

Una aproximación a la epidemiología de *Nosema ceranae* y su
rol potencial en la despoblación de colonias de abejas *Apis mellifera*

Lic. María Belén Branchiccela
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
PEDECIBA
Área Biología, Subárea Microbiología

Tutor: Dra. Karina Antúnez
Co-tutor: Dr. Pablo Zunino
Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tribunal: Dra. Susana Castro, Dra. Claudia Piccini y Dr. Ciro Invernizzi

Montevideo, 2014.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Pablo por guiarme en todo este proceso y fomentar el trabajo de calidad, con dedicación y humildad.

A Karina! Por ser la persona que es. Porque no solo cumple como pocos su rol como orientadora sino también como compañera, con mucha sensibilidad y humanidad. Por apoyarme y motivarme en todo. Por el aguante en momentos de crisis y por compartir muchos momentos de felicidad. Y por permitirme hacer tres de las cosas que mas disfruto en esta vida: ciencia, abejas y viajar!

Al tribunal: Susana Castro, Claudia Piccini y Ciro Invernizzi. Por todos los aportes a esta tesis que sin duda la enriquecieron notoriamente y por generar ese ambiente de distensión en la defensa que me permitió disfrutar cada momento.

A la ANII, por la financiación de la beca de maestría y el Fondo Clemente Estable cuyos fondos se destinaron a este trabajo y a PEDECIBA, por la financiación de la pasantía en España.

Al Dr. Mariano Higes y la Dra. Raquel Martín-Hernández del Laboratorio de Patología Apícola del Centro Agrario Regional de Mrachamalo. Por abrirme las puertas de su laboratorio. Mostrarme otra forma de hacer ciencia y permitirme vivir nuevas experiencias. A Tere, Virginia y Cris, por las ayudas con las infecciones, su buena onda y tratar que me tomara con humor algunos resultados.

A Ivanna Tomasco, por su ayuda con las filogenias.

A Estela Santos, por sentarse a mirar al microscopio conmigo abeja por abeja y sacarme todas las dudas.

A los investigadores que nos enviaron muestras: Dejair Messaje, Erika Texeira, Estela Santos, Mariano Higes, Jessica Martínez, Marina Basualdo, Martín Porrini, Martha Rodríguez y Yamandú Mendoza.

A la sección Apicultura de INIA La Estanzuela: a Yamandú Mendoza, Gustavo Ramallo, Cecilia Chambón y Sebastián Díaz, por estar siempre a nuestra disposición con buena energía.

A las abejitas: Matilde, Daniela y Loreley y a toda la colonia: Anita, Gaby, Germán, Martín, Martina, Paola, Paula, Sofi A., Sofi F. y Victoria, por su apoyo y largas horas compartidas en el laboratorio.

A mis amigas, en especial a la Pety, Ceci, Pao, Lau y Flor. Algunas entendiendo algo y otras preguntando: "pero Bel...no entiendo nada, vos no defendiste ya???", pero que siempre estuvieron pendientes y supieron festejar y compartir alegrías de algunos resultados sin saber bien porqué estábamos festejando!!!!!!!!!!

A mi familia, en especial al abuelo, que no hubo oportunidad que me viera y me preguntara como iban los experimentos y se inflara debido a su nieta cada vez que alguien le preguntaba por mí.

A mis padres Beatriz y Daniel y a Nacho, porque todo lo que soy es gracias a ellos, por su apoyo incondicional y siempre estar ahí.

Y a Dieguito...por todo.

Gracias!!!

INDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1. Importancia de la apicultura	6
2.2. La apicultura en Uruguay	7
2.3. Pérdida de colmenas	9
2.4. Nosemosis	12
2.4.1. Características generales de los microsporidios.....	12
2.4.2. Genética de <i>Nosema ceranae</i>	14
2.4.3. Ciclo infectivo de <i>Nosema ceranae</i>	15
2.4.4. Efectos de la enfermedad	17
2.4.5. Control de la enfermedad	18
2.4.6. Epidemiología y diversidad genética de <i>N. ceranae</i>	18
2.4.7. <i>Nosema ceranae</i> en Uruguay	20
2.5. Respuesta inmune de la abeja <i>Apis mellifera</i>	21
2.5.1. Inmunidad social.....	21
2.5.2. Inmunidad individual	22
3. Hipótesis de trabajo.....	24
4. Objetivos	24
4.1. Objetivo general.....	24
4.2. Objetivos específicos	24
5. CAPÍTULO 1: Variabilidad genética de <i>N. ceranae</i>	25
5.1. INTRODUCCIÓN	25
5.1.1. DGGE	26
5.1.2. ISSR	27
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.2.1. Muestras de <i>Nosema ceranae</i>	28
5.2.2. Procesamiento de abejas	28
5.2.3. Purificación de esporas de <i>Nosema</i> spp.	28
5.2.4. Extracción de ADN	29
5.2.5. Discriminación entre <i>Nosema ceranae</i> y <i>Nosema apis</i>	29
5.2.6. Puesta a punto de la técnica Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE).....	30
5.2.7. Puesta a punto de la técnica de Análisis de Inter Regiones de Repeticiones Simples (ISSR).....	32
5.2.8. Análisis de diversidad genética de <i>Nosema ceranae</i>	34
5.3. RESULTADOS.....	36

5.3.1. Colección de muestras de <i>Nosema ceranae</i>	36
5.3.2. Puesta a punto de DGGE	38
5.3.3. Puesta a punto de ISSR	40
5.3.4. Diversidad genética de <i>N. ceranae</i>	42
5.4. DISCUSIÓN	46
6. CAPÍTULO 2: Virulencia de variantes de <i>N. ceranae</i> de origen español y uruguayo en la abeja <i>A. mellifera iberiensis</i>	50
6.1. INTRODUCCIÓN	50
6.1.1. PCR en tiempo real	51
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	53
6.2.1. Muestras de <i>Nosema ceranae</i>	53
6.2.2. Cuantificación de esporas.....	53
6.2.3. Viabilidad de esporas	54
6.2.4. Extracción de ADN de <i>N. ceranae</i>	54
6.2.5. Abejas a emplear en los ensayos de infección.....	55
6.2.6. Ensayos de infección de abejas <i>Apis mellifera</i> con <i>Nosema ceranae</i>	58
6.2.7. Mortalidad de las abejas infectadas.....	59
6.2.8. Nivel de infección de las abejas infectadas	59
6.2.9. Evaluación de la respuesta inmune de la abeja frente a la infección con <i>N. ceranae</i>	60
6.2.9.1. Extracción de ARNm y obtención de ADNc.....	60
6.2.9.2. PCR en tiempo real	60
6.2.10. Análisis estadísticos	63
6.3. RESULTADOS.....	64
6.3.1. Muestras de <i>Nosema ceranae</i> a emplear en los ensayos de infección	64
6.3.2. Estado sanitario de las abejas empleadas en los ensayos de infección	67
6.3.3. Mortalidad de las abejas infectadas.....	68
6.3.4. Nivel de infección de las abejas infectadas	69
6.3.5. Respuesta inmune de la abeja frente a la infección con <i>Nosema ceranae</i>	70
6.4. DISCUSIÓN	77
7. CONSIDERACIONES FINALES	81
8. CONCLUSIONES.....	84
9. PERSPECTIVAS	85
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
11. ANEXO 1.....	99
12. ANEXO 2.....	106

