bodies of infected bees, alterations related to gene expression of nutritional, metabolic, and hormonal pathways (e.g., insulin signaling related to *Vg* regulation) (Holt *et al.*, 2013), together with alterations in the lipids content and protein synthesis (Li *et al.*, 2018) suggest that *Nosema* deregulate functions in the fat body, the main site of *Vg* synthesis.

For *proPO*, some studies found that *N. ceranae* has negligible effects either on gene expression or enzymatic activity (Alaux *et al.*, 2011; Antúnez *et al.*, 2009), but others found reductions in both variables (Antúnez *et al.*, 2013; Roberts and Hughes, 2014). Even, up-regulation is reported in infections with *N. apis* (Antúnez *et al.*, 2009). In agreement with our results, Huang *et al.* (2016) observed lower *proPO* expression at one day post-infection with *N. ceranae*. Overall, cumulative evidence confirm that *Nosema* species can disconnect a broad band of immune responses to achieve the host infection, included the *proPO* gene (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). Possibly, the *Nosema* strains studied here are able to quickly reduce the *proPO* expression and further research is needed to confirm this hypothesis.

It is proposed that *GOx* is constitutively expressed in worker bees and cannot be induced in response to pathogen pressures (López-Uribe *et al.*, 2017). This was confirmed in worker bees during pathogen challenges with *Nosema* infections and even with *Paenibacillus larvae*, where *GOx* expression or its enzymatic activity remains unchanged (Alaux *et al.*, 2010b; López-Uribe *et al.*, 2017). Although, Taric *et al.* (2017) reported high expression in commercial colonies infected with *Nosema* and *Lotmaria passim*. Interestingly, a study found that a pesticide combined with *Nosema* reduced the *GOx* expression (Alaux *et al.*, 2010b). Here, the presence of pesticides in the caged bees was not tested, but we cannot exclude the possible influence of pesticides from nearby growing areas in our experimental apiary.

The early suppression of *Vg*, *proPO*, and *GOx* genes in our study differs from previous reports and indicate that the metabolism and physiology related to these genes were impaired in infected bees. A possible explanation can be the specific virulence of the *Nosema* strains studied here compared to other strains studied (Chaimanee *et al.*, 2013) and even the differential susceptibility of the honey bees we used. Also, the possible influence of pesticides in the gene expressions is not excluded. Finally, based on the *proPO* levels, we cannot conclude that *Nosema* infections blocked the complete immune system. Maybe the infected bees activated other immune responses not measured here (i.e., AMPs, glucose dehydrogenase, lysozyme).

### **3.5 CONCLUSIONS**

This work contributes to understanding the influence of diets on the dynamics of *Nosema* spore infections in Africanized *Apis mellifera*. Pollen substitute diet, rich in proteins, promoted the proliferation of *Nosema* spores, causing a high of the disease by reaching high spore densities in a few days confirming our first hypothesis. In addition, our results demonstrate that mixed *Nosema* infections cause a significant decrease in the *Vg*, *proPO*, and *GOx* genes, which are essential in maintaining health, immunity, and social immunity in bees and confirm our second hypothesis. In general, this set of *Nosema* affectations are detrimental at the individual level and can decrease the populations of bees in their colonies, prompting the colony collapse. We also observed that the collective inoculation method allows an optimal massive infection of bees. Finally, the rational use of pollen substitutes diets in the feeding of bees is necessary, especially in the context of *Nosema* infections.

### **Acknowledgments**

This work was supported by CONACYT project “Nutrition and health of *Apis mellifera* colonies through essential oils of native flora and symbiotic yeasts” (Grant No. 219922). We thank the Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan (CICY), México for supporting this research.



## CAPÍTULO IV

### INFLUENCIA DE LEVADURAS COMO SUSTITUTO ALIMENTICIO ANTE LA INFECCIÓN POR *Nosema* spp. EN ABEJAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

Los parásitos y patógenos se reconocen como una de las principales causas que explican la disminución de colonias silvestres y manejadas de abejas a nivel global (Goulson *et al.*, 2015). Por los daños que ocasionan, destacan los microsporidios intestinales *Nosema ceranae* y *N. apis* (Dainat *et al.*, 2012), ambos con amplia distribución mundial. Estos patógenos invaden el tracto intestinal de las abejas, destruyen el epitelio y alteran la absorción de nutrimentos (Higes, 2008), además, suprimen las respuestas inmunes (Antúnez *et al.*, 2009). En particular, el uso de agentes químicos como fumagilina para el control de *Nosema* spp. no ha solucionado el problema, incluso se reportan casos de resistencia (Huang *et al.*, 2013); en países europeos el uso de fumagilina ha sido restringido (Gisder y Genersch, 2015). Es evidente que se requieren alternativas para el control de estos patógenos sin efectos perjudiciales en la salud de las abejas y sin residualidad en la miel y el polen de las colonias.

Virtualmente, el uso de agentes químicos es incapaz de detener simultáneamente a los microsporidios de *Nosema* y los demás patógenos que se asocian a las abejas. Como solución, una de las estrategias adoptadas ha sido fortalecer la nutrición de las abejas para promover un estado nutricional adecuado, y al mismo tiempo, favorecer las respuestas inmunes (DeGrandi-Hoffman y Chen, 2015; Ponton *et al.*, 2013). Estas respuestas constituyen los mecanismos naturales que poseen las abejas para defenderse de los patógenos (Evans *et al.*, 2006). Lo anterior ha propiciado la formulación de sustitutos de polen o la adición de suplementos específicos en la dieta, los cuales generalmente se administran a las abejas cuando los recursos néctar-poliníferos son limitados (Glavinic *et al.*, 2017; van der Steen, 2007; Spencer-Booth, 1960). La premisa es que las abejas con un buen estado nutricional son capaces de resistir agentes de estrés como parásitos, patógenos y pesticidas.

Otra estrategia actual para limitar la presencia de patógenos consiste en el uso de microorganismos (MO), los cuales se administran en la dieta. Las abejas, además de albergar patógenos, también poseen un conjunto de MO naturalmente asociados llamado microbiota, constituido por bacterias, hongos y levaduras (Kwong *et al.*, 2017; Martinson *et al.*, 2012;

Martinson *et al.*, 2011). Avances en su estudio han revelado que mantienen asociaciones nutrimentales con las abejas que se basan en el aporte y la digestión de nutrimentos (Engel *et al.*, 2012). Más importante aún, se ha descubierto que algunos miembros de esta microbiota tienen efectos antagonistas sobre ciertos patógenos como *Crithidia*, *Nosema*, *Melisococcus plutonius* y *Paenibacillus larvae* (Pozo *et al.*, 2020; Engel *et al.*, 2016; Ponton *et al.*, 2013; Vásquez *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2011; Forsgren *et al.*, 2010b; Evans y López, 2004). Se ha documentado que la alteración de esta microbiota puede favorecer la proliferación de ciertos patógenos (Retschnig *et al.*, 2021; Maes *et al.*, 2016).

Las levaduras son parte de la microbiota de las abejas y constituyen un grupo que ha sido poco estudiado. Son hongos microscópicos que se asocian a las abejas melíferas, las abejas solitarias, las abejas sin aguijón y los abejorros del género *Bombus* (Brysch-Herzberg, 2004; Rosa *et al.*, 2003; Gilliam, 1997; Inglis *et al.*, 1993). Cada vez se descubre más sobre sus aportes nutrimentales, particularmente de proteínas y vitaminas (Pozo *et al.*, 2020). La dependencia observada en las larvas de *Scaptotrigona depilis* por el consumo de ergosterol producido por *Zygosaccharomyces* sp. corroboran su importancia nutrimental (Paludo *et al.*, 2018). Naturalmente, las levaduras se observan en la miel y el polen almacenados por las abejas, y con frecuencia colonizan el tracto intestinal (Gilliam, 1972). Este último sitio también es colonizado por los microsporidios de *Nosema* cuando infectan a las abejas (Higes *et al.*, 2008). Se puede inferir que ocurren interacciones competitivas entre las levaduras y los microsporidios cuando coinciden en el tracto intestinal. Es posible plantear que, las levaduras asociadas a las abejas tienen efectos antagonistas sobre los patógenos de *Nosema* y algunas evidencias apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, *Starmerella bombicola* es una levadura asociada al alimento de las abejas que sintetiza soforolípidos, una clase de glicolípidos con actividad antimicrobiana (Celligoi *et al.*, 2020). Asimismo, en ensayos *in vitro* se ha demostrado que ciertas levaduras aisladas de *Bombus terrestris* suprimen el crecimiento del patógeno intestinal *Crithidia bombi* (Pozo *et al.*, 2020). La administración de dietas suplementadas con levaduras asociadas a las abejas para limitar la presencia de patógenos es novedoso, sin embargo, requiere un conocimiento profundo de la interacción levaduras-abeja-patógenos y de los mecanismos que la regulan. No obstante, actualmente este conocimiento es limitado.

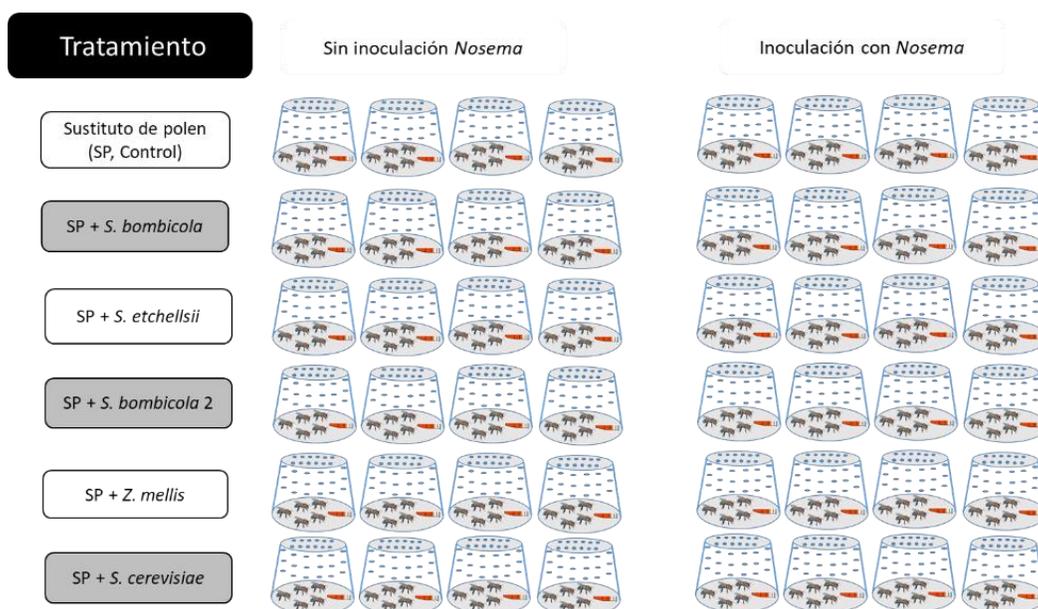
En este capítulo, el objetivo central fue determinar el efecto antagonista de un grupo de levaduras asociadas a abejas melíferas sobre los patógenos de *Nosema*. Para lograrlo, elaboramos dietas suplementadas con cinco levaduras, las cuales fueron consumidas varios días por abejas infectadas experimentalmente con esporas de *N. ceranae* y *N. apis*. Después

de siete días, evaluamos en las abejas los niveles de infección de *N. ceranae* y *N. apis*. Adicionalmente, medimos en las abejas variables del estado nutricional como la sobrevivencia, el consumo de alimento y la acumulación de cuerpos grasos, y la expresión de genes involucrados en la salud, la respuesta inmune y la inmunidad social (Vg, *proPO* y *GOx*). Los resultados obtenidos aportaron evidencia sobre el papel de las levaduras asociadas a las abejas como potenciales antagonistas de patógenos intestinales como *Nosema*.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Levaduras asociadas a *Scaptotrigona pectoralis*

Las levaduras estudiadas en este capítulo (IV) corresponden a las cepas estudiadas del capítulo II. Se aislaron e identificaron en nuestro laboratorio en el alimento larvario, el pan de abeja y la miel, en colonias de la abeja nativa *Scaptotrigona pectoralis* (Lizama, 2011). Las levaduras fueron: 1) CICY-RN-358, identificada como *Starmerella bombicola*, aislada en los potes de miel; 2) CICY-RN-386, identificada como *Starmerella etchellsii*, aislada en los potes con alimento larvario; 3) CICY-RN-413, identificada como *Starmerella bombicola* 2, aislada en los potes con pan de abeja; 4) CICY-RN-443, identificada como *Zygosaccharomyces mellis*, aislada en los potes de miel; y 5) CICY-RN-Sac2, identificada como *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 4.1** Diseño experimental de la evaluación del efecto de levaduras sobre la infección por *Nosema* en abejas africanizadas de *A. mellifera*.

#### 4.2.2 Abejas recién emergidas y grupos experimentales

Las abejas recién emergidas fueron obtenidas de colonias manejadas ( $n=10$ ) de abejas africanizadas de *A. mellifera* establecidas en el apiario experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Yucatán (20°51'51.62" N; 89°36'45.35" E). En el otoño de 2019, de cada colonia se retiró un cuadro con celdas de cría inmadura próximas a emerger. En el laboratorio, los cuadros se incubaron 24-48 horas a 36°C y 70% de humedad relativa hasta la emergencia de las abejas adultas. Después de emerger, las abejas fueron colectadas y asignadas aleatoriamente a cajas experimentales (contenedores plásticos, 11.0 x 7.5 x 9.0 cm) estableciendo 56 grupos de 30-35 abejas. Las abejas recién emergidas carecen de MO en el tracto intestinal, su adquisición ocurre al ingerir alimentos de la colonia y por el contacto con abejas nodrizas (Powell *et al.*, 2014).

Para evaluar el efecto de las levaduras sobre la infección causada por *N. ceranae* y *N. apis*, primero se establecieron dos bloques de cajas con abejas, un bloque de 28 cajas sin recibir infección experimental y otro bloque de 28 cajas con abejas infectadas experimentalmente con esporas de *N. ceranae* y *N. apis*. Posteriormente, las cajas de los bloques no infectado e infectado se asignaron a uno de seis tratamientos: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*. En este diseño, cada tratamiento tuvo cuatro réplicas experimentales (**Fig. 4.1**). El tipo de dieta y la condición de infección (no infectado o infectado) se consideraron como los principales factores, y las cajas experimentales como una variable aleatoria.

#### 4.2.3 Formulación de dietas

En este experimento se elaboraron cinco dietas suplementadas con levaduras y una dieta control (sustituto de polen, SP). El control consistió en un sustituto de polen (SP) elaborado de acuerdo a los métodos estándar para criar abejas adultas de *A. mellifera* en laboratorio (Williams *et al.*, 2013). El SP se elaboró siguiendo una relación peso/peso según la fórmula descrita por van der Steen (2007) para un gramo: harina de soya (14%), harina de levadura de cerveza (10%), harina de caseinato de calcio (15%), harina de proteína de suero (4%), solución de sacarosa (48%) y aceite de linaza (9%). Para elaborar las dietas con levaduras, la harina de levadura de cerveza se sustituyó en el SP con una de las cinco cepas de levadura previamente seleccionadas. Las levaduras se añadieron a las dietas correspondientes como una suspensión de células vivas elaborada el mismo día. La densidad celular en la dosis final de alimento fue

de aproximadamente  $32.5 \times 10^6$  células vivas/mL. La cantidad total suministrada de cada dieta a cada caja con abejas fue de:  $2.64 \pm 0.47$  g de dietas con levadura y  $2.59 \pm 0.45$  g de la dieta control. Asimismo, cada día se proporcionó agua estéril (2.0 g) para la hidratación de las abejas. Los alimentadores se reemplazaron cada segundo día para evitar la degradación microbiana.

#### 4.2.4 Suspensiones celulares de levaduras

La suspensión de células vivas de cada cepa de levadura se elaboró a partir de cultivos puros preservados, los cuales se re-cultivaron por separado en cajas de Petri con medio GELPA (glucosa  $20\text{g L}^{-1}$ , peptona  $10\text{g L}^{-1}$ , extracto de levadura  $5\text{g L}^{-1}$  y agar  $20\text{g L}^{-1}$ ) durante 7-10 días a  $30^\circ\text{C}$  hasta obtener el crecimiento de colonias. Para elaborar cada suspensión celular, se tomaron dos o tres colonias de cada cepa, las cuales se depositaron en un tubo de microcentrífuga (1.5 mL, Eppendorf), se añadió agua destilada estéril (1.0 mL) y se homogenizó hasta obtener una suspensión de células. La densidad celular en cada suspensión se determinó realizando conteos celulares en una alícuota (8.0  $\mu\text{L}$ ) utilizando un microscopio óptico (Olympus CX31) y una cámara Neubauer (Marienfeld, 0.1 mm profundidad, área de conteo  $0.05 \times 0.05$  mm) a 400X de aumento. Cada suspensión celular se ajustó agregando agua destilada estéril hasta obtener una densidad celular final de  $32.5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , densidad que se adicionó al tratamiento correspondiente. Cada suspensión se elaboró el mismo día de alimentación de las abejas, 2-3 horas antes.