1. RESUMEN

Durante los últimos años se ha reportado principalmente en países del hemisferio norte pérdidas de colmenas con valores superiores a los normales. Se ha propuesto que distintos factores podrían estar involucrados en dicho fenómeno, planteándose que *Nosema ceranae* podría ser el responsable de las pérdidas de colmenas en España. Sin embargo, este microsporidio se encuentra en Uruguay desde antes de 1990 y no ha habido pérdidas de colmenas como las reportadas en España. La hipótesis del presente trabajo plantea que existen distintas variantes de *N. ceranae* circulando en diferentes países las cuales tienen virulencia diferencial. Teniendo en cuenta dicha hipótesis se planteó como objetivo general analizar la diversidad genética de *N. ceranae* y evaluar la virulencia de dos variantes del microsporidio..

Con el objetivo de identificar las distintas variantes del microsporidio circulando se llevó a cabo un estudio de diversidad genética para lo cual se pusieron a punto las técnicas de DGGE e ISSR empleando cuatro muestras de abejas naturalmente infectadas con *N. ceranae* provenientes de distintos países. Se escogió la técnica de ISSR para los análisis de diversidad genética, ya que fue la única que permitió observar patrones de amplificación diferenciales entre las cuatro muestras empleadas. Por otro lado, se conformó una colección de 74 muestras de abejas naturalmente infectadas únicamente con *N. ceranae* proveniente de 13 países. Dichas muestras se procesaron, se purificaron las esporas de *N. ceranae*, se extrajo el ADN y se analizaron mediante ISSR. Dichos análisis permitieron identificar la existencia de tres grupos: un grupo A conformado solamente por muestras de origen europeo y caracterizado por un patrón de amplificación en común con baja diversidad genética y dos grupos B y C con diversidad genética alta y conformados por muestras provenientes de países de Europa y América del Sur. Un aspecto interesante fue que ninguna de las 12 muestras españolas utilizadas en este estudio se incluyó en el grupo A, lo cual podría explicar las diferencias en cuanto a las consecuencias de la infección con *N. ceranae* en la abeja reportadas en España y en países vecinos.

Por otro lado, con el objetivo de evaluar la existencia de distintas variantes de *N. ceranae* con diferente virulencia se llevaron a cabo ensayos de infección de la abeja española *A. mellifera iberiensis* con *N. ceranae* proveniente de España y Uruguay, variantes diferentes genéticamente. Se conformaron tres grupos de abejas: un grupo se infectó individualmente con *N. ceranae* de origen español, otro grupo con *N. ceranae* de origen uruguayo y el tercer grupo se mantuvo como control. Dentro de cada tratamiento se evaluó la mortalidad diaria de las abejas, su nivel de infección al día diez post infección y su respuesta inmune al día siete post infección, para lo cual las abejas se sacrificaron, se extrajo el ARN, se retrotranscribió y se analizó la expresión de la vitelogenina y de ocho genes vinculados a la inmunidad humoral y celular mediante PCR en tiempo real. Todas las abejas sobrevivieron como máximo 15 días post infección y no se observaron diferencias en la mortalidad de las abejas pertenecientes a los tres tratamientos. Sin embargo, las abejas infectadas con *N. ceranae* de origen español mostraron mayores niveles de infección que las abejas infectadas con la variante de origen uruguayo, variante capaz de suprimir en mayor medida la respuesta inmune de la abeja. Por lo tanto, se cumplió la hipótesis planteada y si bien la mortalidad de las abejas infectadas con ambas variantes de *N. ceranae* fue la misma a pesar de presentar diferente virulencia, posiblemente a nivel de campo la infección con estas variantes tenga distintas consecuencias.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Importancia de la apicultura

La abeja *Apis mellifera* posee un rol clave a nivel del ecosistema, ya que es el principal organismo polinizador (Mc Gregor, 1976). Dicha actividad ha co-evolucionado con las plantas, hasta el punto en que ciertos cultivos dependen en gran medida de la abeja melífera para poder reproducirse y otros en los cuales la contribución de este organismo es notoria. Además, gracias a la polinización, la calidad de muchos cultivos mejora, como es el caso de los manzanos, frutillas, arándanos y pepinos, entre otros (Morse y Calderone, 2000).

El valor económico de la actividad de polinización por la abeja *A. mellifera* en Uruguay ha sido estimado en 80 millones de dólares anuales (considerando los cultivos de manzana, girasol, pera, durazno, tomate, zapallo kabutiá, zapallitos, ciruelo, membrillo, otros zapallos y frutilla) (Santos *et al.*, 2009), mientras que en Estados Unidos su valor se ha estimado en 14,5 billones de dólares (Morse y Calderone, 2000).

Por otro lado, la importancia de las abejas *A. mellifera* radica también en los productos que es posible obtener de las colmenas, entre los cuales se encuentra la miel, polen, propóleos, jalea real, cera, y apitoxina, siendo los tres primeros los de mayor importancia económica.

La miel es obtenida por evaporación del néctar que las abejas colectan de las flores y el 95% de su materia seca son carbohidratos (glucosa y fructosa) por lo que es empleada por la colmena como la principal fuente de dichos compuestos. Es el producto mayormente explotado en varios países, siendo China el mayor productor de miel a nivel mundial en 2011 (FAO, 2014). A nivel humano es consumida como endulzante natural y por sus propiedades antimicrobianas, antivirales, antiparasitarias, por sus efectos antioxidantes, actividad anti-mutagénica, anti-tumoral y anti-inflamatoria (Bogdanov *et al.*, 2008; Viuda-Martos *et al.*, 2008). Otro de los compuestos que posee actividad antimicrobiana es el propóleos, el cual es obtenido por la abeja a partir de la colecta y procesamiento de la resina de las plantas y es empleado como sellador de la colmena y en actividades de aseo (Simone - Finstrom y Spivak, 2010). Sus propiedades antimicrobianas han sido probadas tanto a nivel de patógenos de las abejas (Bastos *et al.*, 2007; Antúnez *et al.*, 2008) como de humanos (Gebara *et al.*, 2002; Stepanovic *et al.*, 2003; Uzel *et al.*, 2005), constituyendo uno de los principales productos empleados en tratamientos apiterapéuticos junto con la apitoxina (veneno de la abeja).

Por otro lado, el polen es la principal fuente de proteínas y vitaminas de la colmena y está fuertemente vinculado a la producción de jalea real (secreción de la abeja para alimentar a las crías), ya que mejora su calidad. El hombre lo utiliza usualmente a modo de suplemento alimenticio (Campos *et al.*, 2008).