#### 4.2.5 Identificación de *Nosema ceranae* y *N. apis* en colonias experimentales

Antes de elaborar el inóculo de esporas, se realizó la identificación de las especies de *Nosema* en las 16 colonias experimentales. En cada colonia, se capturaron 10 abejas forrajeras de néctar, estas muestras fueron rotuladas y resguardadas a  $-20^\circ\text{C}$  para su posterior extracción de ADN. En el laboratorio, los abdómenes de las abejas fueron retirados, macerados y homogenizados en 10 mL de agua destilada estéril (1.0 mL/abeja). La suspensión de esporas obtenida se filtró con filtros de miel de nailon (tamaño de poro de  $177 \mu\text{m}$ ; Better Bee Supplies, EEUU) y se centrifugó a  $4^\circ\text{C}$  por 10 min a 10, 000 rpm para obtener una pastilla de esporas, al final se descartó el sobrenadante. Las especies de *N. ceranae* y *N. apis* fueron confirmadas en todas las muestras de esporas mediante PCR convencional de acuerdo a Martín-Hernández *et al.* (2012). El ADN fue extraído de las pastillas de esporas usando el kit Zymo Research Quick-DNA Tissue/Insect Miniprep Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Un microlitro de cada

muestra de ADN se examinó en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, EEUU) y la calidad se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) durante 30 min a 80 V. Las muestras de ADN se homogenizaron en 50 µL de DNA Elution Buffer y se resguardaron a -20 °C. Los cebadores utilizados fueron: para *N. ceranae*, se generó un fragmento de 250 pb con los cebadores KF607066.1-F (5'-CGGATAAAAGAGTCCGTTACC-3') y KF607066.1-R (3'-TGAGCAGGGTTCTAGGGA-5') (Chen *et al.*, 2008). En este trabajo, se desarrolló un par de cebadores específicos para *N. apis* que generaron un fragmento de 208 pb: U97150.1-F (5'-TGAGGGAGGTCAGGCATGAT-3') y U97150.1-R (3'-AGGCCTTGCTTGTAGGAGAAAA-5'). Los cebadores se diseñaron con el software Primer Express ver. 3 (Applied Biosystems, EEUU). Las reacciones de PCR incluyeron 5 µL 10x PCR Buffer, 2 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.8 µL dNTPs (10 mM), 0.2 µL Taq polymerase, 1 µL DNA (300 ng), 1 µL de cada cebador (10 mM) y 39 µL de agua ultra pura sumando un volumen total de 50 µL. Los ciclos de amplificación fueron 95 °C por 3 min, seguido de 38 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C (*N. apis*) o 61 °C (*N. ceranae*), 1 min a 72 °C y una fase de extensión final de 72 °C por 5 min, manteniendo las reacciones a 4° C. Como control positivo se elaboró una solución con 100, 000 esporas en un mililitro de agua estéril, las esporas se obtuvieron de muestras de abdomen de abejas forrajeras infectadas con *Nosema*. Como control negativo se usó un macerado de abdómenes de abejas recién emergidas, las cuales no presentan infección por *Nosema*. Se analizaron los controles positivos y negativos para detectar una posible contaminación o fallas de amplificación.

#### **4.2.6 Inóculo de esporas de *Nosema ceranae* y *N. apis***

Después de confirmar infecciones mixtas por *N. ceranae* y *N. apis* en todas las colonias del apiario de la FMVZ, se elaboró un inóculo de esporas considerando la presencia de ambas especies de microsporidios. Las muestras de abejas se tomaron de tres colonias previamente diagnosticadas con un alto nivel de infección (6-8 x 10<sup>6</sup> esporas/abeja). En el laboratorio, la suspensión de esporas se preparó con los intestinos extraídos de 12 abejas forrajeras de néctar, que se maceraron y homogenizaron en 12 mL de agua destilada estéril (1.0 mL/abeja). En la suspensión obtenida, se estimó la densidad de esporas realizando conteos celulares en una alícuota de muestra (8.0 µL) utilizando un microscopio (Olympus CX31) y una cámara Neubauer (Marienfeld, 0.1 mm de profundidad, área de conteo 0.2x0.2 mm) a 400X de aumento. El inóculo se elaboró diluyendo la suspensión de esporas con una solución de sacarosa hasta obtener una concentración final de 1.0 x 10<sup>6</sup> esporas/mL sacarosa al 50% (p/p). El inóculo fue elaborado y refrigerado 24 horas antes de la inoculación colectiva de abejas.

#### 4.2.7 Inoculación colectiva de esporas

Para realizar la inoculación de las esporas de *N. ceranae* y *N. apis* en las abejas asignadas a las 28 cajas de infección, después de emerger, las abejas permanecieron sin alimentación durante tres horas para asegurar la posterior ingestión del inóculo. Posteriormente, en cada caja, las abejas fueron alimentadas por 48 horas con una solución de sacarosa 50% (2.0 mL) con una concentración de  $1.0 \times 10^6$  esporas/mL. Durante este período, las abejas permanecieron en oscuridad a 30°C y 70% de humedad relativa. El inóculo de esporas administrado permitió inocular a cada abeja con una dosis aproximada de 66, 666 esporas en 48 horas (estimaciones basadas en Pettis *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2013). Para administrar el inóculo se utilizaron taparrosas estériles como alimentadores. En forma simultánea, otro grupo de 28 cajas con abejas recién emergidas fueron alimentadas con sacarosa 50% siguiendo el mismo método, pero sin la adición de esporas de *N. ceranae* y *N. apis*.

Al terminar el período de inoculación, los grupos de abejas no infectado e infectado, se alimentaron durante siete días con las dietas suplementadas con levaduras y la dieta control, pero sin añadir nuevamente esporas. Se mantuvieron las mismas condiciones de oscuridad, 30°C temperatura y 70% humedad relativa. En las cajas experimentales se realizaron dos muestreos de abejas, el día cero (inicio) y el día siete (final), para estimar la expresión relativa de genes específicos de *N. ceranae* y *N. apis*, así como la acumulación de cuerpos grasos y la expresión relativa de los genes *vitelogenina*, *profenoloxidasa* y *glucosa oxidasa*. La sobrevivencia y el consumo de alimento se analizaron cada día y cada dos días, respectivamente.

#### 4.2.8 Variables de estudio

4.2.8.1 Expresión relativa de genes específicos de *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Vg*, *proPO* y *GOx*: extracción de ARN, síntesis de cADN y RT-qPCR

La expresión de los genes de *N. ceranae* y *N. apis* y de *Vg*, *proPO* y *GOx* se midió en las abejas por RT-qPCR. Para ello, en cada caja se tomaron seis o nueve abejas el día cero y día siete del experimento. La expresión de *N. ceranae* y *N. apis* y de *Vg* y *proPO* se midió en el abdomen, mientras que la expresión de *GOx* se midió en la cabeza. Las muestras de cabeza y abdomen se agruparon según la caja de origen, se maceraron y se homogenizaron en reactivo TRIzol (Invitrogen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La contaminación por ADN genómico se eliminó en las muestras usando ADNasa I (kit sin ADN, Ambion, EEUU) y la

concentración y pureza del ARN fueron medidas en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, EEUU) según la relación ABS 260/280 nm. La calidad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) durante 30 min a 80 V. Para la síntesis de ADN complementario (cADN) se empleó un protocolo de transcripción inversa utilizando 500 ng de ARN purificado de cada muestra y una concentración final de 50 U/ $\mu$ L de MultiScribe Reverse Transcriptase (Invitrogen/Life Technologies, EEUU). La síntesis de cADN se realizó a 42°C durante 50 min. El cADN sintetizado se utilizó para realizar la RT-qPCR usando cebadores específicos para *N. ceranae* y *N. apis*, y para *Vg*, *proPO* y *GOx*, así como el gen de referencia RPS5 de *A. mellifera*.

Para *N. ceranae*, se generó un fragmento de 250 pb con los cebadores KF607066.1-F (5'-CGGATAAAAGAGTCCGTTACC-3') y KF607066.1-R (3'-TGAGCAGGGTTCTAGGGA-5') (Chen *et al.*, 2008). Para *N. apis*, se generó un fragmento de 208 con los cebadores: U97150.1-F (5'-TGAGGGAGGTCAGGCATGAT-3') y U97150.1-R (3'-AGGCCTTGCTTGTAGGAGAAAA-5').. Para *Vg*, se generó un fragmento de 150 pb con los cebadores: NM\_001011578.1-F (5'-GTTGGAGAGCAACATGCAGA-3') y NM\_001011578.1-R (3'-TCGATCCATTCTTGATGGT-5') (Tsuruda *et al.*, 2008). En este trabajo, se desarrolló un par de cebadores específicos para *proPO* que generaron un fragmento de 130 pb: AY242387.2-F (5'-GAACGGCTATGTAATCGTCTTGGA-3') y AY242387.2-R (3'-TACCGCTGGGTGCGAAATGG-5'). Los cebadores se diseñaron usando el software Primer Express ver. 3 (Applied Biosystems, EEUU). Para *GOx*, se generó un fragmento de 201 pb con los cebadores: AB022907.1-F (5'-GAGCGAGGTTTCGAATTGGA-3') y AB022907.1-R (3'-GTCGTTCCCCGAGATTCTT-5') (Yang y Cox-Foster, 2005). Como gen de referencia (*house-keeping gene*) se utilizó un par de cebadores que generaron un fragmento de 115 pb de la proteína ribosomal S5 (*RPS5*): XM\_006570237.2-F (5'-AATTATTTGGTCGCTGGAATTG-3') y XM\_006570237.2-R (3'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA-5') (Evans, 2006). La RT-qPCR se realizó en un termociclador StepOne Real-Time PCR System usando el software StepOne ver. 2.3 (Applied Biosystems, EEUU). Las muestras de cada caja tuvieron tres réplicas internas, las cuales se analizaron por RT-qPCR en una placa de 48 pozos. La amplificación del cADN se realizó utilizando SYBR Green Master Mix como señal de detección (Applied Biosystems, EEUU), 2  $\mu$ L de cADN (500 ng) y 4  $\mu$ M de cada cebador específico en una concentración de 0.4  $\mu$ M en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L. Los ciclos de amplificación fueron: 95°C durante 3 min; y 40 ciclos de 95°C durante 30 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 1 min. La especificidad de los productos de RT-qPCR de todas las muestras se verificaron analizando las curvas de

disociación (*melt curves*). Los niveles de expresión relativa (REL) de *N. ceranae*, *N. apis*, *Vg*, *proPO* y *GOx* se calcularon usando el método comparativo Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Schmittgen y Livak, 2008). La cuantificación relativa de los genes se normalizó a los valores de expresión del gen de referencia RPS5.

#### 4.2.8.2 Supervivencia

Para estimar la supervivencia, las cajas experimentales con abejas fueron monitoreadas por siete días. En cada tratamiento, las estimaciones se generaron considerando el número diario de abejas vivas y muertas en cada caja durante siete días. Estos datos se usaron para construir las curvas de probabilidad de supervivencia y para calcular la mediana del tiempo de supervivencia, esto es, el tiempo más corto en donde la supervivencia de las abejas es menor o igual a 0.5. Las abejas muertas se retiraron diariamente para prevenir alguna contaminación.

#### 4.2.8.3 Consumo de alimento

En las cajas de todos los tratamientos, el consumo diario de alimento por abeja (% consumo/abeja/día) fue medido durante siete días (Williams *et al.*, 2013). Los alimentadores se llenaron con el tipo de dieta correspondiente, se pesaron (peso inicial) y se colocaron en la caja respectiva. El tiempo en el que se colocó cada alimentador en la caja (tiempo inicial) y el número de abejas vivas (*abejas\_inicio*) fueron registrados. Después de dos días, se retiraron los alimentadores y se registró el tiempo (*tiempo final*) y el número de abejas vivas en la caja (*abejas\_final*). Se registró el peso del alimentador (*peso final*) y se calculó la cantidad total de alimento consumido restando el peso final al peso inicial. Este proceso se repitió con un grupo control de alimentadores empleados para estimar la evaporación promedio en las dietas, se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales, pero sin abejas. El consumo de alimento fue calculado restando los valores de evaporación de las diferencias de peso observadas en las dietas evaluadas. El tiempo (horas) que los alimentadores estuvieron en las cajas se calculó restando el tiempo inicial al tiempo final. El consumo por hora por caja se calculó dividiendo el peso de alimento consumido por el tiempo de alimentación en la caja, y el consumo por hora por abeja se calculó dividiendo el consumo por hora de cada caja por el número de abejas final. El consumo diario por abeja se calculó multiplicando el consumo por abeja en una hora por 24.

### 4.2.8.4 Cuerpos grasos

En las abejas asignadas a cada dieta los cuerpos grasos se midieron según el método de Wilson-Rich *et al.* (2013). Al día cero y al día siete se tomó un grupo de tres abejas de cada caja. Las abejas fueron anestesiadas en frío, luego se sacrificaron separando la cabeza del abdomen y los abdómenes se secaron por tres días a 24°C en silica gel. Los abdómenes se pesaron individualmente (peso inicial) en una balanza analítica con una precisión de 0.001 g (Ohaus®), y se trataron con éter dietílico durante 24 h para disolver el tejido graso. Se secaron durante tres días y se registró el peso (peso final). La proporción de cuerpos grasos por abeja se calculó dividiendo el peso abdominal final por el peso abdominal inicial.

### 4.2.9 Análisis estadísticos

Los datos de cada variable fueron analizados para probar la normalidad (prueba de Kolmogórov-Smirnov), la homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) y se transformaron si fue necesario antes de efectuar los análisis. Los datos que no cumplieron con la normalidad se analizaron con pruebas no paramétricas. Para comparar el efecto de las dietas en la expresión de genes específicos de *N. ceranae* y *N. apis*, así como en el consumo de alimento (raíz cuadrada) y la acumulación de cuerpos grasos se efectuaron análisis con modelos lineales de efectos mixtos (LMM). En cada variable se contrastaron varios modelos para elegir el modelo con una estructura de factores fijos y aleatorios que mejor se ajustó a los datos; se siguió con detalle el protocolo de Zuur *et al.* (2009). La selección se basó en dos criterios; primero, que el modelo incluya los factores de interés evaluados, y segundo, se tomó en cuenta las comparaciones de los criterios informativos de Akaike y Bayesiano (AIC y BIC). En cada variable se evaluó la significancia de los modelos LMM. Los modelos se ajustaron con máxima verosimilitud (ML) y se utilizó la suma de cuadrados Tipo III para diseños no balanceados para obtener los valores de F y *p*; se aplicó el método de *Satterthwaite* para aproximar los grados de libertad efectivos. Posteriormente, se realizaron comparaciones múltiples (*post hoc*) entre las dietas usando el ajuste de Bonferroni utilizando la función “*emmeans*” del paquete *emmeans* (Lenth *et al.*, 2021). Los modelos LMM se analizaron en el paquete *lmerTest* (Kuznetsova *et al.*, 2019). Para evaluar el efecto de las dietas en la sobrevivencia de las abejas no infectadas e infectadas, en cada dieta, las curvas de sobrevivencia y la mediana del tiempo de sobrevivencia de cada grupo se compararon con el análisis no paramétrico de Kaplan-Meier y la prueba Log-Rank. Las curvas de sobrevivencia se construyeron con los paquetes *survival* (Therneau, 2019) y *survminer* (Kassambara y Kosinski, 2019). Finalmente, los datos de

expresión de los genes *Vg*, *proPO* y *GOx* de las abejas no infectadas e infectadas no cumplieron los supuestos de normalidad. Para comparar el efecto de las dietas en la expresión de estos genes se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para comparaciones múltiples (*post-hoc*) con el paquete *dunn.test* (Dinno, 2017). Todos los análisis fueron realizados en RStudio (RStudio Team, 2006).

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Expresión relativa de genes específicos de *Nosema ceranae* y *N. apis*

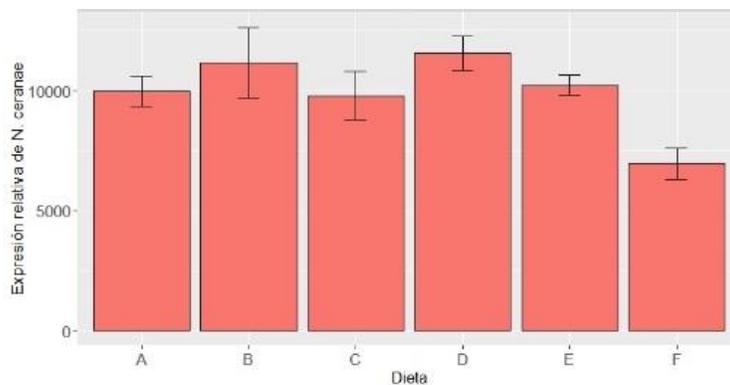
#### 4.3.1.1 *Nosema ceranae*

##### Selección del modelo

El análisis del efecto de las dietas en la expresión relativa de los patógenos *N. ceranae* y *N. apis* solo se efectuó en las abejas infectadas con *Nosema*. Por lo tanto, para cada patógeno, el único modelo LMM utilizado en el análisis fue el siguiente: REL ~ Dieta + (1 | Caja).

##### Comparación entre dietas

Para la expresión relativa de *N. ceranae*, el modelo LMM indicó que la dieta tuvo un efecto significativo ( $F_{5,10} = 10.22$ ,  $p = 0.001105$ ), sugiriendo que el tipo de dieta consumida por las abejas afectó la expresión del patógeno (**Fig. 4.2**). Comparaciones *post-hoc* indicaron que las abejas alimentadas con la dieta enriquecida con *S. cerevisiae* ( $6\,947 \pm 641.27$  REL) tuvieron la menor expresión del patógeno en comparación con el control ( $9\,978.06 \pm 620.84$  REL,  $t = 4.22$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0263$ ), y en comparación con las dietas restantes: *S. bombicola* ( $11\,159.52 \pm 1\,474$  REL,  $t = 5.87$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0023$ ), *S. etchellsii* ( $9\,791.43 \pm 1\,010.02$  REL,  $t = 3.96$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0399$ ), *S. bombicola* 2 ( $11\,551.16 \pm 709.94$  REL,  $t = 6.42$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0011$ ) y *Z. mellis* ( $10\,211.89 \pm 415.89$  REL,  $t = 4.55$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0158$ ). Entre las cajas experimentales la variación estimada fue relativamente baja (0.86%). En las abejas no infectadas, también se detectó la expresión de *N. ceranae*, aunque en niveles ínfimos (datos no mostrados).

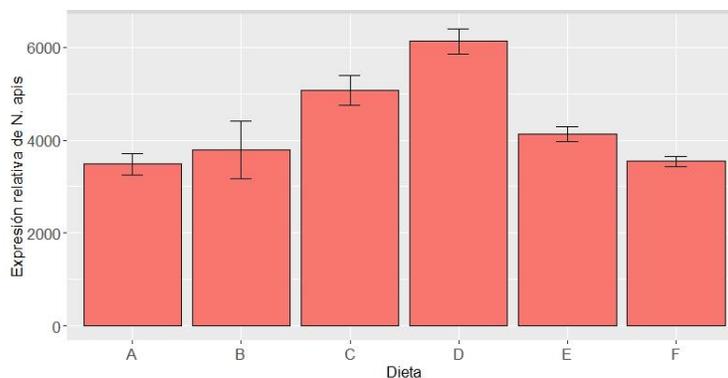


**Figura 4.2** Expresión relativa de *Nosema ceranae* (promedio ± DE) en abejas *A. mellifera* infectadas con *Nosema* y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.

#### 4.3.1.2 *Nosema apis*

##### Comparación entre dietas

Para la expresión relativa de *N. apis*, el modelo LMM también indicó que el tipo de dieta consumida fue significativa en la expresión ( $F_{5,12} = 29.71$ ,  $p = 0.000$ ) (**Fig. 4.3**). Se observó que las abejas alimentadas con *S. etchellsii* ( $5\ 082.31 \pm 324.7$  REL,  $t = -5.88$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0023$ ) y *S. bombicola* 2 ( $6\ 135.31 \pm 270.4$  REL,  $t = -9.76$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0001$ ) tuvieron una mayor expresión del patógeno en comparación con la dieta control ( $3\ 484.80 \pm 231.4$  REL). Además, la expresión de *N. apis* en las abejas que consumieron *S. bombicola* 2, también resultó mayor que las dietas restantes, *S. bombicola* ( $3\ 787.65 \pm 629.96$  REL,  $t = -8.64$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0001$ ), *Z. mellis* ( $4\ 128.19 \pm 160.93$ ,  $t = 7.38$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0004$ ) y *S. cerevisiae* ( $3\ 548.94 \pm 111.3$ ,  $t = 9.52$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0001$ ). La estimación de los componentes aleatorios indicó que la varianza entre cajas experimentales fue nula. En las abejas no infectadas, niveles mínimos de expresión de *N. apis* fueron detectados (datos no mostrados).



**Figura 4.3** Expresión relativa de *Nosema apis* (promedio  $\pm$  DE) en abejas *A. mellifera* infectadas con *Nosema* y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.

### 4.3.2 Sobrevivencia

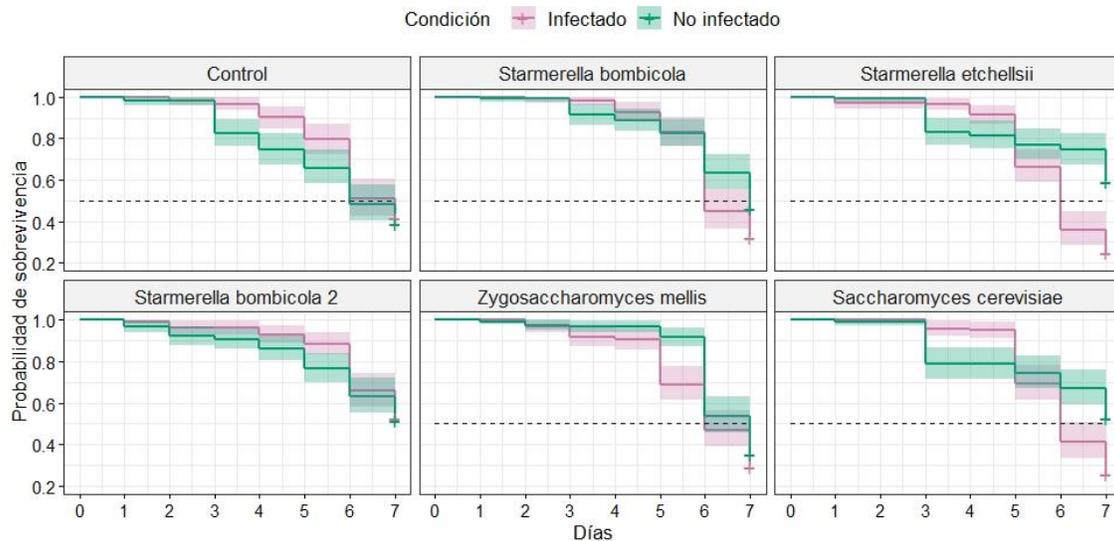
#### Comparación entre dietas

La comparación entre las dietas del efecto en la sobrevivencia en las abejas no infectadas e infectadas indicó diferencias. En comparación con el control, definido como el grupo de abejas no infectadas que recibió el SP, la sobrevivencia resultó mayor en las abejas no infectadas que consumieron las dietas con *S. etchellsii* (Log-Rank,  $p = 0.0067$ ), *S. bombicola* 2 (Log-Rank,  $p = 0.022$ ) y *S. cerevisiae* (Log-Rank,  $p = 0.025$ ), y también fue mayor en las abejas infectadas que recibieron la dieta con *S. bombicola* 2 (Log-Rank,  $p = 0.002$ ). Esta última dieta (*S. bombicola* 2) promovió los mayores valores de sobrevivencia entre todos los grupos de abejas infectadas (**Fig. 4.4**). En general, las abejas infectadas experimentaron una reducción más rápida de la sobrevivencia, evidenciando el impacto negativo del patógeno, a diferencia de las abejas libres de infección que mostraron una reducción más lenta.

#### Comparación entre abejas no infectadas e infectadas por dieta

En la **Fig. 4.4** se ilustran las curvas de sobrevivencia de las abejas no infectadas e infectadas, las cuales recibieron dietas suplementadas con levaduras. La sobrevivencia entre las abejas no infectadas e infectadas fue diferente cuando consumieron las dietas suplementadas con *S. bombicola* (Log-Rank,  $p = 0.041$ ), *S. etchellsii* (Log-Rank,  $p < 0.0001$ ), *Z. mellis* (Log-Rank,  $p = 0.034$ ), y *S. cerevisiae* (Log-Rank,  $p = 0.000$ ). En cada caso, la sobrevivencia siempre fue menor en las abejas con infección. Únicamente, la dieta control (Log-Rank,  $p = 0.23$ ) y la dieta

con *S. bombicola* 2 (Log-Rank,  $p = 0.51$ ) promovieron una supervivencia similar entre las abejas no infectadas e infectadas.



**Figura 4.4** Curvas de supervivencia de abejas *A. mellifera* no infectadas (color verde) e infectadas con *Nosema* (color rojo) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: Sustituto de polen (control), SP + *S. bombicola*, SP + *S. etchellsii*, SP + *S. bombicola* 2, SP + *Z. mellis* y SP + *S. cerevisiae*.

### 4.3.3 Consumo de alimento

#### Selección del modelo

Quince diferentes modelos (LMM) se evaluaron (**Tabla 4.1**), del más completo al más simple, para seleccionar el modelo con una estructura de factores fijos y aleatorios que mejor se ajustó a los datos de consumo. El modelo con los factores fijos “Dieta” y “Condición”, y con los factores aleatorios “Día” y “Caja” experimental fue seleccionado para analizar el consumo en las abejas no infectadas e infectadas con *Nosema*.

**Tabla 4.1** Valores del criterio informativo de Akaike y criterio informativo Bayesiano (AIC y BIC) de quince modelos lineales mixtos (LMM) para analizar el porcentaje de consumo en abejas *A. mellifera* no infectadas e infectadas con *Nosema* y alimentadas con levaduras suplementadas en la dieta.

Modelo	Fórmula	AIC	BIC
1	Consumo ~ Dieta + Condición + (1   Día) + (1   Caja)	-289.6	-257.3
2	Consumo ~ Dieta + Condición + (1   Día) * (1   Caja)	-289.6	-257.3
3	Consumo ~ Dieta + Condición + (1   Día)	-290.1	-261.0
4	Consumo ~ Dieta + Condición + (1   Caja)	-166.4	-137.3
5	Consumo ~ Dieta x Condición + (1   Día) + (1   Caja)	-290.0	-241.4
6	Consumo ~ Dieta x Condición + (1   Día) * (1   Caja)	-290.0	-241.4
7	Consumo ~ Dieta x Condición + (1   Día)	-292.0	-246.7
8	Consumo ~ Dieta x Condición + (1   Caja)	-164.0	-118.7
9	Consumo ~ Dieta + (1   Día) + (1   Caja)	-285.3	-256.1
10	Consumo ~ Condición + (1   Día) + (1   Caja)	-296.6	-280.5
11	Consumo ~ Condición + (1   Día) * (1   Caja)	-296.6	-280.5
12	Consumo ~ Dieta + (1   Día)	-282.6	-256.7
13	Consumo ~ Dieta + (1   Caja)	-162.5	-136.6
14	Consumo ~ Condición + (1   Día)	-295.4	-282.5
15	Consumo ~ Condición + (1   caja)	-174.7	-161.8

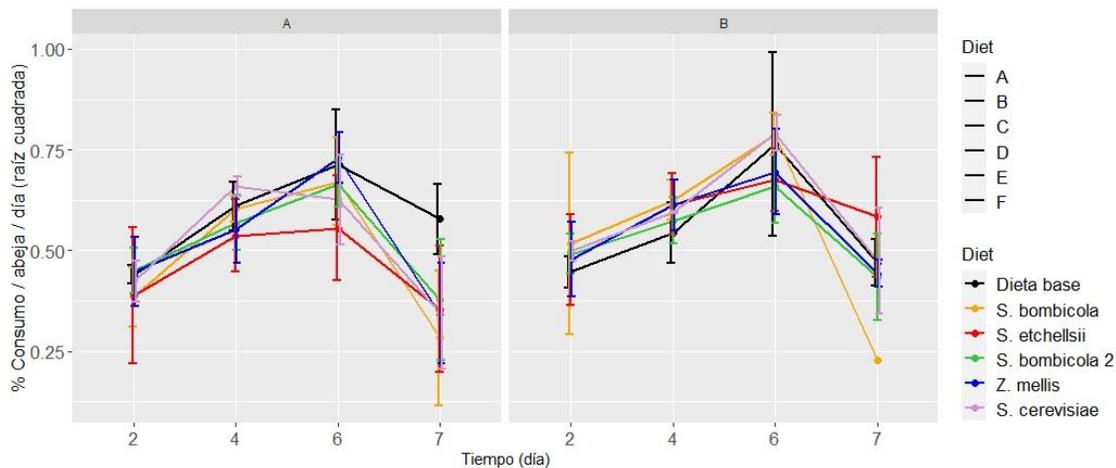
#### Comparación entre dietas

En la **Fig. 4.5** se muestra el consumo de las dietas en las abejas no infectadas e infectadas. El modelo (LMM) empleado para comparar el consumo entre todas las dietas indicó que el factor dieta no fue significativo ( $F_{5,15} = 0.45$ ,  $p = 0.80432$ ), sugiriendo que las abejas consumieron las dietas en porcentajes similares. Por otra parte, la condición si tuvo un efecto significativo ( $F_{1,15} = 5.29$ ,  $p = 0.03592$ ), indicando que las diferencias en el consumo fueron explicadas por la presencia o no de la infección. La estimación de los factores aleatorios identificó que la variación explicada entre los días fue mayor (58.9%) y fue menor entre las cajas experimentales (5.3%). Sobre la variación temporal, se observó que las abejas no infectadas aumentaron su consumo 2.4 veces ( $0.45\% \pm 0.14\%$ ) y las infectadas 2.2 veces ( $0.53 \pm 0.16\%$ ) en el sexto día.

#### Comparación entre abejas no infectadas e infectadas por dieta

Para determinar la influencia de la infección en el consumo de una dieta particular, se efectuaron comparaciones entre las abejas no infectadas e infectadas en cada dieta. El modelo (LMM) fue significativo solo en la dieta con *S. etchellsii* ( $F_{1,26} = 8.20$ ,  $p = 0.008101$ ), indicando

que la condición (no infectado o infectado) tuvo un efecto. El mayor consumo se observó en las abejas infectadas (No infectadas =  $0.23 \pm 0.13\%$ ; Infectadas =  $0.35 \pm 0.13\%$ ;  $t = 2.86$ ,  $df = 26.32$ ,  $p = 0.0081$ ). En las dietas restantes, los modelos no fueron significativos ( $p < 0.05$ ), indicando que el consumo fue similar entre ambos grupos de abejas: control (No infectadas =  $0.36 \pm 0.16\%$ , Infectadas =  $0.31 \pm 0.20\%$ ), *S. bombicola* (No infectadas =  $0.27 \pm 0.17\%$ , Infectadas =  $0.41 \pm 0.22\%$ ), *S. bombicola* 2 (No infectadas =  $0.28 \pm 0.14\%$ , Infectadas =  $0.30 \pm 0.12\%$ ), *Z. mellis* (No infectadas =  $0.30 \pm 0.18\%$ , Infectadas =  $0.34 \pm 0.15\%$ ) y *S. cerevisiae* (No infectadas =  $0.29 \pm 0.16\%$ , Infectadas =  $0.34 \pm 0.15\%$ ). En cada dieta, se detectó un alto porcentaje de varianza explicado por los días y una menor varianza entre las cajas: control (Día = 52.2%, Caja = 6.1%), *S. bombicola* (Día = 63.5%, Caja = 6.2%), *S. etchellsii* (Día = 24.6%, Caja = 0%), *S. bombicola* 2 (Día = 58.6%, Caja = 0%), *Z. mellis* (Día = 68.2%, Caja = 7.5%) y *S. cerevisiae* (Día = 60.6%, Caja = 0%).



**Figura 4.5** Consumo de alimento (% promedio  $\pm$  DE) en abejas *A. mellifera* no infectadas (panel A) e infectadas con *Nosema* (panel B) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola* 2, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.

#### 4.3.4 Cuerpos grasos

##### Selección del modelo

La selección del LMM para analizar la acumulación de cuerpos grasos en las abejas no infectadas e infectadas se basó en dos criterios. Primero, que el modelo incluya los factores de interés evaluados, y segundo, se tomó en cuenta las comparaciones de los criterios informativos de Akaike y Bayesiano (AIC y BIC). Después de realizar la comparación entre

cuatro modelos, el modelo con el factor Dieta y Condición sin interacción, y el factor aleatorio caja fue seleccionado para el análisis (**Tabla 4.2**).

**Tabla 4.2.** Valores del criterio informativo de Akaike y criterio informativo Bayesiano (AIC y BIC) de cuatro modelos lineales mixtos (LMM) para analizar los cuerpos grasos en abejas *A. mellifera* no infectadas e infectadas con *Nosema* y alimentadas con levaduras suplementadas en la dieta.