2.2. La apicultura en Uruguay

La apicultura en Uruguay comenzó a desarrollarse luego que Bernardino Rivadavia ingresara la primer colmena a nuestro país hacia la década de 1830' y rápidamente dicha actividad se extendió por todo el territorio nacional (Cordara, 2005). Si bien esta primera colmena fue de origen europeo (*Apis mellifera mellifera*), hoy en día existe en Uruguay una abeja criolla, híbrida entre abejas europeas (*A. m. mellifera*, *Apis mellifera ligustica* y *Apis mellifera carnica*) y africanas (*Apis mellifera scutellata*). Las abejas *A. m. ligustica* y *A. m. carnica* fueron ingresadas al país por sus características comportamentales y productivas respondiendo a necesidades del sector, mientras que las abejas de origen africano ingresaron naturalmente. Este último proceso comenzó luego que en 1956 un grupo de investigadores brasileros importaran a dicho país (a la región de Rio Claro, San Pablo) abejas africanas con el fin de obtener un organismo mejor adaptado a sus condiciones ambientales y consecuentemente mejorar la producción apícola nacional (Kerr, 1957). Algunas reinas escaparon y comenzaron a hibridarse con las abejas europeas presentes en el continente hasta ese momento, proceso denominado africanización (Smith, 1991). Desde entonces, este proceso se ha extendido por todo el continente (a excepción de Chile debido a su aislamiento geográfico), desde California (Estados Unidos) hacia los departamentos de Uruguay y provincias de Argentina ubicados a 35 y 40 ° latitud sur (Kim y Oguro 1999; Sheppard *et al.*, 1999; Abrahamovich *et al.*, 2007). En nuestro país si bien se ha reportado un gradiente de africanización caracterizado por una mayor prevalencia de abejas africanizadas hacia el norte y una disminución progresiva hacia el sur (Burguett *et al.*, 1995; Diniz *et al.*, 2003), estudios recientes plantean que la situación ha cambiado y el completo proceso de africanización estaría limitado por la introducción artificial de abejas europeas en la zona oeste del país (Branchiccela *et al.*, 2014). La abeja africanizada posee características propias a nivel de comportamiento y producción, por lo que el ingreso de dichas abejas al país ha significado un cambio en el modo de explotación del recurso (empleo de indumentaria para la protección, modo de trabajo, etc).

Según datos aportados por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay cuenta actualmente con 3165 apicultores con 568.312 colmenas registradas en el Registro Nacional de Propietarios de Colmenas, siendo Rivera, Soriano y Paysandú los departamentos con mayor

número de colmenas (MGAP, 2013). La producción apícola nacional se basa en la producción de miel, la cual es exportada en un 95 % siendo la Unión Europea y Estados Unidos los principales compradores (MGAP, 2013). Las divisas generadas en el país por concepto de las exportaciones de miel alcanzaron los 31 millones de dólares en 2012 (Uruguay XXI).

Durante los últimos años se ha observado que el número de apicultores ha disminuido y los mismos poseen cada vez mas colmenas, posiblemente como forma de mantener cierta rentabilidad frente a las fluctuaciones en relación a los kilos de miel producidos por colmena (MGAP, 2013).

La trashumancia es una alternativa para optimizar los beneficios económicos asociados a la actividad apícola y en Uruguay constituye una práctica en desarrollo. Se trata del traslado de las colmenas hacia ciertas plantaciones con el fin de aprovechar sus floraciones. En el caso de nuestro país, muchos apicultores trasladan sus colmenas en marzo hacia las floraciones de *Eucalyptus grandis* localizadas en departamentos del norte (Actualidad Apícola, 2013).

Por otro lado, el servicio de polinización es una actividad poco desarrollada en nuestro país, limitándose a ciertos cultivos (Palomino, comunicación personal).

2.3. Pérdida de colmenas

Durante el invierno de 2006 y en los años siguientes, diferentes países principalmente del hemisferio norte han reportado pérdidas de colmenas que ascendieron hasta el 85% en algunos casos, valores muy superiores a las pérdidas invernales normales (5 – 10%). Dicho fenómeno se denomina despoblación o pérdida de colmenas (“*Colony losses*”) (Fig. 1) y se ha planteado que distintas causas podrían ser las desencadenantes del mismo (Cox-Foster *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2008; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Neumann y Carreck, 2010).

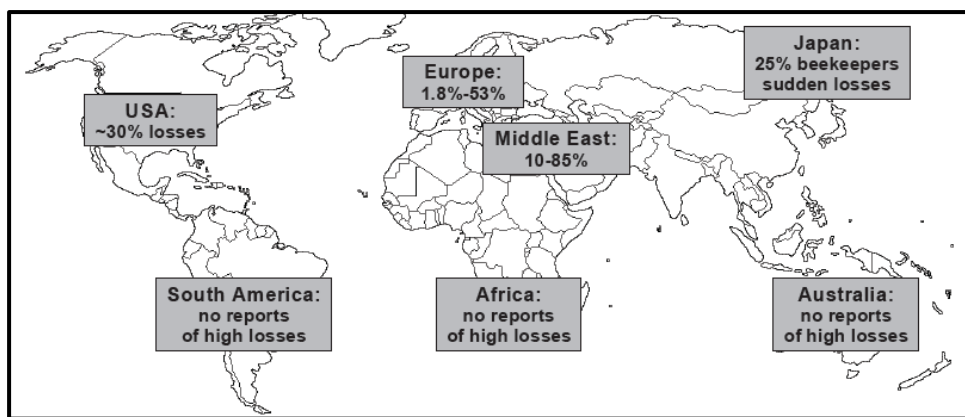


Figura 1. Porcentaje de pérdidas de colmenas en distintas regiones del mundo. Tomado de Neumann y Carreck, 2010.

Se ha planteado que una de las posibles causas podría ser el ácaro *Varroa destructor*, ya que es el principal organismo que afecta a la abeja *A. mellifera* a nivel mundial (Neumann y Carreck, 2010). Se trata de un ectoparásito capaz de infectar tanto a la abeja adulta como a la cría al succionar la hemolinfa, debilitando de esta forma al organismo y causando la enfermedad conocida como varroosis. A nivel colonial la gravedad de la enfermedad depende del nivel de infección, causando comúnmente la muerte de la colmena (Rosenkranz *et al.*, 2010). Su importancia no solo radica en el daño que es capaz de causar por sí mismo, sino también por su asociación con otros patógenos, ya que actúa a modo de vector de ciertos virus (Rosenkranz *et al.*, 2010). Las abejas son blanco de alrededor de 18 virus, siendo el virus de la Celda Real Negra (BQCV), el virus de la Parálisis Crónica (CBPV), el virus Kashmir (KBV), el virus de la Parálisis Israelí (IAPV), el virus de la Parálisis Aguda (ABPV), el Virus de las Alas Deformadas (DWV) y el virus de la Cría en Sacada (SBV) los de mayor relevancia apícola. Estos últimos tres han sido asociados con *V. destructor* (Tentcheva *et al.*, 2004; Yue y Genersch, 2005). Todos estos virus son de tipo ARN y en su mayoría causan infecciones asintomáticas. Por tal motivo, han sido vinculados a las pérdidas de colmenas en aquellos casos en los que la muerte de las mismas se

ha dado de forma rápida y sin síntomas aparentes (Chen y Siede, 2007; Oldroy, 2007; Miranda y Genersch, 2009).