Modelo	Fórmula	AIC	BIC
1	Consumo ~ Dieta + Condición + (1   Caja)	992.2	1017.7
2	Consumo ~ Dieta × Condición + (1   Caja)	993.6	1033.2
3	Consumo ~ Dieta + (1   Caja)	990.6	1013.3
4	Consumo ~ Condición + (1   caja)	996.7	1008.1

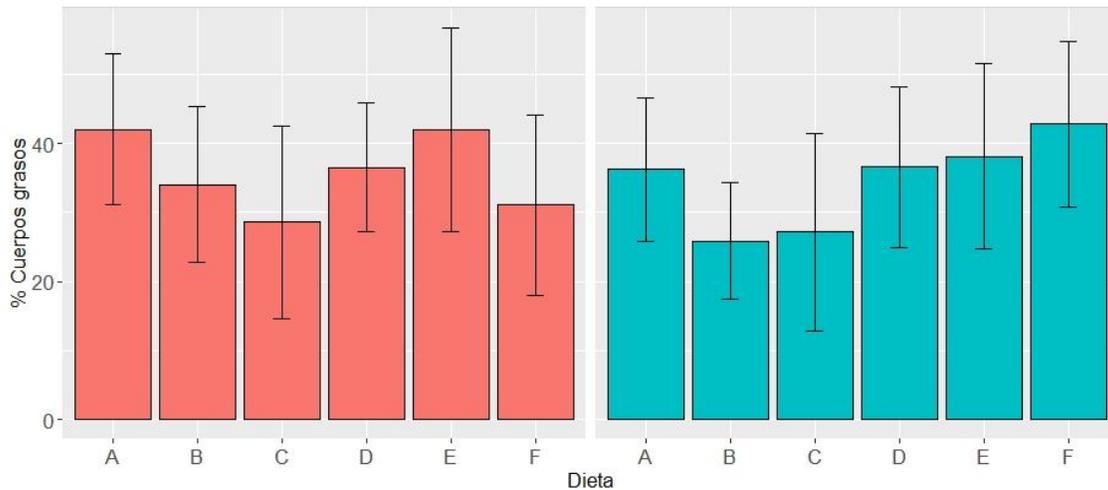
#### Comparación entre dietas

En el modelo LMM, el efecto de las dietas en la acumulación de cuerpos grasos en las abejas no infectadas e infectadas fue significativo ( $F_{5,125} = 3.65$ ,  $p = 0.004063$ ), sugiriendo que existieron diferencias según la dieta consumida. Comparaciones *post-hoc* detectaron diferencias marginales entre las abejas que recibieron la dieta control ( $38.82 \pm 10.7\%$ ) y la dieta con *S. etchellsii* ( $27.76 \pm 14.0\%$ ,  $t = -2.62$ ,  $df = 27.4$ ,  $p = 0.0572$ ), estas últimas acumularon menos cuerpos grasos (**Fig. 4.6**). El modelo también indicó que la condición, no infectado o infectado, no tuvo un efecto en los cuerpos grasos al comparar todas las dietas ( $F_{1,125} = 0.40$ ,  $p = 0.526237$ ). La estimación de los componentes aleatorios identificó que la variación entre las cajas experimentales fue nula.

#### Comparación entre abejas no infectadas e infectadas por dieta

El modelo LMM empleado para comparar los cuerpos grasos entre abejas no infectadas e infectadas en cada dieta, identificó diferencias solo en la dieta con *S. cerevisiae* ( $F_{1,19} = 4.63$ ,  $p = 0.04448$ ). Es de destacar, que las abejas infectadas y alimentadas con esta dieta acumularon un mayor porcentaje de cuerpos grasos (No infectadas =  $30.03 \pm 13.02\%$ , Infectadas =  $42.77 \pm 12.0\%$ ,  $t = 2.15$ ,  $df = 19$ ,  $p = 0.0445$ ) (**Fig. 4.6**). En las otras dietas no existieron diferencias entre los grupos ( $p > 0.05$ ): control (No infectadas =  $42.04 \pm 10.88\%$ , Infectadas =  $36.19 \pm 10.42\%$ ), *S. bombicola* (No infectadas =  $33.99 \pm 11.32\%$ , Infectadas =  $25.81 \pm 8.45\%$ ), *S. etchellsii* (No infectadas =  $28.54 \pm 13.87\%$ , Infectadas =  $27.12 \pm 14.26\%$ ), *S. bombicola* 2 (No infectadas =  $36.53 \pm 9.34\%$ , Infectadas =  $36.54 \pm 11.64\%$ ), *Z. mellis* (No infectadas =  $41.98 \pm$

14.78%, Infectadas =  $38.09 \pm 13.39$ ) y *S. cerevisiae* (No infectadas =  $31.03 \pm 13.02\%$ , Infectadas =  $42.77 \pm 12\%$ ). La variación entre las cajas experimentales fue baja en el control (Caja = 12.09%) y fue inexistente en las dietas con *S. bombicola*, *S. etchellsii*, *S. bombicola 2*, *Z. mellis* y *S. cerevisiae*.



**Figura 4.6** Cuerpos grasos acumulados (% , promedio  $\pm$  DE) en abejas *A. mellifera* no infectadas (color rojo) e infectadas con *Nosema* (color azul) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola 2*, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.

### 4.3.5 Expresión relativa de los genes *Vg*, *proPO* y *GOx*

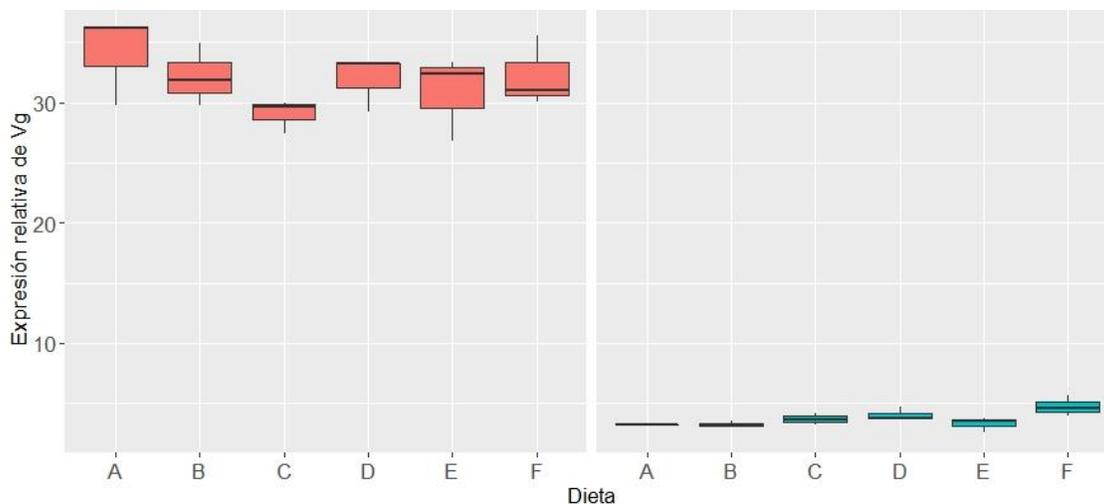
#### 4.3.5.1 *vitelogenina*

##### Comparación entre dietas

Las abejas infectadas con *Nosema* mostraron una baja expresión de *vitelogenina* (*Vg*), mientras que, las abejas no infectadas tuvieron niveles altos y similares (**Fig. 4.7**). La prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias entre las dietas asignadas a abejas no infectadas e infectadas ( $X^2 = 30.17$ ,  $df = 11$ ,  $p = 0.001487$ ). Todas las dietas con levaduras consumidas por las abejas infectadas, *S. bombicola* ( $Z = 3.17$ ,  $p = 0.0007$ ), *S. etchellsii* ( $Z = 2.51$ ,  $p = 0.0059$ ), *S. bombicola 2* ( $Z = 2.17$ ,  $p = 0.0150$ ), *Z. mellis* ( $Z = 2.79$ ,  $p = 0.0026$ ) y *S. cerevisiae* ( $Z = 1.82$ ,  $p = 0.0343$ ), promovieron una menor expresión de *Vg* que la dieta control (SP). Además, la expresión de *Vg* en todos los grupos de abejas infectadas, también fue menor en comparación con cada uno grupo de abejas no infectadas que consumieron las dietas con levaduras (valores  $Z$  con  $p < 0.05$ ).

## Comparación entre abejas no infectadas e infectadas por dieta

La comparación de la expresión de *Vg* entre las abejas no infectadas e infectadas en cada dieta, indicó que, en cada caso, la expresión siempre menor en las abejas que presentaban la infección, Control ( $Z = 2.98$ ,  $p = 0.0014$ ), *S. bombicola* ( $Z = 2.75$ ,  $p = 0.0030$ ), *S. etchellsii* ( $Z = 1.43$ ,  $p = 0.0758$ ), *S. bombicola 2* ( $Z = -1.66$ ,  $p = 0.0478$ ), *Z. mellis* ( $Z = -2.20$ ,  $p = 0.0136$ ) y *S. cerevisiae* ( $Z = -1.51$ ,  $p = 0.0654$ ) (**Fig. 4.7**).



**Figura 4.7** Expresión relativa de *vitelogenina* (*Vg*) en abejas *A. mellifera* no infectadas (color rojo) e infectadas con *Nosema* (color azul) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola 2*, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.

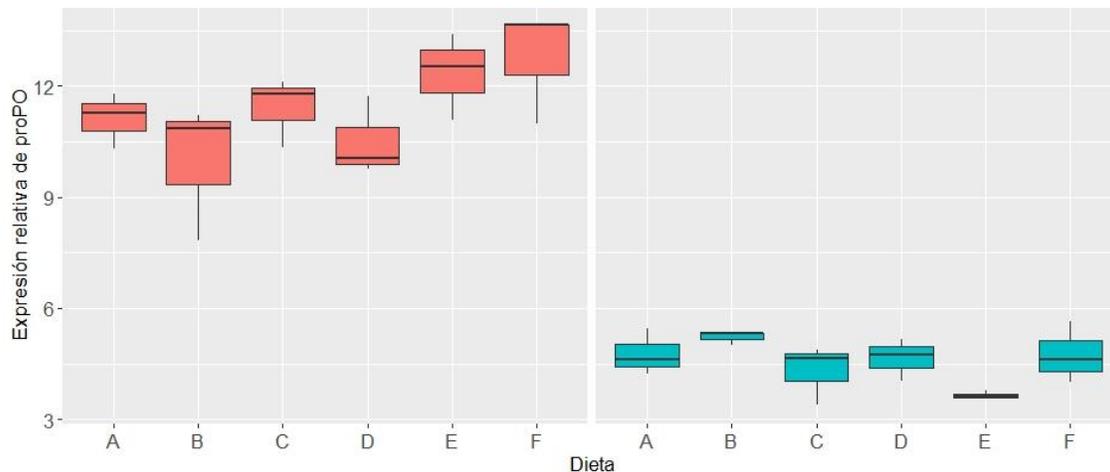
## 4.3.5.2 profenoloxidasa

## Comparación entre dietas

La expresión de *profenoloxidasa* (*proPO*) fue relativamente baja en las abejas infectadas con *Nosema*. En las abejas no infectadas, la expresión alcanzó los niveles más altos (**Fig. 4.8**). La prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias entre las dietas ( $\chi^2 = 30.189$ ,  $df = 11$ ,  $p = 0.00148$ ). Las dietas con levaduras en las abejas infectadas, *S. bombicola* ( $Z = 1.39$ ,  $p = 0.0815$ ), *S. etchellsii* ( $Z = 2.20$ ,  $p = 0.0136$ ), *S. bombicola 2* ( $Z = 1.89$ ,  $p = 0.0288$ ), *Z. mellis* ( $Z = 2.75$ ,  $p = 0.0030$ ) y *S. cerevisiae* ( $Z = 1.85$ ,  $p = 0.0314$ ), promovieron una menor expresión de *proPO* que la dieta control (SP). Además, la expresión que promovieron las dietas en las abejas infectadas, también fue menor que la registrada en las abejas no infectadas que se alimentaron con las dietas restantes (todos los valores de  $Z$  con  $p < 0.05$ ).

Comparación entre abejas no infectadas e infectadas por dieta

Al comparar la expresión de *proPO* entre las abejas no infectadas e infectadas por cada dieta, se observó que, en cada caso, la expresión siempre fue menor en las abejas con infección, control ( $Z = 1.85$ ,  $p = 0.0314$ ), *S. bombicola* ( $Z = 1.00$ ,  $p = 0.1569$ ), *S. etchellsii* ( $Z = 2.44$ ,  $p = 0.0073$ ), *S. bombicola 2* ( $Z = -1.51$ ,  $p = 0.0654$ ), *Z. mellis* ( $Z = -3.25$ ,  $p = 0.0006$ ) y *S. cerevisiae* ( $Z = -2.47$ ,  $p = 0.0066$ ) (**Fig. 4.8**).



**Figura 4.8** Expresión relativa de *profenoloxidasa* (*proPO*) en abejas *A. mellifera* no infectadas (color rojo) e infectadas con *Nosema* (color azul) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola 2*, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.

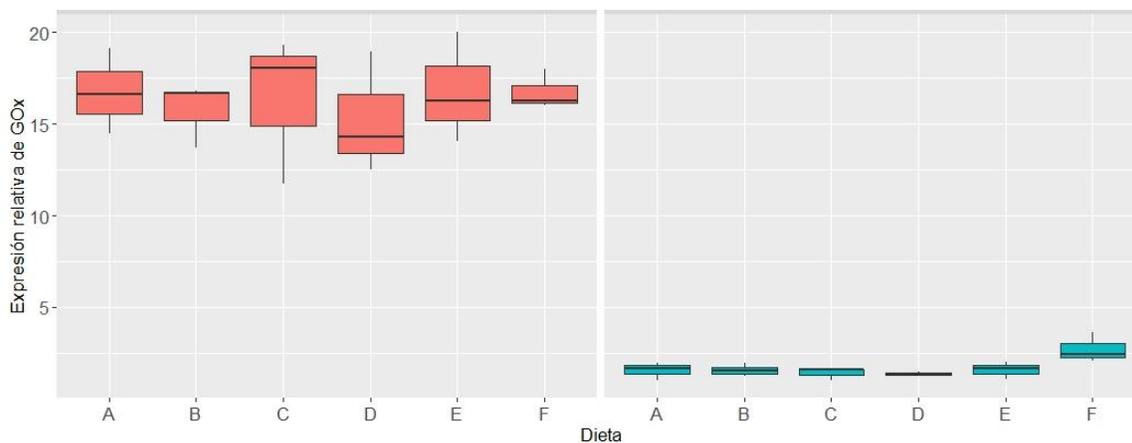
4.3.5.3 *glucosa oxidasa*

Comparación entre dietas

La expresión de *glucosa oxidasa* (*GOx*) fue considerablemente baja en las abejas infectadas. En las abejas libres de infección, se presentaron los mayores niveles expresión (**Fig. 4.9**). La prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias entre las dietas ( $X^2 = 28.53$ ,  $df = 11$ ,  $p = 0.002682$ ). Las abejas infectadas que consumieron dietas con levaduras, *S. bombicola* ( $Z = 2.36$ ,  $p = 0.0090$ ), *S. etchellsii* ( $Z = 2.47$ ,  $p = 0.0066$ ), *S. bombicola 2* ( $Z = 2.63$ ,  $p = 0.0042$ ), *Z. mellis* ( $Z = 2.24$ ,  $p = 0.0123$ ) y *S. cerevisiae* ( $Z = 1.35$ ,  $p = 0.0875$ ), tuvieron una menor expresión de *GOx* que con la dieta control (SP). Además, la expresión que promovieron las dietas en las abejas infectadas, también fue menor que la registrada en las abejas no infectadas que recibieron las dietas restantes (todos los valores  $Z$  con  $p < 0.05$ ).

### Comparación entre abejas no infectadas e infectadas por dieta

La comparación de la expresión de GOx entre las abejas no infectadas e infectadas en cada dieta, indicó que, en cada caso, la expresión siempre fue menor en las abejas con infección, control ( $Z = 2.28$ ,  $p = 0.0111$ ), *S. bombicola* ( $Z = 2.13$ ,  $p = 0.0165$ ), *S. etchellsii* ( $Z = 2.47$ ,  $p = 0.0066$ ), *S. bombicola 2* ( $Z = -2.24$ ,  $p = 0.0123$ ), *Z. mellis* ( $Z = -2.59$ ,  $p = 0.0047$ ) y *S. cerevisiae* ( $Z = -1.20$ ,  $p = 0.1148$ ) (**Fig. 4.9**).



**Figura 4.9** Expresión relativa de *glucosa oxidasa* (GOx) en abejas *A. mellifera* no infectadas (color rojo) e infectadas con *Nosema* (color azul) y alimentadas con dietas suplementadas con levaduras en cajas experimentales. Las dietas evaluadas fueron: A) Sustituto de polen (SP, control), B) SP + *S. bombicola*, C) SP + *S. etchellsii*, D) SP + *S. bombicola 2*, E) SP + *Z. mellis* y F) SP + *S. cerevisiae*.

## 4.4 DISCUSIÓN

En este último capítulo, se discute la influencia del consumo de levaduras asociadas a las abejas sobre los microsporidios de *N. ceranae* y *N. apis* y sus niveles de infección en las abejas. La discusión también aborda el efecto de estas levaduras sobre la salud y las respuestas de inmunidad e inmunidad social en abejas infectadas con estos microsporidios. Esta información es valiosa para entender el papel antagonista que pueden ejercer las levaduras asociadas, principalmente frente a patógenos intestinales como *Nosema* spp.

Un tema central en este estudio, fue determinar si el consumo regular de levaduras asociadas a las abejas afectaba a las especies de *Nosema* en abejas infectadas experimentalmente. Los efectos de las levaduras sobre los patógenos fueron especie-específicos. Sobresale, que el consumo de la dieta con *S. cerevisiae* causó los niveles más bajos de expresión de *N. ceranae*. Podemos sugerir en esta levadura un virtual efecto antagonista. Otra novedad, fue que la dieta

con *S. bombicola* 2 aumentó la expresión de *N. apis* en las abejas. De alguna forma, esta levadura, favoreció la multiplicación de este patógeno.

En general, los MO que colonizan el microambiente del tracto intestinal de las abejas, según sus requerimientos, establecen interacciones de competencia por el espacio y los recursos (Arismendi *et al.*, 2020; Natsopoulou *et al.*, 2015; Andrearczyk *et al.*, 2014; McFrederick *et al.*, 2014). En *S. cerevisiae*, se han descrito habilidades competitivas que pueden explicar su efecto antagonista sobre *N. ceranae*. Entre ellos, su rápida multiplicación, la habilidad para adquirir recursos, la capacidad de modificar el pH del medio y la producción de compuestos antimicrobianos (El Khoury *et al.*, 2016; Hatoum *et al.*, 2012). La contribución que tuvo *S. cerevisiae* para una mayor síntesis de cuerpos grasos también pudo favorecer la disminución de *N. ceranae*. Además, es posible que esta levadura haya facilitado la presencia de otros MO, los cuales fueron perjudiciales para *N. ceranae*, aunque esta hipótesis necesita ser confirmada. Este fenómeno se ha observado en otras levaduras (*Ogataea pini*) asociadas a escarabajos (*Dendroctonus brevicomis*) (Davis *et al.*, 2011).

En general, se ha documentado que la microbiota intestinal de las abejas, que incluye a las levaduras, pueden brindar protección contra patógenos (Engel *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2011; Koch y Schmid-Hempel, 2011; Forsgren *et al.*, 2010b). Su potencial antagonista se ha reportado sobre patógenos intestinales como *Nosema* o *Crithidia*. Por ejemplo, Corby-Harris *et al.* (2016), observaron que el consumo de *Parasaccharibacter apium* disminuyó los niveles de *Nosema* spp. en *A. mellifera*. En ensayos *in vitro*, Pozo *et al.* (2020) demostraron que *Candida bombi*, *C. bombiphila* y *M. reukauffi* asociadas a *Bombus terrestris* suprimieron el crecimiento de *Crithidia bombi*. Exceptuando a *S. cerevisiae*, las levaduras que estudiamos naturalmente se asocian a las abejas, y es razonable esperar, que también limiten el crecimiento de patógenos como *Nosema*. Aquí no observamos esta respuesta, pero es posible que este efecto sea dependiente de la densidad celular administrada (El Khoury *et al.*, 2016), o incluso, un efecto sinérgico de todas las especies de levaduras estudiadas (Forsgren *et al.*, 2010b).

Los altos niveles de *N. apis* favorecidos por el consumo de *S. bombicola* 2 son de interés para entender la interacción patógeno-levaduras en las abejas. Se ha descubierto que esta levadura produce soforolípidos (Celligoi *et al.*, 2020), una matriz de glicolípidos compuesta por ácidos grasos y el disacárido soforosa. Específicamente, *N. apis* pudo aprovechar esta matriz de nutrimentos para su multiplicación. Aunque esta matriz también pudo favorecer a las abejas, porque las abejas infectadas que consumieron esta dieta tuvieron altas tasas de sobrevivencia

como el de abejas sanas. Esta respuesta, en donde las dietas favorecen a los patógenos de *Nosema*, pero al mismo tiempo a las abejas, se ha documentado en experimentos que usan dietas ricas en nutrimentos (Glavinic *et al.*, 2017, Jack *et al.*, 2016; Tristchler *et al.*, 2017). Se argumenta que estas dietas ayudan a mantener un adecuado estado nutricional que permite a las abejas tolerar altos niveles de infección.

Estudios como los de Ptaszyńska *et al.* (2016) sugieren que existe un efecto sinérgico entre las levaduras y *N. ceranae* que es detrimental para la salud de las abejas. Indican que esto ocurre principalmente en niveles bajos y medios de infección, pero cuando la infección es alta, *Nosema* desplaza a las levaduras por su capacidad de tomar recursos del hospedero. Previamente, Borsuk *et al.* (2013) habían reportado esta misma respuesta con especies de *Saccharomyces* y *Candida* en abejas infectadas. Además, Andrearczyk *et al.* (2014) encontraron que el consumo de un sustituto con *S. cerevisiae*, *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* y *Rhodopseudomonas palustris* aumentó el nivel de *Nosema* spp. en las abejas, pero esto pudo deberse a la acción de todos los MO presentes. En contraste, nuestros resultados no coinciden con estas observaciones. No detectamos que todas nuestras dietas con levaduras promovieran altos niveles de *N. ceranae* o *N. apis* en las abejas. Incluso, *N. ceranae* fue limitada por el consumo de *S. cerevisiae*. Los resultados de Ptaszyńska *et al.* (2016) pueden ser específicos solo para las especies de levaduras que detectaron en sus experimentos, además se enfocaron particularmente en especies de *Saccharomyces* y *Candida*, sin indicar la identidad específica.

Las abejas infectadas con *Nosema* tuvieron bajas tasas de sobrevivencia, indicando que los patógenos afectaron negativamente la salud. Es ampliamente documentado, en laboratorio y en campo, que las infecciones por *Nosema* reducen el tiempo de vida de las abejas (Goblirsch *et al.*, 2013; Fleites-Ayil *et al.*, 2008). En nuestro estudio, solo el consumo de la dieta con *S. bombicola* 2 promovió una sobrevivencia similar en las abejas infectadas y sin infección. Esto sugiere, que la ingestión de *S. bombicola* 2 tuvo un efecto positivo en las abejas infectadas, a pesar de las alteraciones fisiológicas impuestas por *Nosema* (Higes *et al.*, 2008). En las abejas infectadas, esta levadura no disminuyó la expresión de los patógenos y tampoco favoreció altos niveles del gen *Vg*, el cual es determinante en la sobrevivencia. Posiblemente, *S. bombicola* 2 tuvo una influencia positiva en otros aspectos fisiológicos, por ejemplo, estimulando respuestas inmunes específicas o procesos regenerativos del tejido intestinal para contrarrestar los daños causados por *Nosema* (El Khoury *et al.*, 2018). Por otra parte, Ptaszyńska *et al.* (2016) señalan que *Nosema* puede favorecer el desarrollo de levaduras oportunistas en el intestino de *A. mellifera*, y en sinergia, comprometer la salud de las abejas. Sin embargo, nuestras abejas

alimentadas con *S. bombicola* 2 e infectadas con *Nosema*, mostraron una sobrevivencia similar a la de abejas sanas. Quizá la interacción entre levaduras y *Nosema* observada por Ptaszyńska *et al.* (2016) solo ocurre con verdaderas levaduras oportunistas que carecen de una íntima asociación con las abejas.

Las infecciones causadas por las especies de *Nosema* deterioran el epitelio intestinal de las abejas y este daño altera la absorción normal de nutrientes (Dussaubat *et al.*, 2012), además, los patógenos toman recursos del hospedero para su metabolismo. Esto provoca una respuesta de hambre en las abejas infectadas y tienden a consumir más alimento (Naug y Gibbs, 2009). Lo anterior es consistente con nuestros resultados, observamos en las abejas infectadas una demanda de alimento ligeramente mayor que en las abejas sanas, sin importar la dieta con levaduras que recibieron, evidenciando que la infección tuvo un efecto negativo generalizado.

Por otra parte, nuestros resultados también demostraron, que la alimentación de abejas sanas con células de levadura, bajo nuestras condiciones y la densidad celular administrada, no fue perjudicial. Las levaduras son MO heterótrofos que toman recursos para metabolizar del ambiente circundante como carbohidratos, compuestos nitrogenados y vitaminas (Deak, 2006). Posiblemente, después de su ingestión, las levaduras utilizaron nutrientes derivados del metabolismo de las abejas, pero esto no significó un aumento en el consumo de alimento sugiriendo que no impusieron una demanda energética relevante.

En las abejas, los cuerpos grasos comprenden las mayores reservas de energía y nutrientes, y su acumulación, en gran medida, depende de la calidad nutrimental de la dieta (Alaux *et al.*, 2010a). En nuestro estudio, el tipo de dieta afectó la acumulación de cuerpos grasos, mientras que, la infección por *Nosema* no tuvo un impacto negativo. De las dietas evaluadas, sobresale la dieta con *S. cerevisiae*, esta dieta promovió en las abejas infectadas una mayor acumulación de tejido graso, incluso, mayor que en las abejas sanas. Esta levadura ha sido ampliamente usada como sustituto alimenticio para las abejas por su contenido de proteínas y vitaminas (Paray *et al.*, 2021; Haydak, 1945), y esto pudo contribuir a la síntesis de cuerpos grasos. Además, la ingestión de *S. cerevisiae* provocó una disminución del patógeno *N. ceranae*, y este efecto, también pudo favorecer una mayor acumulación. En sentido opuesto, la dieta con *S. etchellsii* llevó a la acumulación más baja de cuerpos grasos en las abejas infectadas y sin infección. Es posible, que esta levadura tuvo un bajo aporte nutrimental. Estas respuestas de acumulación de cuerpos grasos que contrastan pueden explicarse por diferencias en el

contenido nutrimental de las levaduras consumidas (Pacheco *et al.*, 1997). Por ejemplo, en levaduras de *Zygosaccharomyces* se ha identificado la síntesis de una clase de ergosterol, el cual es necesario para el desarrollo de las larvas de *Scaptotrigona depilis* (Paludo *et al.*, 2018). En nuestro caso, el uso de las levaduras evaluadas es innovador en la nutrición de las abejas y sus aportes nutrimentales específicos son desconocidos y representan un área de investigación.

La proteína Vg y las enzimas proPO y GOx cumplen funciones importantes en el mantenimiento de la salud, de las respuestas inmunes y la inmunidad social (Bucekova *et al.*, 2014; Amdam *et al.*, 2012; González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2009). Además, se ha documentado que responden a las variaciones nutrimentales (Alaux *et al.*, 2011; Alaux *et al.*, 2010a). Mediante manipulaciones de la dieta, probamos si el consumo de levaduras en el alimento favorecía la expresión de genes que codifican para estas enzimas/proteínas en abejas infectadas con *Nosema*. Después de siete días, estos genes tuvieron bajas expresiones en las abejas infectadas, sin importar la dieta. Los altos niveles de expresión en las abejas sanas confirmaron que los patógenos fueron responsables de esta reducción. Fue evidente que ninguna dieta con levaduras pudo contrarrestar la disminución que causó *Nosema* en estos genes. Si la infección impuso una alta demanda energética/nutritiva, posiblemente el aporte nutrimental de las dietas no fue suficiente para sostener o incrementar la expresión de los genes.

Sin embargo, existe otra explicación que no considera la calidad de las dietas. Es posible que *Nosema* haya bloqueado la transcripción de estos genes mediante proteínas efectoras específicas (Arismendi *et al.*, 2020; Lalik, 2015). Las infecciones por *Nosema* desencadenan múltiples alteraciones fisiológicas, y con frecuencia, se reporta que la Vg, proPO y GOx son blancos recurrentes de estos patógenos quizá porque estos genes son determinantes en las abejas. Por ejemplo, Antúnez *et al.* (2013) detectaron una baja expresión de Vg en abejas parasitadas; por su parte, Huang *et al.* (2016) observaron una disminución de la expresión de proPO en abejas infectadas; y, Alaux *et al.* (2010b) reportaron que la presencia de *Nosema* en combinación con un pesticida disminuyó el nivel de GOx. Experimentos específicos son necesarios para determinar si el efecto detrimental en los genes se debe solo al efecto supresor de *Nosema* o es resultado de una alta demanda energética/nutritiva impuesta por la infección y que nuestras dietas no pudieron contrarrestar. En ambos escenarios, las alteraciones que ocurren en la Vg, proPO y GOx son detrimentales a nivel de individuo porque deterioran la salud y disminuyen la capacidad de defensa.

Las abejas melíferas y sus levaduras asociadas representan un modelo de estudio adecuado para entender la ecología y la evolución de las interacciones entre los hospederos, su microbiota y sus patógenos naturales. Este estudio aporta evidencia experimental de que las levaduras asociadas a las abejas melíferas tienen efectos especie-específicos en marcadores de la salud, de las respuestas inmunes y de la inmunidad social. Futuros estudios pueden esclarecer los mecanismos subyacentes del efecto de las levaduras evaluadas sobre las especies *N. ceranae* y *N. apis*. Otro aspecto no abordado aquí, fue la posible competencia por recursos que pudo existir entre las especies de *Nosema* estudiadas. Aunque se reportan diferencias mínimas de competencia cuando las infecciones mixtas inician al mismo tiempo (Natsopoulou *et al.*, 2015) como sucedió en nuestros experimentos.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN GENERAL

Los microorganismos (MO) asociados a las abejas han tenido un papel determinante en la ecología y la evolución de estos insectos. Entender su diversidad funcional y los mecanismos que sostienen su asociación con las abejas representa un valioso conocimiento que puede tener implicaciones en el control de los patógenos que afectan a las poblaciones de abejas. No se debe olvidar, que las abejas en conjunto, sostienen la producción mundial de alimentos y la estabilidad de los ecosistemas. En diversos grupos de abejas, se observa un conjunto particular de levaduras asociadas, las cuales colonizan desde las fuentes de néctar floral, hasta el tracto intestinal y las reservas de alimento (polen y miel) de las colonias. Existe una fuerte hipótesis de que estas levaduras mantienen una simbiosis nutricional, y recientemente, se ha planteado que también brindan protección contra patógenos. No obstante, las levaduras representan el grupo menos explorado hablando en términos experimentales si lo comparamos con el avance que existe en las bacterias asociadas a las abejas. En este contexto, la finalidad de este trabajo fue evaluar de forma integral, mediante manipulaciones de la dieta, la influencia de cinco levaduras sobre la salud, la nutrición y la inmunidad de la abeja europea *A. mellifera*. Además, en un contexto de infección, probamos su potencial antagonista sobre los microsporidios de *Nosema*.

Las diferentes levaduras asociadas a las abejas pueden tener distintas contribuciones debido a su particular composición celular y su síntesis de metabolitos. Esto se concluye de estudios previos que analizaron la influencia de levaduras en pocas variables de respuesta como el porcentaje de cría, la sobrevivencia o la tasa de consumo. En este trabajo, simultáneamente estudiamos múltiples respuestas en las abejas para obtener un marco general de los efectos del consumo de levaduras en la salud, la nutrición, las respuestas inmunes y la inmunidad social (Capítulo II). Se encontró que las dietas suplementadas con levaduras fueron apetecibles y las abejas las consumieron en mayor porcentaje. Este consumo mantuvo niveles adecuados de sobrevivencia, de cuerpos grasos y de *vitelogenina* (*Vg*). Además, fue de interés, que la dieta con *S. cerevisiae* incrementó ligeramente la expresión del gen *profenoloxidasa* (*proPO*). Este gen es un importante regulador de las respuestas inmunes de tipo celular y humoral encargadas de detener a los patógenos. En general, no observamos una contribución sobresaliente de las levaduras estudiadas sobre la salud, la nutrición y las respuestas de

defensa. Si bien estos resultados no coinciden totalmente con la hipótesis planteada de un efecto benéfico global, tampoco demuestran un efecto negativo de las levaduras en las variables medidas. La aceptación y el consumo de las dietas con levaduras demostraron que estos MO fueron apetecibles para las abejas, quizá porque aportaron compuestos de interés y no fueron reconocidos como patógenos. Además de la *proPO*, las abejas poseen otras respuestas fisiológicas que participan en la inmunidad. Es posible que nuestras dietas hayan favorecido otras respuestas inmunes que no medimos. Como práctica cultural, los apicultores utilizan levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) para alimentar a sus abejas. El uso de levaduras naturalmente asociadas a la nutrición de las abejas puede aportar ventajas considerables, aunque primero se necesitan experimentos en campo para validar sus efectos.

Entre los MO asociados a las abejas también encontramos a los patógenos, entre los cuales destacan los microsporidios *N. ceranae* y *N. apis*. Estos patógenos causan severos daños al epitelio intestinal y provocan una descompensación nutricional, además de que suprimen respuestas inmunes. Se han observado diferentes grados de patogenicidad entre cepas de *Nosema* de distintas regiones del mundo. En laboratorio, establecimos con éxito un método de inoculación colectiva usando abejas recién emergidas y esporas de *N. ceranae* y *N. apis* de esta región (Capítulo III). Nuestro método tuvo resultados aceptables respecto al porcentaje de abejas infectadas en comparación con otros trabajos publicados y puede ser reproducido en el laboratorio para infectar abejas adultas con esporas de *Nosema*. Durante la estandarización de este método comparamos la efectividad de dos tipos de alimento para inocular las esporas, sacarosa 50% y un sustituto de polen (SP). Se encontró que ambos tipos de alimento son sustratos viables para inocular esporas en las abejas. El experimento también evidenció que el tipo de dieta empleado en la alimentación afectó la multiplicación de los microsporidios de *Nosema*, lo que confirmó la hipótesis planteada en este capítulo (III). Se encontró que, el sustituto de polen, una dieta proteica, favoreció altos niveles de infección. Se debe tener precaución con el uso de dietas ricas en proteínas, como es el caso del SP que usamos, porque otros estudios han confirmado que favorecen las infecciones por *Nosema*. En la práctica, muchos apicultores utilizan dietas proteicas como suplementos o sustitutos para la alimentación de las abejas sin tener en cuenta las implicaciones de su uso sobre la presencia de patógenos.