En Estados Unidos, se propuso al IAPV como marcador significativo de CCD o “*Colony Collapse Disorder*”, síndrome caracterizado por la ausencia de abejas adultas en la colmena. Colmenas con este síndrome presentan reservas de alimento y cría y en ocasiones se encuentra a la reina rodeada por un pequeño número de abejas obreras (Cox–Foster *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2008; vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Sin embargo, la asociación entre el IAPV y el CCD no pudo ser corroborada en un estudio posterior y estudios llevados a cabo en España y Francia tampoco encontraron una correlación entre el IAPV y las pérdidas de colmenas en ambos países (Blanchard *et al.*, 2008; Garrido-Bailón *et al.*, 2010).

Otro de los factores que afectan la abeja melífera son los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae* los cuales ocasionan la enfermedad conocida como nosemosis. Originalmente, *N. apis* infectaba la abeja europea *A. mellifera* y *N. ceranae* la abeja asiática *Apis ceranae* (Fries *et al.*, 1996). Sin embargo, en el 2006 fue reportada por primera vez la presencia de *N. ceranae* en abejas *A. mellifera* naturalmente infectadas, proponiéndose que dicho salto de hospedero podría tener consecuencias graves a nivel de la abeja melífera occidental (Higes *et al.*, 2006a; Higes *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009). Posteriormente, la presencia de *N. ceranae* fue reportada en todo el mundo, planteándose un posible reemplazo de *N. apis* por *N. ceranae* (Klee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Martín–Hernández *et al.*, 2011). Estudios llevados a cabo por investigadores españoles en colmenas a punto de colapsar en apiarios profesionales detectaron altos niveles de infección con *N. ceranae* y demostraron que dicho patógeno es capaz de desencadenar el colapso masivo de colmenas, proponiéndolo como el factor principal de la despoblación de colmenas en España (Fig. 2) (Higes *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009).



Figura 2. Colmenas colapsadas en España debido a *N. ceranae*. Tomado de Higes *et al.*, 2013.

Por otro lado, además de la presencia de distintos patógenos, las colmenas pueden verse afectadas por otros factores de estrés como la presencia de pesticidas. Se ha detectado gran diversidad de pesticidas tanto de origen agrícola como apícola, contaminando la cera, las abejas y el polen (Chauzat *et al.*, 2006; Mullin *et al.*, 2010). Estos compuestos producen en la abeja alteraciones a nivel fisiológico e inmunológico (Johnson *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2013) y pueden interactuar sinérgicamente con distintos patógenos (Pettis *et al.*, 2013; Doublet *et al.*, 2014). Este hecho determinó que en el 2013 se prohibiera el uso de imidacloprid, clothianidin y thiamethoxam en la Unión Europea como medida preventiva a las pérdidas de colmenas.

Los aspectos nutricionales también jugarían un rol importante en las pérdidas de colmenas ya que se ha propuesto que la pérdida de biodiversidad con la consecuente pérdida de recursos alimenticios podría ocasionar déficit nutricional, lo cual podría estar involucrado en este fenómeno (Naug, 2009). Dicha pérdida de diversidad de hábitat ha aumentado notoriamente y un ejemplo claro en nuestro país es el aumento de hectáreas de tierra destinadas a cultivos de soja y plantaciones de *Eucalyptus* spp. (MGAP, 2013).

En el caso particular de Uruguay, si bien no ha ocurrido muerte masiva de colmenas como las reportadas en países del hemisferio norte, se han reportado episodios puntuales, en su mayoría asociados a la infección con *V. destructor*. Teniendo en cuenta que muchos de los patógenos potencialmente involucrados en los fenómenos de despoblación de colmenas se encuentran presentes en nuestro país con altas prevalencias y niveles de infección, existe preocupación en relación al posible rol de los mismos en las pérdidas de colmenas (Antúnez *et al.*, 2005; Antúnez *et al.*, 2006; Invernizzi *et al.*, 2009; Anido, 2013). Con el objetivo de evaluar las causas de la despoblación de colmenas en nuestro país, se realizó un monitoreo estacional de 40 colmenas provenientes de dos apiarios localizados en Colonia y San José durante 2009 y 2010. Dichos apiarios tenían antecedentes de pérdida de colmenas con valores superiores a los esperados en años anteriores. Se analizó la presencia y nivel de infección de diferentes patógenos potencialmente involucrados en las pérdidas de colmenas así como también los niveles de proteínas totales en abejas, contaminación con pesticidas y diversidad de polen. Durante el período de análisis, el 16,5% de las colmenas murieron (el 27% de éstas murieron sin causas aparentes). Los niveles de infección con *V. destructor* en otoño y con *N. ceranae* en primavera así como la baja diversidad de polen estuvieron involucrados en dichas pérdidas (Antúnez *et al.*, 2013a).

Por último, si bien se ha vinculado las pérdidas de colmenas con factores individuales como los mencionados anteriormente, se ha propuesto que podría tratarse de un fenómeno multifactorial en el que el mal e incrementado uso de pesticidas, desnutrición, el manejo de las colmenas y la interacción con y entre los distintos patógenos podrían jugar un papel crucial (Oldroyd, 2007).

Los antecedentes previamente expuestos brindan una idea general de las características de un fenómeno masivo con graves consecuencias tanto para el sector apícola como a nivel agrícola. Sin embargo, si bien existe una amplia variedad de estudios abordando esta problemática, la multiplicidad de factores potencialmente involucrados dificultan arribar a un consenso en relación al tema y consecuentemente en la búsqueda de medidas paliativas para dicho fenómeno.

2.4. Nosemosis

2.4.1. Características generales de los microsporidios

Los microsporidios son microorganismos eucariotas intracelulares obligados, capaces de infectar un amplio rango de hospederos y de los cuales se conoce muy poco hasta el momento (Keeling y Fast, 2002).

Su filogenia ha sido muy debatida, ya que debido a que no poseen organelos como mitocondrias y aparato de Golgi y su ARN ribosomal posee las características del correspondiente al de procariontes, fueron originalmente asociados con antecesores muy antiguos de los eucariotas, previos al proceso de endosimbiosis (Vossbrinck *et al.*, 1987). Sin embargo, el descubrimiento de una región remanente de las mitocondrias llamado mitosoma, junto con análisis moleculares a nivel de α y β tubulina y finalmente con el análisis de 99 genes codificantes de proteínas de *Encephalitozoon cuniculi* (el primer genoma de microsporidio secuenciado) evidenció una clara asociación de los microsporidios al reino fungi (Keeling y Fast, 2002; Williams *et al.*, 2002; Keeling, 2006; Tsaousis *et al.*, 2008).