La evaluación que realizamos en diferentes indicadores de salud, de nutrición y de las respuestas inmunes, nos ofreció un panorama amplio del impacto que tuvieron las infecciones en las abejas. Si bien los efectos negativos de las infecciones por *Nosema* se habían descrito

en los genes de *Vg*, *proPO* y *GOx*, en nuestro estudio detectamos que la infección disminuyó la expresión de estos genes en un tiempo relativamente corto, dos días después de la infección. Estos efectos pueden ser específicos de las cepas de *Nosema* de esta región y nos dan una idea de lo que experimentan en campo las poblaciones locales de abejas infectadas. Es importante confirmar este resultado, y al mismo tiempo, es necesario caracterizar la diversidad de cepas de las especies de *Nosema* presentes en esta región. A futuro, esto puede ayudar a identificar la introducción de nuevas variantes de *Nosema*, las cuales pueden representar un alto riesgo para la permanencia de las colonias locales de abejas y de la apicultura.

Los datos obtenidos en este trabajo permitieron diferenciar, de forma independiente, los efectos que causa el consumo de las levaduras estudiadas y la infección por especies de *Nosema*. Pudimos discernir que las levaduras no tienen efectos negativos en las abejas (Capítulo II). También observamos que las especies de *Nosema* causan múltiples afectaciones en la salud y en las respuestas inmunes (Capítulo III). En condiciones naturales, el tracto intestinal de las abejas puede ser colonizado por las levaduras asociadas y al mismo tiempo por las especies de *Nosema*. Es razonable suponer que se presentan interacciones competitivas entre estos MO y que ocurren con una alta frecuencia. Existen antecedentes de que ciertos MO asociados a las abejas tienen efectos antagonistas sobre patógenos intestinales. Bajo este panorama, establecimos un diseño experimental para investigar la capacidad antagonista de cinco diferentes levaduras en un contexto de infección, considerando a los *N. ceranae* y *N. apis* como modelos de estudio (Capítulo IV).

Encontramos que las respuestas fueron dependientes de la especie de levadura consumida. El consumo de la levadura *S. bombicola* 2 incrementó la sobrevivencia de las abejas infectadas. Mientras que, la acumulación de cuerpos grasos, que son esenciales para almacenar nutrimentos y energía, se incrementó con el consumo de *S. cerevisiae*. En relación al efecto antagonista, encontramos que *S. cerevisiae* tuvo un efecto determinante en la reducción del patógeno *N. ceranae*. Es posible suponer, que la presencia natural de *S. cerevisiae* en las colonias, y sobre todo en los alimentos, puede ayudar a disminuir los niveles de *N. ceranae*. Asimismo, su administración a las abejas como suplemento alimenticio supone observar los mismos efectos. Lo anterior puede tener implicaciones para el manejo de las infecciones por *Nosema* en condiciones naturales. Aunque, primero es pertinente dilucidar los mecanismos que explican este efecto y evaluar en campo si esta respuesta es consistente.

Se esperaba encontrar en todas las levaduras un efecto antagonista sobre las especies de *Nosema*, sin embargo, esta hipótesis no se cumplió. Es posible que estas levaduras tengan contribuciones específicas en otras respuestas fisiológicas. Esto es evidente en las abejas infectadas que se alimentaron con *S. bombicola* 2. En estas abejas, las variables medidas no fueron favorecidas por el consumo de esta levadura, sin embargo, la sobrevivencia alcanzó niveles comparables con las abejas sanas. Otras respuestas fisiológicas que no medimos pudieron favorecerse por el consumo de *S. bombicola* 2 y al final contribuyeron a la sobrevivencia. El uso combinado de *S. cerevisiae* y *S. bombicola* 2 en las dietas de abejas infectadas puede suponer un efecto más favorable en la sobrevivencia y en la disminución de la infección por *N. ceranae*.

La síntesis de estos resultados contribuye al conocimiento del papel potencial que cumplen las levaduras asociadas a las abejas. Para comprender mejor esta contribución, es importante integrar múltiples variables relacionadas con la salud, la nutrición, la inmunidad e incluso la inmunidad social. Es así, que observamos que las levaduras en la dieta no fueron perjudiciales para las abejas. Nuestros experimentos también evidenciaron los efectos negativos de las especies de *Nosema* presentes en la región, con impactos particulares en la inmunidad. Al final, el efecto antagonista sobre *N. ceranae* permitió conocer los potenciales beneficios de las levaduras en la protección contra patógenos.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 6.1 CONCLUSIONES

- ❖ El consumo de las cinco levaduras estudiadas no tuvo efectos negativos sobre los parámetros de salud, nutrición, respuestas inmunes e inmunidad social en las abejas adultas de *Apis mellifera* bajo condiciones de laboratorio.
- ❖ Las dietas enriquecidas con las cinco levaduras evaluadas fueron más apetecibles para las abejas y las consumieron en mayor porcentaje. Posiblemente, la presencia de compuestos específicos en las células de cada levadura o derivadas de su metabolismo resultaron atractivas para las abejas. Esto puede reflejar una adaptación de las abejas al consumo de estas levaduras.
- ❖ El consumo de *Saccharomyces cerevisiae* aumentó la expresión del gen *profenoloxidasa*, el cual se relaciona con las respuestas inmunes. Incluir esta levadura de forma regular en la alimentación de las abejas puede traer efectos benéficos en las respuestas de inmunidad.
- ❖ La sacarosa y el sustituto de polen pueden emplearse con éxito como sustratos para la inoculación colectiva de abejas de *Apis mellifera* con esporas de los patógenos de *Nosema*.
- ❖ El consumo del sustituto de polen, una dieta rica en proteínas, incrementó los niveles de infección de *Nosema ceranae* y *N. apis* en las abejas. Esto evidencia que el tipo de dieta tiene un papel clave en el desarrollo de estas infecciones en las abejas.
- ❖ Las infecciones causadas por *N. ceranae* y *N. apis* redujeron la sobrevivencia, pero, además, suprimieron rápidamente la expresión de los genes *vitelogenina*, *profenoloxidasa* y *glucosa oxidasa*, lo que compromete respuestas fisiológicas asociadas con la nutrición, las respuestas inmunes y la inmunidad social.
- ❖ El consumo de la levadura *Starmerella bombicola* 2 favoreció en las abejas infectadas con los patógenos *N. ceranae* y *N. apis* una sobrevivencia similar al de abejas sanas.

Los componentes de esta levadura, de alguna forma, contribuyeron al mantenimiento de la sobrevivencia.

- ❖ Los cuerpos grasos mostraron una mayor acumulación en las abejas que consumieron la levadura *S. cerevisiae*. Posiblemente esta levadura tuvo un aporte significativo de proteínas, lípidos o vitaminas que contribuyó a una mayor síntesis de cuerpos grasos, incluso en las abejas infectadas con los microsporidios *N. ceranae* y *N. apis*.
- ❖ *Saccharomyces cerevisiae* tuvo un claro efecto antagonista sobre *N. ceranae*. Las abejas que consumieron esta levadura tuvieron bajos niveles de este patógeno. La alimentación regular de las abejas con esta levadura puede ayudar a mantener bajos niveles de infección.
- ❖ La adición simultánea de *S. bombicola* 2 y *S. cerevisiae* en el alimento de las abejas infectadas puede traer mayores beneficios en la salud, la nutrición y las respuestas inmunes.

## 6.2 PERSPECTIVAS

- ❖ Este trabajo es novedoso porque incorpora en la dieta levaduras naturalmente asociadas a la alimentación de las abejas. Nuestro enfoque experimental consistió en evaluar sus efectos en las abejas de forma independiente. Futuros estudios pueden evaluar diferentes combinaciones de las cinco levaduras que evaluamos para determinar su efecto sinérgico.
- ❖ En este trabajo, las dietas fueron suplementadas considerando una misma densidad celular de cada una de las cinco levaduras. En este contexto, sería interesante evaluar el efecto de diferentes densidades celulares. Es posible que su contribución a las abejas sea dosis dependiente.
- ❖ Sería importante corroborar en colonias bajo condiciones naturales, si los patógenos *Nosema ceranae* y *N. apis* causan una rápida supresión de los genes *vitelogenina*, *profenoloxidasa* y *glucosa oxidasa*, así como lo determinamos en el laboratorio. La rápida alteración de estos genes a nivel de colonia podría amenazar el mantenimiento de las poblaciones de abejas.

- ❖ Para un mayor entendimiento del efecto antagonista de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *N. ceranae* futuros experimentos pueden realizar ensayos *in vitro* con ambos microorganismos realizando cultivos celulares.
  
- ❖ El conocimiento generado sobre estas cinco levaduras se basa en experimentos de laboratorio, y sin duda, el siguiente paso es evaluar si las respuestas que observamos son consistentes bajo condiciones naturales experimentando con colonias de abejas en campo.



---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Alaux C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y. (2010a). Diet effects on honey bee immunocompetence. *Biology Letters*, 6, 562-565.
- Alaux, C., Brunet, J.L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y. (2010b). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 12, 774-782.
- Alaux, C., Dantec, C., Parrinello, H., Le Conte, Y. (2011). Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*, 12, 496.
- Alberoni, A., Gaggia, F., Baffoni, L., Gioia, D.D. (2016). Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 9469-9482.
- Altaye, S.Z., Pirk, C.W.W., Crewe, R.M., Nicolson, S.W. (2010). Convergence of carbohydrate-biased intake targets in caged worker honeybees fed different protein sources. *Journal of Experimental Biology*, 213, 3311-3318.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W. (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honey bees. *Experimental Gerontology*, 39, 767-773.
- Amdam, G.V., Fennern, E., Havukainen, H. (2012). Vitellogenin in honey bee behavior and lifespan. En: Galizia, C., Eisenhardt, D., Giurfa, M. (eds) *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Springer, Dordrecht. pp. 17-29.
- Amro, A., Younis, M., Ghania, A. (2020). Physiological effects of some pollen substitutes diets on caged honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *International Journal of Environment*, 9, 87-99.
- Anagnostou, C., Dorsch, M., Rohlf, M. (2010). Influence of dietary yeasts on *Drosophila melanogaster* life-history traits. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 136, 1-11.

- Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Eckholm, B.J., Mott, B.M., DeGrandi-Hoffman, G. (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58, 431.
- Andrearczyk, S., Kadhim, M.J., Knaga, S. (2014). Influence of a probiotic on the mortality, sugar syrup ingestion and infection of honeybees with *Nosema* spp. Under laboratory assessment. *Medycyna Weterynaryjna*, 70, 762-765.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11, 2284-2290.
- Antúnez, K., Mendoza, Y., Santos, E., Invernizzi, C. (2013). Differential expression of *vitellogenin* in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research*, 52, 227-234.
- Archer, C.R., Köhler, A., Pirk, C.W.W., Oosthuizen, V., Apostolides, Z. (2014). Antioxidant supplementation can reduce the survival costs of excess amino acid intake in honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 71, 78-86.
- Arismendi, N., Caro, S., Castro, M.P., Vargas, M., Riveros, G., Venegas, T. (2020). Impact of mixed infections of gut parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae* on the lifespan and immune-related biomarkers in *Apis mellifera*. *Insects*, 11, 1-12.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207-225.
- Badaoui, B., Fougeroux, A., Petit, F., Anselmo, A., Gorni, C., Cucurachi, M., Cersini, A., Granato, A., Cardeti, G., Formato, G., Mutinelli, F., Giuffra, E., Williams, J.L., Botti, S. (2017). RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, 12, e0173438.
- Barragán, S., Basualdo, M., Rodríguez, E.M. (2015). Conversion of protein from supplements into protein of hemolymph and fat bodies in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*, 54, 399-404.

- 
- Bitondi, M., Simões, Z., (1996). The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *Journal of Apicultural Research*, 35, 27-36.
- Blackwell, M. (2017). Yeasts in insects and other invertebrates, En: Yeasts in natural ecosystems. Diversity, P. Buzzini, M.A. Lachance y A. Yurkov (eds.). Springer, Switzerland. pp. 1-38.
- Borba, R.S., Spivak, M. (2017). Propolis envelope in *Apis mellifera* colonies supports honey bees against the pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Scientific Reports*, 7, 11429.
- Borsuk, G., Ptaszynska, A., Olszewski, K., Paleolog, J. (2013). Impact of nosemosis on the intestinal yeast flora of honey bees. *Medycyna Weterynaryjna*, 69, 726-729.
- Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., Beaman, L.D., Danka, R.G. (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 53-58.
- Bradley, T.J., Simmons, F.H. (1997). An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 43, 779-788.
- Brodtschneider, R., Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41, 278-294.
- Bruins, B.G., Scharloo, W., Thorig, G. (1991). The harmful effect of light on *Drosophila* is diet dependent. *Insect Biochemistry*, 21, 535-539.
- Brysch-Herzberg, M. (2004). Ecology of yeasts in plant–bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiology Ecology*, 50, 87-100.
- Bucekova, M., Valachova, I., Kohutova, L., Prochazka, E., Kludiny, J., Majtan, J. (2014). Honeybee glucose oxidase-lts expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften*, 101, 661-670.
- Canto, A., Herrera, C.M., Medrano, M., Pérez, R., García, I.M. (2008). Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany*, 95, 315-320.

- Canto, A., Herrera, C.M. (2012). Micro-organisms behind the pollination scenes: microbial imprint on floral nectar sugar variation in a tropical plant community. *Annals of Botany*, 110, 1173-1183.
- Canto, A., Herrera, C.M., Rodríguez, R. (2017). Nectar-living yeasts of a tropical host plant community: diversity and effects on community-wide floral nectar traits. *PeerJ*, 5, e3517.
- Cao, X., He, Y., Hu, Y., Wang, Y., Chen, Y., Bryant, B., Clem, R.J., Schwartz, L.M., Blissard, G., Jiang, H. (2015). The immune signaling pathways of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 62, 64-74.
- Carvalho, C. M., Meirinho, S., Estevinho, M.L.F., Choupina, A. (2010). Yeast species associated with honey: different identification methods. *Archivos de Zootecnia*, 59, 103-113.
- Celligoi, M.A.P.C., Silveira, V.A.I., Hipólito, A., Caretta, T.O., Baldo, C. (2020). Sophorolipids: A review on production and perspectives of application in agriculture. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 18, e03R01.
- Cerenius, L., Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 116-126.
- Chaimanee, V., Pettis, J.S., Chen, Y., Evans, J.D., Khongphinitbunjong, K., Chantawannakul, P. (2013). Susceptibility of four different honey bee species to *Nosema ceranae*. *Veterinary Parasitology*, 193, 260-265.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P. (2016). Infectivity of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and immune response in honey bees *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Journal of Apicultural Research*, 54, 200-206.
- Chen Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 186-188.
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J.S. (2009). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101, 204-209.

- 
- Christiaens, J.F., Franco, L.M., Cools, T.L., De Meester, L., Michiels, J., Wenseleers, T., Hassan, B.A., Yaksi, E., Verstrepen, K.J. (2014). The fungal aroma gene ATF1 promotes dispersal of yeast cells through insect vectors. *Cell Reports*, 9, 425-432.
- Clayton, A.M., Dong, Y., Dimopoulos, G. (2014). The *Anopheles* innate immune system in the defense against malaria infection. *Journal of Innate Immunity*, 6, 169-181.
- Corby-Harris, V., Snyder, L., Meador, C.A.D., Naldo, R., Mott, B., Anderson, K.E. (2016). *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*. *Journal of Economic Entomology*, 109, 537-543.
- Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., Robinson, G.E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 7128-7133.
- Cotter, S.C., Reavey, C.E., Tummala, Y., Randall, J.L., Holdbrook, R., Ponton, F., Simpson, S.J., Smith, J.A., Wilson, K. (2019). Diet modulates the relationship between immune gene expression and functional immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 109, 128-141.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current Biology*, 17, R693-R702.
- Cremer, S., Sixt, M. (2009). Analogies in the evolution of individual and social immunity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, 129-142.
- Cremonez, T.M., De Jong, D., Bitondi, M.M.G. (1998). Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 91, 1284-1289.
- Crotti, E., Sansonno, L., Prosdocimi, E.M., Vacchini, V., Hamdi, C., Cherif, A., Gonella, E., Marzorati, M., Balloi, A. (2013). Microbial symbionts of honeybees: a promising tool to improve honeybee health. *New Biotechnology*, 30, 716-722.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*, 7, e32151.