Sus características morfológicas se mantienen constantes dentro de los miembros del grupo y sus características genéticas y metabólicas se han reducido notoriamente en concordancia con su estilo de vida (Keeling y Fast, 2002). La espora es la forma infectiva y la única forma viable fuera de la célula hospedera (Keeling, 2006). Posee forma ovalada y su tamaño varía según la especie: la espora de *N. ceranae* posee un tamaño aproximado de 4.7 μm (Huang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009), mientras que la de *N. apis* es de 6 μm (Fries *et al.*, 2013) (Fig. 3).

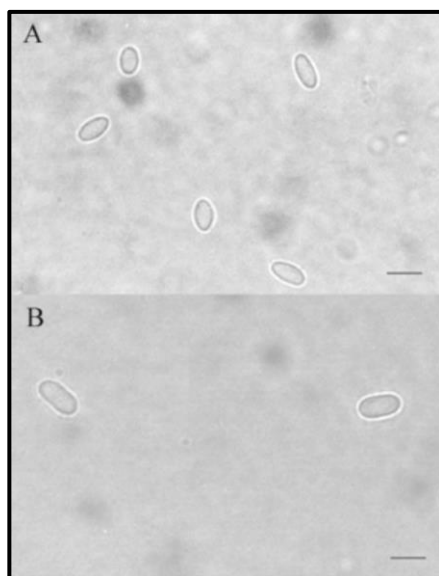


Figura 3. Esporas de *N. ceranae* (A) y *N. apis* (B) mediante visualización en microscopía óptica 400 X.
Barra 5 mm. Tomado de Fries *et al.*, 2010.

La pared de dicha espora está compuesta por una cubierta de quitina y proteínas determinando dos capas: la exospora y la endospora. En el interior de esta cubierta se define el esporoplasma, donde se encuentra el aparato de extrusión llamado túbulo polar. El mismo está formado por una región proximal de anclaje a la espora (mediante el disco de anclaje) y una región distal la cual puede estar rodeando entre 4 y 30 veces la espora dependiendo de la especie (Xu y Weiss, 2005). En el caso particular de *N. ceranae* el número de vueltas del túbulo polar es de entre 18 y 23 (Huang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009), mientras que el de *N. apis* se ha descrito que puede llegar a dar más de 30 vueltas (Fries *et al.*, 1989). Dicha característica junto con la del tamaño, son las que tradicionalmente se empleaban para la identificación de ambos microsporidios (Fries, 1988; Fries *et al.*, 1992; Fries *et al.*, 1996). Se han descrito tres proteínas constituyentes del filamento polar: PTP1, PTP2 y PTP3, de las cuales PTP1 sería el constituyente principal del mismo (Xu y Weiss, 2005). En el esporoplasma, también es posible identificar uno o dos núcleos, dependiendo la especie, siendo *N. ceranae* diplocariónica.

2.4.2. Genética de *Nosema ceranae*

Uno de los aspectos más interesantes acerca de los microsporidios es su genoma. En el caso de *N. ceranae* su genoma fue secuenciado pero aún no ha sido ensamblado, principalmente debido a su alto nivel de variabilidad y la existencia de múltiples regiones solapantes (Comman *et al.*, 2009). Se trata de un genoma sumamente reducido (con un tamaño estimado de 7,86 Mb), comparable con otros genomas de microsporidios secuenciados (Katinka *et al.*, 2001). Dicha reducción puede deberse a su extrema adaptación al parasitismo, reflejada también por su sesgo extremo hacia AT (74 %) (Moran y Wernegreen, 2000; Comman *et al.*, 2009).

Fueron descritos 2614 genes codificantes de proteínas y elementos transponibles comunes de eucariotas, lo cual estaría dando un indicio de los fenómenos de recombinación que podrían ocurrir en su genoma (Comman *et al.*, 2009). De hecho, diversos investigadores han encontrado evidencia de recombinación genética al analizar las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para el ARNr, la subunidad menor de la ARN polimerasa II (RPBII) y el PTP3 (Gomez-Moracho *et al.*, 2014; van der Zee *et al.*, 2014). Esto, sumado a que se ha reportado la existencia de componentes reguladores involucrados en la determinación del sexo y la reproducción sexual en algunas especies de microsporidios, hace proponer la posibilidad de reproducción sexual en *N. ceranae* (Lee *et al.*, 2008; Sagastume *et al.*, 2011; Roudel *et al.*, 2013; Krebes *et al.*, 2014). Dicha posibilidad podría explicar los altos niveles de diversidad genética reportados en el ARNr de *N. ceranae*, en los genes codificantes de las proteínas constituyentes del filamento polar (PTP1, PTP2 y PTP3), de la actina, Hsp70 y RPB1 y podría tener implicancias evolutivas en la relación hospedero-parásito (Gomez-Moracho *et al.*, 2014; van der Zee *et al.*, 2014)

El ARN ribosomal es una de las secuencias que ha sido mayormente empleada en el estudio de *N. ceranae*. Posee una localización telomérica y se encuentra asociado a secuencias repetitivas (Huang *et al.*, 2008; Comman *et al.*, 2009). Su largo es de 3830 pb aproximadamente y posee una disposición única, con la región 5S aguas arriba del gen que codifica para la subunidad menor del ARN ribosomal y en posición reversa (Huang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que dicha secuencia se distribuye al azar entre los genes del genoma de *E. cuniculi*, se ha propuesto que éste también podría ser el caso de *N. ceranae* (Katinka *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2008). La secuencia 5S es seguida de la región intergénica (*igs*), la cual es la más variable, por la que ha sido empleada para la caracterización genética del microsporidio (Huang *et al.*, 2008). Hacia el extremo 3' le sigue la subunidad menor (SSUrRNA), separada de la mayor (LSUrRNA) por el ITS (Fig. 4).

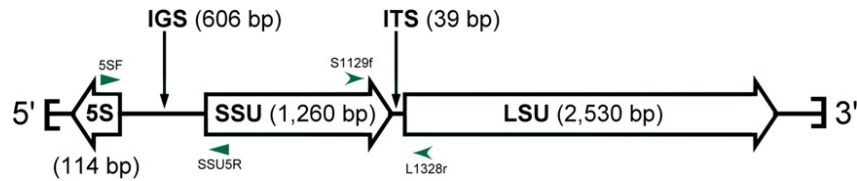


Figura 4. Esquema de la disposición de los genes codificantes del ARNr de *N. ceranae*. Tomado de Huang *et al.*, 2008.