- Daniel, H.M., Rosa, C.A., Sao Thiago Calaca, P.S., Antonini, Y., Bastos, E.M.A.F., Evrard, P., Huret, S., Fidalgo Jiménez, A., Lachance, M.A. (2013). *Starmerella neotropicalis* f. a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3896-3903.
- Davis, T.S., Hofstetter, R.W., Foster, J.T., Foote, N.E., Keim, P. (2011). Interactions between the yeast *Ogataea pini* and filamentous fungi associated with the western pine beetle. *Microbial Ecology*, 61, 626-634.
- Deak, T. (2006). Environmental factors influencing yeasts, en: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, C. Rosa y P. Gábor (eds.). Springer-Verlag. Berlín, Germany. pp. 154-174.
- De Boer, G. (1995). Introduction, En: Regulatory mechanisms in insect feeding, R.F. Chapman y G. de Boer (eds.), Chapman y Hall, New York.
- DeGrandi-Hoffman, G., Sammataro, D., Alarcon, R. (2009). The importance of microbes in nutrition and health of honey bee colonies. Parte I. *American Bee Journal*, 149, 583-584.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170-176.
- Detry, R., Simon-Delso, N., Bruneau, E., Daniel, H.M. (2020). Specialisation of yeast genera in different phases of bee bread maturation. *Microorganisms*, 8, 1789.
- Dias, J.M.A., Morais, M.M., Franco, T.M., Pereira, R.A., Turcatto, A.P., De Jong, D. (2018). Fermentation of a pollen substitute diet with beebread microorganisms increases diet consumption and hemolymph protein levels of honey bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology*, 65, 760-765.
- Dinno, A. (2017). Package 'dunn.test'. Version 1.3.5. <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>.
- Di Pasquale, G., Alaux, C., Le Conte, Y., Odoux, J., Pioz, M., Vaissiere, B.E., Belzunces, L.P., Decourtye, A. (2016). Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health. *PLoS ONE*, 11, e0162818.

- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.L., Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, 8, e72016.
- Dolezal, A.G., Toth, A.L. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 114-119.
- Douglas, A.E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43, 17-37.
- Dussaubat, C., Brunet, J., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J., Martín-Hernández, R., Botías, C., Marianne, C., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., Moritz, R.F.A., Le Conte, Y., Alaux, C. (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7, e37017.
- El Khoury, S., Rousseau, A., Lecoœur, A., Cheaib, B., Bouslama, S., Mercier, P., Demey, V., Castex, M., Giovenazzo, P., Derome, N. (2018). Deleterious interaction between honeybees (*Apis mellifera*) and its microsporidian Intracellular parasite *Nosema ceranae* was mitigated by administrating either endogenous or allochthonous gut microbiota strains. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 58.
- Engel, F., Martinson, V.G., Moran, N.A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 11002-11007.
- Engel, P., Kwong, W.K., McFrederick, Q., Anderson, K.E., Barribeau, S.M., Chandler, J.A., Cornman, R.S., Dainat, J., de Miranda, J.R., Doublet, V., Emery, O., Evans, J.D., Farinelli, L., Flenniken, M.L., Granberg, F., Grasis, J.A., Gauthier, L., Hayer, J., Koch, H., Kocher, S., Martinson, V.G., Moran, N., Munoz-Torres, M., Newton, I., Paxton, R.J., Powell, E., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., Song, S.J., Schwarz, R.S., vanEngelsdorp, D., Dainat, B. (2016). The Bee Microbiome: Impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *mBio*, 7, e02164-15.
- Esanu, D.I., Radu-Rusu, C.G., Pop, I.M. (2018). The use of some supplementary feeds and their influence on the longevity and wax production of caged honey bees. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*, 61, 68-73.

- Evans, J.D., Lopez, D.L. (2004). Bacterial probiotics and immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97, 752-756.
- Evans, J.D. (2006). Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 135-139.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15, 645-656.
- Evans, J.D., Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S62-S72.
- Even, N., Devaud, J., Barron, A.B. (2012). General stress responses in the honey bee. *Insects*, 3, 1271-1298.
- FAO, 2021. FAOSTAT. Crops and livestock products. Última actualización: 09/febrero/2021. Acceso: 08/septiembre/2021. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/TCL/visualize>.
- Fischman, B.J., Pitts-Singer, T.L, Robinson, G.E. (2017). Nutritional regulation of phenotypic plasticity in a solitary bee (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology*, 46, 1070-1079.
- Fleites-Ayil, F., Quezada-Eúan, J.J., Medina-Medina, L.A. (2018). Onset of foraging and lifespan of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) infected with different levels of *Nosema ceranae* spores in Neotropical Mexico. *Apidologie*, 49, 781-788.
- Fleming, J.C., Schmehl, D.R., Ellis, J.D. (2015). Characterizing the impact of commercial pollen substitute diets on the level of *Nosema* spp. in honey bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS ONE*, 10, e0132014.
- Fokkema, N.J., Riphagen, I., Poot, R.J., de Jong, C. (1983). Aphid honeydew, a potential stimulant of *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum* and the competitive role of saprophytic mycoflora. *Transactions of the British Mycological Society*, 81, 355-363.
- Forsgren, E., Fries, I. (2010a). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, 170, 212-217.

- 
- Forsgren, E., Olofsson, T.C., Vásquez, A., Fries, I., (2010b). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41, 99-108.
- Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y.P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D.P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R.J., Tanner, G., Webster, T.C., Williams, G.R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1-28.
- Ganter, P.F. (2006). Yeast and invertebrate associations, En: The yeast handbook. Biodiversity and ecophysiology of yeasts, C.A. Rosa y G. Péter (eds.). Springer, Heidelberg, Germany. pp. 303-370.
- Gibson, C.M., Hunter, M.S. (2010). Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters*, 13, 223-234.
- Gilliam, M. (1972). Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 20, 101-103.
- Gilliam, M., Wickerham, L.J., Morton, H.L., Martin, R. (1974). Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2, 4-D and antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 24, 349-356.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. *Apidologie*, 10, 43-53.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155, 1-10.
- Gisder, S., Genersch, E. (2015). Identification of candidate agents active against *N. ceranae* infection in honey bees: Establishment of a medium throughput screening assay based on *N. ceranae* infected cultured cells. *PLoS ONE*, 10, e0117200.
- Glavinic, U., Stankovic, B., Draskovic, V., Stevanovic, J., Petrovic, T., Lakic, N., Stanimirovic, Z. (2017). Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, 12, e0187726.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M. (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE*, 8, e58165.

- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142, 1-16.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347,1255957.
- Gregorc, A., Sampson, B., Knight, P.R., Adamczyk, J. (2019). Diet quality affects honey bee (Hymenoptera: Apidae) mortality under laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 58, 492-493.
- Hahn, D.A., Denlinger, D.L. (2011). Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology*, 56, 103-121.
- Hajsig, M. (1958). *Torulopsis apicola* nov. spec., new isolates from bees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 24, 18-22.
- Hatoum, R., Labrie, S., Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 421.
- Haydak, M. (1945). Value of pollen substitutes for brood rearing of honeybees. *Journal of Economic Entomology*, 38, 484-487.
- Herbert Jr, E.W., Shimanuki, H., Caron, D. (1977). Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera: Apidae) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie*, 8, 141-146.
- Herbert Jr, E.W., Shimanuki, H. (1978). Consumption and brood rearing by caged honeybees fed pollen substitutes fortified with various sugars. *Journal of Apicultural Research*, 17, 27-31.
- Herrera, C.M., de Vega, C., Canto, A., Pozo, M.I. (2009). Yeast in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany*, 103, 1415-1423.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido Bailón, E., González-Porto, A.V., Barrios, L., del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., García Palencia, P., Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659-2669.

- Höcherl, N., Siede, R., Illies, I., Gätschenberger, H., Tautz, J. (2012). Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 58, 278-285.
- Hoffman, J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426, 33-38.
- Holt, H.L., Aronstein, K.A., Grozinger, C.M. (2013). Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 14, 799.
- Hom, E.F.Y., Murray, A.W. (2014). Plant-fungal ecology. Niche engineering demonstrates a latent capacity for fungal-algal mutualism. *Science*, 345, 94-98.
- House, H.L. (1962). Insect nutrition. *Annual Review of Entomology*, 6, 13-26.
- Huang, W., Solter, L.F., Yau, P.M., Imai, B.S. (2013). *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathogens*, 9, e1003185.
- Huang, Q., Chen, Y.P., Wang, R.W., Cheng, S., Evans, J.D. (2016). Host-parasite interactions and purifying selection in a microsporidian parasite of honey bees. *PLoS ONE*, 11, e0147549.
- INEGI-SADER, 2018. Atlas nacional de las abejas y derivados apícolas. <https://atlasnacionaldelasabejasmx.github.io/atlas/cap6.html>
- Inglis, G.D., Sigler, L., Goettel, M.S. (1993). Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata*). *Microbial Ecology*, 26, 125-143.
- Invitrogen. 2014. TRIzol® Reagent. (Consultado junio 2017). Disponible en: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf).
- Jack, C.J., Uppala, S.S., Lucas, H.M., Sagili, R.R. (2016). Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 87, 12-19.
- James, S.A., Stratford, M. (2011). *Zygosaccharomyces* Barker (1901), in: Kurtzman, C.P., Fell, J.P., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier, New York, USA, pp. 937-947.

- Kassambara, A., Kosinski, M. (2019). Drawing survival curves using 'ggplot2'. Version 0.4.4. <http://www.sthda.com/english/rpkgs/survminer/>
- Kaufman, M.G., Walker, E.D., Odelson, D.A., Klug, M.J. (2000). Microbial community ecology and insect nutrition. *American Entomologist*, 46, 173-185.
- Koch, H., Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 19288-19292.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.P., Boekhout, T. (2011). Definition, classification and nomenclature of the yeasts, in: Kurtzman, C.P., Fell, J.P., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier, New York, USA, pp. 3-8.
- Kurtzman, C.P., Boekhout, T. (2017). Yeast as distinct life forms of fungi, En: *Yeasts in natural ecosystems*. Ecology, P. Buzzini, M.A. Lachance y A. Yurkov (eds.). Springer, Cham, Switzerland. pp. 1-38.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H.B. (2019). Tests in linear mixed effects models. <https://github.com/runehaubo/lmerTestR>
- Kwong, W.K., Medina, L.A., Koch, H., Sing, K., Yu Soh, E.J., Ascher, J.S., Jaffe, R., Moran, N.A. (2017). Dynamic microbiome evolution on social bees. *Science Advances*, 3, e1600513.
- Lachance, M.A. (2011). *Starmerella* Rosa & Lachance (1998), in: Kurtzman, C.P., Fell, J.P., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier, New York, USA. pp. 811-815.
- Lachance, M.A., Starmer, W.T., Rosa, C.A., Bowles, J.M., Barker, J.S.F., Janzen, D.H. (2001). Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Research*, 1, 1-8.
- Lalik, M. (2015). Characterization of secreted effector proteins of *Nosema ceranae*, an agent associated with colony collapse disorder (CCD). Ph.D. Thesis, University of Exeter, Exeter, UK, January 2015.

- 
- Lecocq, A., Jensen, A.B., Kryger, P., Nieh, J.C. (2016). Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific Reports*, 6, 1-11.
- Lee, Y.H., Hou, R.F. (1987). Physiological role of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Physiology*, 33, 851-860.
- Lee, K.P., Simpson, S.J., Wilson, K. (2008). Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology*, 22, 1052-1061.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, 697-743.
- Lenth, R.V., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Riebl, H., Singmann, H. (2021). Package 'emmeans'. Version 1.6.1. <https://github.com/rvlenth/emmeans>.
- Li, W., Chen, Y., Cook, S.C. (2018). Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. *International Journal for Parasitology*, 48, 433-444.
- Lizama, B. (2011). Levaduras asociadas a dos especies de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) y a tres especies de la flora nectarífera de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 77.
- Lochmiller, R.L., Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88, 87-98.
- López-Uribe, M.M., Fitzgerald, A., Simone-Finstrom, M. (2017). Inducible versus constitutive social immunity: Examining effects of colony infection on glucose oxidase and defensin-1 production in honeybees. *Royal Society Open Science*, 4, 10-17.
- Lourenço, A.P., Zufelato, M.S., Bitondi, M., Simões, Z.L.P. (2005). Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 541-552.
- Ludvigsen, J., Andersen, A., Hjeljord, L., Rudi, K. (2021). The honey bee gut mycobiota cluster by season versus the microbiota which cluster by gut segment. *Veterinary Sciences*, 8, 4.

- McFrederick, Q.S., Mueller, U.G., James, R.R. (2014). Interactions between fungi and bacteria influence microbial community structure in the *Megachile rotundata* larval gut. *Proceedings of the Royal Society B*, 281, 20132653.
- Maes, P.W., Rodrigues, P.A.P., Oliver, R., Mott, B.M., Anderson, K.E. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 25, 5439-5450.
- Mankowski, M.E., Morrell, J.J. (2004). Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. *Mycologia*, 96, 226-231.
- Manning, R. (2016). Artificial feeding of honeybees based on an understanding of nutritional principles. *Animal Production Science*, 58, 689-703.
- Martin, D., Bedel de Buzareinques, F., Barry, P., Derridj, S. (1993). An epiphytic yeast (*Sporobolomyces roseus*) influencing in oviposition preference of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on maize. *Acta Oecologica*, 14, 563-574.
- Martínez-Puc, J.F., Medina, L.A., Catzin, G.A. (2011). Frequency of *Varroa destructor*, *Nosema apis* and *Acarapis woodi* in managed colonies and wild swarms of honey bees (*Apis mellifera*) in Mérida, Yucatán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2, 25-38.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M. (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: Coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology*, 14, 2127-2138.
- Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S., Moran, N.A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20, 619-628.
- Martinson, V.G., Moy, J., Moran, N.A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied Environmental Microbiology*, 78, 2830.
- Mayack, C. Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100, 185-188.

- 
- Menezes, C., Vollet-Neto, A., León Contrera, F.A.F., Cristino Venturieri, G., Imperatriz-Fonseca, V.L. (2013). The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping, En: Pot-Honey: A legacy of stingless bees, P. Vit, S.R.M. Pedro y D. Roubik (eds.). Springer, New York. pp. 153-171.
- Merkx-Jacques, M., Bede, J.C. (2005). Influence of diet on the larval beet armyworm, *Spodoptera exigua*, glucose oxidase activity. *Journal of Insect Science*, 5, 48.
- Milbrath, M.O., van Tran, T., Huang, W.F., Solter, L.F., Tarpy, D.R., Lawrence, F., Huang, Z.Y. (2015). Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 125, 9-15.
- Mittelbach, M., Vannette, R.L. (2017). Mutualism in yeasts, En: Yeasts in natural ecosystems. Ecology, P. Buzzini, M.A. Lachance y A. Yurkov (eds.). Springer, Cham, Switzerland. pp. 155-178.
- Mola, J.M., Richardson, L.L., Spyreas, G., Zaya, D.N., Pearse, I.S. (2021). Long-term surveys support declines in early season forest plants used by bumblebees. *Journal of Applied Ecology*, 00, 1-11.
- Morais, P.B., Sao Thiago Calaca, P.S., Rosa, C.A. (2013). Microorganisms associated with stingless bees, in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D. (Eds.), Pot-Honey: A legacy of stingless bees. Springer, New York, pp. 173-186.
- Mueller, U.G., Rehner, S.A., Schultz, T.R. (1998). The evolution of agriculture in ants. *Science*, 281, 2034-2038.
- Nappi, A.J., Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*, 22, 469-480.
- Nasir, H., Noda, H. (2003). Yeast-like symbiotes as a sterol source in anobiid beetles (Coleoptera, Anobiidae): possible metabolic pathways from fungal sterols to 7-dehydrocholesterol. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 52, 175-182.
- Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., Doublet, V., Bryden, J., Paxton, R.J (2015). Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the

- spread of an emerging infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 20141896.
- Naug, D., Gibbs, A. (2009). Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, 40, 595-599.
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Kim Fondrk, M., Page Jr., R.E., Amdam, G.V. (2007). The gene *vitellogenin* has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology*, 5, e62.
- Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T. (1999). Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honey bee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry*, 265, 127-133.
- Pacheco, M.T., Caballero-Córdoba, G.M., Sgarbieri, V.C. (1997). Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 43, 601-612.
- Paludo, C.R., Menezes, C., Silva-Junior, E.A., Vollet-Neto, A., Andrade-Dominguez, A., Pishchany, G., Khadempour, L., do Nascimento, F.S., Currie, C.R., Kolter, R., Clardy, J., Pupo, M.T. (2018). Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Scientific Reports*, 8, 1122.
- Paray, B.A., Kumari, I., Hajam, Y.A., Sharma, B., Kumar, R., Albeshr, M.F., Farah, M.A., Khan, J.M. (2021). Honeybee nutrition and pollen substitutes: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 1167-1176.
- Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., Scheper, M.A., Leid, J.G., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59, 493-503.
- Pettis, J.S., vanEngeldorsp, D., Johnson, G., Dively, D. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99, 153-158.