2.4.3. Ciclo infectivo de *Nosema ceranae*

El ciclo infectivo de *N. ceranae* comienza una vez que las esporas acceden al intestino de la abeja como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados o al realizar tareas de limpieza de materia fecal. En el intestino se da el proceso de germinación el cual consiste en cuatro etapas:

- i) activación (los mecanismos involucrados en dicha activación aún no están dilucidados),
- ii) aumento de la presión osmótica de la espora como consecuencia de la entrada de líquido a la misma,
- iii) eversión del filamento polar a través de una ruptura en uno de sus extremos (ápex)
- iv) inserción física del filamento polar en la célula hospedera y consecuente ingreso del esporoplasma a la misma (Xu y Weiss, 2005) (Fig. 5).

Dentro de las células, el ciclo de vida de *N. ceranae* atraviesa distintas fases: meronte, esporogonia, esporonte y espora madura. A medida que atraviesa las distintas etapas, la estructura se va compactando y en el caso particular del meronte, se caracteriza por estar rodeados de abundantes mitocondrias, lo cual estaría indicando que se trata de una etapa de activa producción de componentes del organismo acompañado de la obtención de energía a partir de su hospedero (Higes *et al.*, 2006b).

A diferencia de la infección con *N. apis*, estudios de micoroscopia han evidenciado transferencia horizontal de este microsporidio entre células ventriculares, lo cual estaría sugiriendo un posible efecto incrementado en la patogenicidad de *N. ceranae* con respecto a *N. apis* (Higes *et al.*, 2006b).

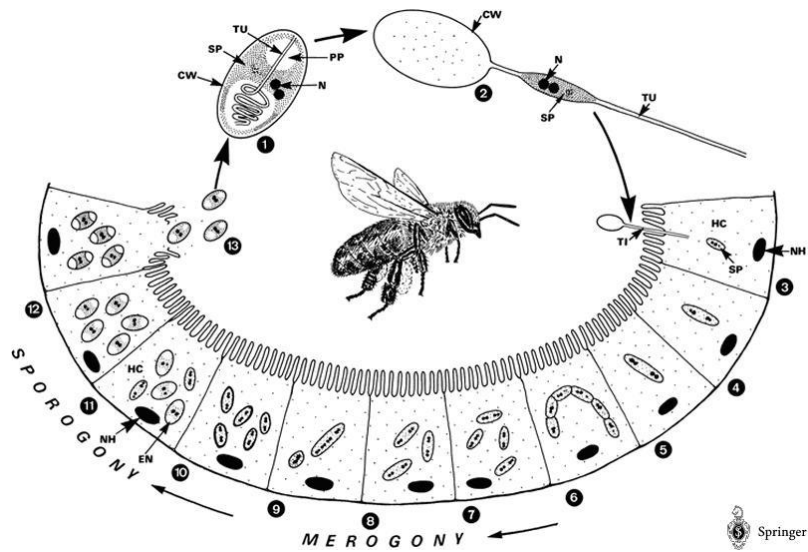


Figura 5. Ciclo infectivo de *Nosema* spp. Una vez que la espora ingresa al intestino vía oral, se da la reversión del filamento polar el cual es inyectado en células intestinales. Posteriormente se da el ingreso a las mismas del esporoplasma con todo el contenido de la espora y comienza allí una etapa de activa multiplicación, pasando por las etapas de meronte, esporonogonia, esporonte y espora madura. Dichas esporas son liberadas debido a lisis celular y reinfectan células vecinas o son eliminadas con las heces constituyendo una fuente de contaminación. CW: pared de la espora. SP: esporoplasma. TU: túbulo polar. N: núcleo. PP: polaroplasto. HC: citoplasma celular. NH: núcleo celular.

2.4.4. Efectos de la enfermedad

Existen diferencias en las características de la enfermedad causada por *N. apis* y *N. ceranae*. La “nosemosis tipo a” es causada por *N. apis*, y sus consecuencias pueden resumirse como presencia de abdomen globoso de la abeja, intestino blanquecino y abejas temblorosas en la entrada de la colmena donde es posible observar manchas de materia fecal debido a que dicha infección causa disentería (Higes *et al.*, 2010).

La “nosemosis tipo c” se produce como consecuencia de la infección por *N. ceranae*. Una vez que el microsporidio comienza a reproducirse en las células intestinales infecta células vecinas, accediendo a distintos órganos. Si bien no ha sido posible observar efectos patológicos en los mismos, estudios moleculares han demostrado que *N. ceranae* es capaz de generar una infección generalizada, colonizando no solo las células epiteliales del intestino sino también los túbulos de Malpighi, cuerpos grasos y glándulas salivales e hipofaríngeas (Chen *et al.*, 2009). Como consecuencia, el intestino de la abeja se presenta con aspecto globoso y blancuzco (Higes *et al.*, 2006b) y debido a su alteración los procesos de absorción de nutrientes se ven modificados. Es así que la abeja sufre estrés energético, ya que se ha visto que el consumo de alimentos en abejas infectadas es significativamente superior que en abejas sanas (Mayac y Naug, 2009; Naug y Gibbs, 2009; Martín–Hernández *et al.*, 2011b). Dichas alteraciones tisulares a nivel intestinal se ven reflejadas también en la expresión de compuestos relacionados a la morfogénesis y reparación tisular y en la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de radicales tóxicos (Dussaubat *et al.*, 2010; Dussaubat *et al.*, 2013; Holt *et al.*, 2013). Además, se ha observado que a diferencia de *N. apis*, *N. ceranae* es capaz de suprimir la expresión de genes involucrados con la respuesta inmune de la abeja, dificultando el control de la infección (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2011). También se han observado alteraciones a nivel hormonal con consecuencias en la maduración prematura de la abeja y acortamiento de la vida media de la misma, ocasionando una disminución progresiva de la población (Dussaubat *et al.*, 2010; Ares *et al.*, 2012). Esta disminución se ve potenciada además por modificaciones en el comportamiento de las abejas, ya que aquellas infectadas con *N. ceranae* demoran más tiempo en regresar a la colmena y lo hacen en menor proporción en comparación con abejas sanas (Kralj y Fuchs, 2010). Además, dicha disminución progresiva de la población de abejas tiene consecuencias a nivel productivo, ya que colmenas infectadas con *N. ceranae* producen significativamente menos miel que aquellas colmenas tratadas (Botías *et al.*, 2013a).

2.4.5. Control de la enfermedad

Para el control de la enfermedad se ha propuesto el uso de fumagilina, antibiótico tradicionalmente empleado para el control de *N. apis* y eficiente para el control de *N. ceranae* (Botías *et al.*, 2013b; Huang *et al.*, 2013). Sin embargo, su residualidad en miel y las restricciones a nivel nacional para su uso solamente a apiarios destinados a la cría de reinas, hacen que el empleo del mismo no sea una herramienta de control accesible para los apicultores. Teniendo en cuenta las consecuencias de la enfermedad, son necesarias herramientas alternativas para el control de la misma y constituyen un potencial campo de investigación a desarrollar.

2.4.6. Epidemiología y diversidad genética de *N. ceranae*

Los estudios epidemiológicos analizan los comportamientos de las enfermedades en cuanto a su distribución en el tiempo y espacio, frecuencia y mecanismos de control (OMS, 2014). Las enfermedades infecciosas se identifican con agentes patógenos, pudiendo existir distintas variantes de los mismos. Estas variantes o aislamientos pueden diferir entre sí a nivel fenotípico, bioquímico y genético y la identificación de los mismos podría explicar brotes de la enfermedad y diferencias en las manifestaciones clínicas (Tenover *et al.*, 1997; Reyes y Zervos, 2010). Por tal motivo, la identificación de dichas variantes es un aspecto fundamental a nivel epidemiológico.

La caracterización fenotípica y metabólica es uno de los primeros pasos a la hora de evaluar distintas variantes y en general implica tener un cultivo puro del microorganismo (Bou *et al.*, 2011). Sin embargo, debido a que muchos de los microorganismos no son cultivables, es necesario emplear otras estrategias metodológicas que no requieran este proceso como pueden ser las herramientas moleculares (Handelsman, 2004).

En este sentido existen técnicas que implican el análisis mediante secuenciación de ciertas regiones del genoma o del genoma completo de los distintos aislamientos. Sin embargo, debido a que muchas veces los altos niveles de variabilidad genética detectados se deben a convergencias evolutivas, eventos de recombinación y transferencia génica entre otros, las asociaciones en base a dichas regiones no son reflejo fiel de sus relaciones filogenéticas (Fitch, 2000). Como alternativa, existen técnicas de tipificación que analizan patrones comunes entre regiones específicas del genoma o genomas completos sin la necesidad de abordar un análisis detallado de secuencia. Ejemplos de esto constituyen las técnicas de rep-PCR, RAPD (*Restriction Amplified Polymorphism DNA*), ribotipificación, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), TGGE (*Temperature*

Gradient Gel Electrophoresis), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), e ISSR (*Intergenic Sequence Simple Repetition*) (Tenover *et al.*, 1997; Muyzer y Smalla, 1998; Bornet y Branchard, 2001; Reyes y Zervos, 2010).

En el caso de *N. ceranae*, dado que se ha reportado que es el causante de la despoblación de colmenas en España mientras que en otros países no se ha podido establecer tal asociación, se ha propuesto que posiblemente existan distintas variantes genéticas del microsporidio circulando las cuales algunas podrían ser más virulentas que otras (Dussaubat *et al.*, 2013; Higes *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2014). Debido a esto, se han llevado a cabo distintos estudios de diversidad genética mediante secuenciación con el fin de identificar dichas variantes de *N. ceranae* (Sagastume *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2013; Roudel *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2014). Sin embargo, debido a la existencia de múltiples copias de muchos de los genes en estudio (principalmente genes codificantes de la SSUrRNA y PTP) y la gran variabilidad genética de las secuencias empleadas en dichos análisis, la diferenciación de estas variantes no ha sido posible.

2.4.7. *Nosema ceranae* en Uruguay

N. ceranae se encuentra presente en Uruguay al menos desde 1990, siendo el microsporidio predominante (Invernizzi *et al.*, 2009; Anido, 2013; Antúnez *et al.*, 2013a).

Su prevalencia a nivel nacional en abejas *A. mellifera* en marzo de 2011 fue estimada en 14,5% (Anido, 2013). Sin embargo, es esperable que esta prevalencia aumente sensiblemente en mayo, ya que muchos de los apicultores trasladan las colmenas en otoño a las plantaciones de *E. grandis* al norte del país. En este ambiente, las colmenas se infectan indefectiblemente con *N. ceranae* y mueren si no son retiradas a tiempo de dichas plantaciones (Invernizzi *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2012). Invernizzi y colaboradores (2011) demostraron que aquellas colmenas con reservas de polen de origen diverso son capaces de sobrellevar la infección en dicho ambiente, mientras que esto no sucede cuando las colmenas son alimentadas exclusivamente con polen de *E. grandis*.

Por otro lado, Mendoza y colaboradores (2013) reportaron que en dichas plantaciones, las abejas africanizadas son capaces de afrontar mejor la infección con *N. ceranae* que las abejas de origen europeo, lo cual plantea un antecedente interesante a la hora de escoger razas para trabajar allí. Estudios de selección bidireccional plantearon que posiblemente el ambiente juegue un rol importante en dicha interacción, ya que luego de dos generaciones de selección no fue posible observar diferencias en cuanto a los niveles de infección con el microsporidio (Mendoza *et al.*, 2013).

Además de infectar las abejas *A. mellifera*, se ha visto que *N. ceranae* está presente en abejorros *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* en Uruguay con una prevalencia mayor al 70%, lo cual sugiere que estos organismos podrían ser un reservorio importante del microsporidio (Arbulo *et al.*, 2013).

En cuanto a las estrategias de tratamiento, se ha evaluado la efectividad del extracto etanólico de propóleos y del Apiherb (producto comercial compuesto por distintas hierbas) para el control de la infección de *N. ceranae* sin resultados exitosos (Mendoza *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013).

2.5. Respuesta inmune de la abeja *Apis mellifera*

2.5.1. Inmunidad social

Las abejas melíferas son organismos sociales. Una de las desventajas de esta vida en sociedad es que resultan blanco de distintos patógenos debido a la enorme capacidad de transmisión entre los integrantes de la colmena. Por tal motivo han desarrollado mecanismos de defensa a nivel individual y colonial (Evans y Spivak, 2009; Wilson-Rich *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista del patógeno, su éxito depende de su capacidad de ingresar a la colmena, establecerse y por último dispersarse, por lo que el estado sanitario de la colmena depende de la capacidad de la misma de evitar que el patógeno experimente estas etapas (Cremer *et al.*, 2007). Por tal motivo, en primer lugar el ingreso de potenciales patógenos está limitado por la presencia de abejas guardianas y la encapsulación de los mismos en cubiertas de propóleos, el cual es también empleado en actividades de limpieza y aseo de la colmena.

Una vez que el patógeno ingresó, se ponen en marcha mecanismos para evitar su establecimiento y diseminación, como el comportamiento higiénico y el “*grooming*” (Cremer *et al.*, 2007). El comportamiento higiénico consiste en la capacidad que tienen las abejas de detectar y remover crías infectadas en las celdas operculadas y resulta efectivo frente a enfermedades como Cría Yesificada y Loque Americana (Invernizzi, 2001; Evans y Spivak, 2009). El *grooming* es la capacidad que tienen las abejas de remover al patógeno de sí mismo (*auto-grooming*) o de sus compañeras (*allogrooming*) y es especialmente efectivo contra el ácaro *V. destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010). Ambos comportamientos son empleados como métodos de evaluación de colmenas candidatas a programas de selección de abejas (Aumeier, 2001; Rosenkranz, *et al.*, 2010).