- 
- Pimentel, M.R.C., Antonini, Y., Martins, R.P., Lachance, M.A., Rosa, C.A. (2005). *Candida riodecensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Research*, 5, 875-879.
- Pirk, C.W.W., Boodhoo, C., Human, H., Nicolson, S.W. (2010). The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*). *Apidologie*, 41, 62-72.
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A.H., Lange, C., Higes, M. (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 1, 131-135.
- Porrini, M.P., Porrini, L.P., Garrido, P.M., de Melo e Silva Neto, C., Porrini, D.P., Muller, F., Nuñez, L.A., Alvarez, L., Iriarte, P.F., Eguaras, M.J. (2017). *Nosema ceranae* in South American native stingless bees and social wasp. *Microbial Ecology*, 74, 761-764.
- Ponton, F., Wilson, K., Holmes, A.J., Cotter, S.C., Raubenheimer, D., Simpson, S.J. (2013). Integrating, nutrition and immunology: A new frontier. *Journal of Insect Physiology*, 59, 130-137.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 345-353.
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K., Moran, N.A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 7378-7387.
- Pozo, M.I., Kemenade, G.V., van Oystaeyen, A., Aledón-Catalá, T., Benavente, A., van den Ende, W., Wackers, F., Jacquemyn, H. (2020). The impact of yeast presence in nectar on bumble bee behavior and fitness. *Ecological Monographs*, 90, e01393.
- Price, P.W. (2002). Species interactions and the evolutionary of biodiversity, En: Plant animal interactions: An evolutionary approach, C.M. Herrera y O. Pellmyr (eds.). Blackwell, Great Britain. pp. 3-25.

- Ptaszyńska, A.A., Paleolog, A., Borsuk, G. (2016). *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honey bee intestines. *PLoS ONE*, 11, e0164477.
- Raggi, P., Lopez, P., Diaz, A., Carrasco, D., Silva, A., Velez, A., Opazo, R., Magne, F., Navarrete, P.A. (2014). *Debaryomyces hansenii* and *Rhodotorula mucilaginosa* comprised the yeast core gut microbiota of wild and reared carnivorous salmonids, croaker and yellowtail. *Environmental Microbiology*, 16, 2791-2803.
- Ramsey, S., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D., vanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 1792-1801.
- Retschnig, G., Rich, J., Crailsheim, K., Pfister, J., Perreten, V., Neumann, P. (2021). You are what you eat: relative importance of diet, gut microbiota and nestmates for honey bee, *Apis mellifera*, worker health. *Apidologie*, 52, 632-646.
- Roberts, K.E., Hughes, W.O.H. (2014). Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 121, 1-6.
- Rosa, C.A., Lachance, M.A. (1998). The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 1413-1417.
- Rosa, C.A., Viana, E.M., Martins, R.P., Antonini, Y., Lachance, M.A. (1999). *Candida batistae*, a new yeast species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia*, 91, 428-433.
- Rosa, C.A., Lachance, M.A., Silva, J.O.C., Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Antonini, Y., Martins, R.P. (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4, 271-275.
- RStudio Team, 2006. <https://www.rstudio.com>
- Saffari, A.M., Kevan, P.G., Atkinson, J.L. (2018). A promising pollen substitute for honey bees. *American Bee Journal*, 144, 230-231.

- Salmela, H., Amdam, G.V., Freitak, D. (2015). Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS Pathogens*, 11, e1005015.
- Sandhu, D.K., Waraich, M.K. (1985). Yeasts associated with pollinating bees and flower nectar. *Microbial Ecology*, 11, 51-58.
- Sasaki, T., Kawamura, M., Ishikawa, H. (1996). Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism. *Journal of Insect Physiology*, 42, 125-129.
- Schmid, M.R., Brockmann, A., Pirk, C.W., Stanley, D.W., Tautz, J. (2008). Adult honey bees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*, 54, 439-444.
- Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*, 50, 529-551.
- Schmid-Hempel, P., Hebert, D. (2005). On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 27-32.
- Schmitt, M.J., Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 212-221.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101-1108.
- Schwarz, R.S., Evans, J.D. (2013). Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental and Comparative Immunology*, 40, 300-310.
- Seehuus S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V. (2006). Reproductive protein protects sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 962-967.
- Seeley, T.D. (1995). The wisdom of the hive. The social physiology of honey bee colonies. Harvard University Press. pp. 295.

- Sihag, R.C., Gupta, M. (2011). Development of an artificial pollen substitute/supplement diet to help tide the colonies of honey bee (*Apis mellifera* L.) over the dearth season. *Journal of Apicultural Science*, 55, 15-29.
- Simpson, S.J. (1995). Regulation of a meal: chewing insects. En, Regulatory mechanisms in insect feeding, R.F. Chapman y G. de Boer (eds.), Chapman y Hall, New York. pp. 137-156.
- Smodiš Škerl, M.I., Gregorc, A. (2014). A preliminary laboratory study on the longevity of *A. m. carnica* honey bees after feeding with candies containing HMF. *Journal of Apicultural Research*, 53, 422-423.
- Soderhall, K., Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10, 23-28.
- Spencer-Booth, Y. (1960). Feeding pollen, pollen substitutes and pollen supplements to honeybees. *Bee World*, 41, 253-263.
- Spencer, J.F.T., Gorin, P.A.J., Tulloch, A.P. (1970). *Torulopsis bombicola* sp. n. *Antonie van Leeuwenhoek*, 36, 129-133.
- Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. (1997). Ecology: where yeast live. En: Yeast in natural and artificial habitats, J.F.T. Spencer y D.M. Spencer (eds.), Springer, Heidelberg, Germany. pp. 33-79.
- Srygley, R.B., Lorch, P.D., Simpson, S.J., Sword, G.A. (2009). Immediate protein dietary effects on movement and the generalised immunocompetence of migrating Mormon crickets *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Ecological Entomology*, 34, 663-668.
- Standifer, L.N., McCaughey, W.F., Todd, F.E., Kemmerer, A.R. (1960). Relative availability of various proteins to the honey bee. *Annals of the Entomological Society of America*, 53, 618-625.
- Starks, P.T., Blackie, C.A., Seeley, T.D. (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87, 229-231.
- Starmer, W.T., Aberdeen, V. (1990). The nutritional importance of pure and mixed cultures of yeasts in the development of *Drosophila mulleri* larvae in *Opuntia* tissues and its

- relationship to host plant shifts. En, *The ecological and evolutionary genetics of Drosophila*, J.S.F. Barker, W.T. Starmer y R.J. MacIntyre (eds.), Plenum Publishing Company, New York. pp.145-160.
- Starmer, W.T., Lachance, M.A. (2011). Yeast ecology, en: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, C.P. Kurtzman, J.P. Fell y T. Boekhout (eds.). Elsevier. New York, USA. pp. 65-83.
- Stefanini, I. (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast*, 1-16.
- Takenaka, T., Ito, H., Yatsunami, K., Echigo, T. (1990). Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconic acid formation in the hypopharyngeal glands during the lifespan of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 2133-2134.
- Taric, E., Glavinic, U., Vejnovic, B., Stanojkovic, A., Nevenka, A., Dimitrijevic, V., Stanimirovic, Z (2020). Oxidative stress, endoparasite prevalence, and social immunity in bee colonies kept traditionally vs those kept for commercial purposes. *Insects*, 11, 266.
- Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Nicoli, J.R., Antonini, Y., Martins, R.P., Lachance, M.A., Rosa, C.A. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 339-343.
- Therneau, T.M. (2019). Survival Analysis. Version 2. 44-1.1. <https://github.com/therneau/survival>.
- Toth, A.L., Kantarovich, S., Meisel, A.F., Robinson, G.E. (2005). Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *The Journal of Experimental Biology*, 208, 4641-4649.
- Toth, A.M., Robinson, G.E. (2005). Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*, 69, 427-435.
- Tritschler, M., Vollmann, J.J., Yañez, O., Chejanovsky, N., Crailsheim, K., Neumann, P. (2017). Protein nutrition governs within-host race of honey bee pathogens. *Scientific Reports*, 7, 1-11.

- Tsakas, S., Marmaras, V.J. (2010). Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7, 228-238.
- Tsuruda, J.M., Amdam, G.V., Page, R.E. (2008). Sensory response system of social behavior tied to female reproductive traits. *PLoS ONE*, 3, e3397.
- Tzou, P., De Gregorio, E., Lemaitre, B. (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 102-110.
- Urbietta-Magro, A., Higes, M., Meana, A., Barrios, L., Martín-Hernández, R. (2019). Age and method of inoculation influence the infection of worker honey bees (*Apis mellifera*) by *Nosema ceranae*. *Insects*, 10, 417.
- van der Steen, J. (2007). Effect of a home-made pollen substitute on honey bee colony development. *Journal of Apicultural Research*, 46, 114-119.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T.C., (2012). Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, 7, e33188.
- Vass, E., Nappi, A.J. (1998). The effects of dietary yeast on the cellular immune response of *Drosophila melanogaster* against the larval parasitoid, *Leptopilina boulardi*. *The Journal of Parasitology*, 84, 870-872.
- Vaudo, A.D., Tooker, J.F., Grozinger, C.M., Patch, H.M. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 133-141.
- Venables, W.N., Ripley, B.D. (2002). Modern applied statistics with S. Fourth Edition. New York: Springer. 495 p.
- Villegas-Plazas, M., Figueroa-Ramírez, J., Portillo, C., Monserrate, P., Tibata, V., Sánchez, O.A., Junca, H., (2018). Yeast and bacterial composition in pot-pollen recovered from Meliponini in Colombia: Prospects for a promising biological resource, in: Vit, P., Pedro, S.R.R., Roubik, D.W. (Eds), Pot-pollen in stingless bees melittology. Elsevier, New York, USA. pp. 263-279.

- 
- Wan, J., Zhou, X., Zhou, X. (2013). A review of innate immunity of silkworm, *Bombyx mori*. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 2319-2325.
- Wilkinson, T.L., Ishikawa, H. (2001). On the functional significance of symbiotic microorganisms in the Homoptera: a comparative study of *Acyrtosiphon pisum* and *Nilaparvata lugens*. *Physiological Entomology*, 26, 86-93.
- Williams, G.R., Alaux, C., Costa, C., Csaki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D.P., Medrzycki, P., Murray, T.E., Natsopoulou, M.E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R.J., Pernal, S.F., Shutler, D., Tanner, G., van der Steen, J.J.M., Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1-36.
- Williams, G.R., Shutler, D., Burgher-MacLellan, K.L., Rogers, R.E.L. (2014). Infra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS ONE*, 9, e103592.
- Wilson-Rich, N., Dres, S.T., Starks, P.T. (2008). The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 54, 1392-1399.
- Wong, C.M., Wong, K.H., Chen, X.D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 927-938.
- Yang, X., Cox-Foster, D.L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 7470-7475.
- Zheng, H.Q., Lin, Z.G., Huang, S.K., Sohr, A., Wu, L., Chen, Y.P. (2014). Spore loads may not be used alone as a direct indicator of the severity of *Nosema ceranae* infection in honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 107, 2037-2044.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N., Saveliev, A.A., Smith, G.M. (2009). Mixed effects models and extensions in ecology with R. New York: Springer. 574 p.



---

**ANEXOS****Anexo 1.** Nucleotide sequences of the studied strains in Canché-Collí *et al.*, 2021

Strain CICY-RN-358: *Starmarella bombycolina* (437bp, 358, B) D1/D2 LSU rDNA gene partial sequence. Strain isolated from stored honey in the nest of *Scaptotrigona pectoralis* (Apidae). Accession number of GenBank: MW267941

```
CTTAGGTCCTCGCGCCCGAGTGGGAGTATGCACTGTAGCTATAACACTCCGAAGAGC
CACATTCTACAGCTTTTATCCTCCCCTCAGACACGGCTCTACGTGGTTAGCGGCCTAC
CCTTCCATTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCT
TTCCTTACAGTACTTGTTTCGCTATCGGTCTCTCGCAGATATTTAGCTTTAGATGGAG
CATACCACCCATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACACTCGACTCCACGCCAAGATTCTAC
AATGAGGTCAGTACCGTACGGGGCTATCACCCCTCCTTGCGCTCCTTTCCAGAAGAC
TTAGGTACCGGTTCTCAGAATCAAGGCTTCAGAATACAATGCCCCGAGAGGCTTTCA
AATCTGAGCTTTTGCCTGTTCACTCGCCGTTACT
```

Strain CICY-RN-386: *Starmarella etchellsii* (393bp, 386, C) D1/D2 LSU rDNA gene partial sequence. Strain isolated from food deposited in brood cell in the nest of *Scaptotrigona pectoralis* (Apidae). Accession number of GenBank: MW267942

```
CTTCAGCTTTTGTCTTCCCCCAAACACGGCTCTACATTGTTAGCGGCATATCCTTCC
ATTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCTT
CACAGTACTTGTTTCGCTATCGGTCTCTCACAGATATTTAGCTTTAGATGGAGCATAACC
ACCCTTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACACTCGACTCCACGTCAGAATCCTACAATGAG
TGAGGTGTCGTACGGGGCTATCACCCCTCCATGGCGCTCCTTTCCAGAAGACTTAAAC
ACCGATACTCAGGAAACTGACTTCAGAATACAATGCCAAAAGGCTTTCAAATCTG
AGCTCTTGCCTGTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTT
```

Strain CICY-RN-413: *Starmerella bombicola* 2 (388bp, 413, D) D1/D2 LSU rDNA gene partial sequence. Strain isolated from stored pollen in the nest of *Scaptotrigona pectoralis* (Apidae). Accession number of GenBank: MW267943

TCAGATTTGAAAGCCTCTCGGGGCATTGTATTCTGAAGCCTTGATTCTGAGAACCGG  
TACCTAAGTCTTCTGGAAAGGAGCGCCAAGGAGGGTGATAGCCCCGTACGGTACTG  
ACCTCATTGTAGAATCTTGGCGTGGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGG  
GTGGTATGCTCCATCTAAAGCTAAATATCTGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC  
TGTGAAGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATT  
GTTGAAATGGAAGGGTAGGCCGCTAACCACGTAGAGCCGTGTCTGAGGGGAGGATA  
AAAGCTGTAGAATGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCTACAGTGCATACTCC

Strain CICY-RN-443: *Zygosaccharomyces mellis* (542bp, 443, E) D1/D2 LSU rDNA gene partial sequence. Strain isolated from stored honey in the nest of *Scaptotrigona pectoralis* (Apidae). Accession number of GenBank: MW267944

TTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCATTCCG  
TGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGAGCGATTCTGGGGCTGGCGCTTGCCTATGTTCCCT  
TGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGTGAGGCGAGATGTACCAGTTCTT  
TGTAGAGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGAGGGTGGT  
AAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGA  
TGGAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGGACGTGAAATTGTTGA  
AAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCGCTCCTCGTGGGTGG  
GGGAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGAGAAAGCCTCG  
GGAATGTGACTCTTGCCTTTTTGGCGGGGGTGTATAGCCCGAGGGGAATACTGCCA  
GCCGGGACTGAGGTATGCGACTCTCGTAGTCAAGGA

Strain CICY-RN-Sac2: *Saccharomyces cerevisiae* (519bp, Sac2\_ brewing strain, F) D1/D2 LSU rDNA gene partial sequence. Strain obtained from research collaborators. Accession number of GenBank: MW267945

---

CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAG  
TTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTTCCTTGTCTATGTTTCCTTGGAACAG  
GACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG  
CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATC  
TAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATG  
AAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGG  
CATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC  
ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTT  
GCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCG  
ACGTAAGTCAA

## Anexo 2.

**Table.** Oligonucleotides information for RT-qPCR assays. Gene name, gene identity (Accession number in NCBI-GenBank.), oligonucleotide sequence (Forward and Reverse), Fragment size in base pairs (bp), optimal temperature in °C and study reference. Primers developed in our lab were built with the program Primer Express™ Software v3.0.1.

Gene name	Accession no. (GenBank)	Sequence	Fragment size (bp)	Tm (°C)	Reference
Ribosomal Protein S5 ( <i>RPS5</i> ) (Reference gene)	XM_006570237.2	Fw: 5'-AATTATTTGGTCGCTGGAATTG-3' Rv: 3'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA-5'	115	56 to 62	Evans (2006)
<i>glucose oxidase (GOx)</i>	AB022907.1	Fw: 5'-GAGCGAGGTTTCGAATTGGA-3' Rv: 3'-GTCGTTCCCCGAGATTCTT-5'	201	59	Yang and Cox-Foster (2005)
<i>prophenoloxidase (proPO)</i>	AY242387.2	Fw: 5'-GAACGGCTATGTAATCGTCTTGGA-3' Rv: 3'-TACCGCTGGGTCGAAATGG-5'	130	58	Developed in this work
<i>vitellogenin (Vg)</i>	NM_001011578.1	Fw: 5'-GTTGGAGAGCAACATGCAGA-3' Rv: 3'-TCGATCCATTCTTGATGGT-5'	150	58	Tsuruda <i>et al.</i> (2008)
<i>Nosema apis (N. apis)</i>	U97150.1	Fw: 5'-TGAGGGAGGTCAGGCATGAT-3' Rv: 3'-AGGCCTTGCTTGTAGGAGAAAA-5'	208	60	Developed in this work
<i>Nosema ceranae (N. ceranae)</i>	KF607066.1	Fw: 5'-CGGATAAAAGAGTCCGTTACC-3' Rv: 3'-TGAGCAGGGTTCTAGGGA-5'	250	61	Chen <i>et al.</i> (2008)