La remoción de abejas muertas de la colmena, la muerte de las mismas en lugares alejados de la colmena, el cuidado continuo de la reina de modo que la misma no se infecte y de esta forma evitar la transmisión vertical de la enfermedad, constituyen otros de los tantos comportamientos sociales para evitar el contagio de los patógenos (Cremer *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que las abejas podrían agruparse para formar una bola entre sí, aumentando la temperatura interna a niveles en que ciertos enemigos no soportan (fiebre comportamental) (Ono *et al.*, 1995; Starcks *et al.*, 2000)

Por último, las características genéticas de la abeja juegan un rol importante en cuanto a la resistencia y tolerancia a ciertos patógenos (Fontbonne *et al.*, 2013). La reina es la única abeja de la colmena madura sexualmente, apareándose con varios zánganos. De esta forma, la progenie estará formada por distintas subfamilias dependiendo del número de zánganos con los que se

apareó la reina y por lo tanto es posible que aquellas colmenas que tengan mayor diversidad genética podrían enfrentar mejor la infección por ciertos patógenos (Seeley y Tarpey, 2007).

2.5.2. Inmunidad individual

Una vez que el patógeno vence las barreras de defensa colonial, se ponen en marcha los mecanismos de defensa individual. En este aspecto, el análisis del genoma de *A. mellifera* ha revelado una reducción en los genes vinculados a la inmunidad innata, lo cual puede deberse a una mayor inversión del organismo en los comportamientos de inmunidad social (Evans *et al.*, 2006; *The Honeybee Genome Sequencing Consortium*, 2006).

Luego de vencer las barreras físicas para impedir su acceso al hospedero, como la cutícula del exoesqueleto y la membrana peritrófica del intestino, se activa el sistema inmune innato cuya respuesta comienza con el reconocimiento de ciertas estructuras del patógeno llamadas MAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos). De esta forma se desencadenan cascadas de señalización de cuatro tipos vinculadas tanto a la inmunidad humoral como celular (Evans *et al.*, 2006):

- 1) Toll: está involucrada en el reconocimiento de bacterias y hongos mediante receptores de tipo transmembrana TLRs (receptores tipo Toll) y los productos de esta cascada están involucrados en la producción de péptidos antimicrobianos, tres lisozimas y la enzima profenol oxidasa.
- 2) Imd (Immune deficiency): los receptores de esta cascada están vinculados al reconocimiento principalmente de bacterias gram negativas, desencadenando la producción de péptidos antimicrobianos. El producto del gen *imd* es un regulador crítico de esta cascada.
- 3) JNK: se activa debido a la interacción con componentes de la cascada Imd y está también involucrada en la producción de péptidos antimicrobianos, enzimas vinculadas al proceso de melanización y reguladores del proceso de apoptosis.
- 4) JAK/STAT (*Janus quinasa*): esta cadena está involucrada en la producción de moléculas tipo complemento y en la sobreproliferación de células inmunes (hemocitos). Además, teniendo en cuenta que genes homólogos en *Drosophila* actúan en la respuesta antiviral, posiblemente éste también sea el caso para *A. mellifera* (Evans *et al.*, 2006)

La respuesta humoral se caracteriza por la producción de péptidos antimicrobianos: ABAECINA (Castells *et al.*, 1990), APIDECINA (Castells *et al.*, 1989), HIMENOPTECINA (Castells *et al.*, 1993) y DEFENSINA (Casteels-Jonsson *et al.*, 1994). Estos péptidos actúan mediante mecanismos de disrupción de la membrana del patógeno debido a la formación de poros que alteran su polarización, o mediante su ingreso al citoplasma del patógeno y modificación de síntesis y expresión de distintos componentes del mismo (Li *et al.*, 2012). Además, estos péptidos actúan con la LISOZIMA, la cual tiene actividad bactericida y bacteriostática al hidrolizar los enlaces β 1-4 del peptidoglicano bacteriano.

También, se ponen en marcha mecanismos de defensa celular, caracterizados por procesos de fagocitosis, encapsulación y nodulación, estos últimos pudiendo estar acompañados por melanización (Lavine y Strand, 2002; Evans *et al.*, 2006). Dentro de los compuestos vinculados a esta respuesta, se encuentra la enzima PROFENOL OXIDASA y GLUCOSA DESHIDROGENASA. La PROFENOL OXIDASA circula en la hemolinfa y tras la interacción con su blanco se activa a la forma FENOL OXIDASA, la cual cataliza la oxidación de fenol o quinonas, compuestos que polimerizan de forma no enzimática dando lugar a la melanina (Vargas-Aboes y Ortega Rubio, 1994). Su acción tóxica, está potenciada por la acción de la enzima GLUCOSA DESHIDROGENASA, la cual cataliza la oxidación de glucosa a glucano lactona produciendo FADH₂. El FADH₂ funciona a modo de donador de electrones a las quinanas generando semiquinonas, que en presencia de oxígeno reaccionan produciendo superóxido, compuesto extremadamente tóxico que contribuye a la destrucción del patógeno encapsulado (Cox-Foster *et al.*, 1993).

Por otro lado, células dañadas pueden sufrir apoptosis o muerte celular programada, proceso altamente regulado por inhibidores de apoptosis como por ejemplo la deterina (codificada por el gen *birc5*) (Kerr *et al.*, 1972; Bergmann *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000).

Además, a la hora de evaluar la interacción entre el patógeno y la abeja *A. mellifera* usualmente se estudia la expresión de la VITELOGENINA, lipoproteína de 180 kDa involucrada en los procesos de protección contra el estrés oxidativo y por lo tanto está vinculada al envejecimiento de la abeja y la transición de la misma por las distintas tareas (Seehuus *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007). Se ha reportado que su expresión puede ser modificada bajo ciertas circunstancias como la infección con *N. ceranae* (Antúnez *et al.*, 2009), por lo que conocer su dinámica en abejas infectadas con este microsporidio contribuye a profundizar en la dinámica de esta enfermedad.

3. Hipótesis de trabajo

Existen diferentes variantes genéticas de *N. ceranae* provenientes de distintas regiones geográficas. Dichas variantes tienen diferente virulencia, lo cual podría explicar las discrepancias previamente reportadas en cuanto a las consecuencias de la infección con *N. ceranae* en la abeja *A. mellifera*.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Analizar la diversidad genética de *N. ceranae* y evaluar la virulencia de dos variantes de del microsporidio.

4.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- 1- Obtener una colección de muestras de *N. ceranae* a partir de abejas *A. mellifera* naturalmente infectadas, provenientes de distintos países.
- 2- Poner a punto las técnicas de Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE) y Análisis de Inter Regiones de Repeticiones Simples (ISSR) para el análisis de la diversidad genética de *N. ceranae*.
- 3- Conocer la diversidad genética de la colección de muestras de *N. ceranae* y definir las variantes circulantes.
- 4- Estudiar la distribución geográfica de dichas variantes.
- 5- Determinar si existen diferencias en la virulencia entre variantes de *N. ceranae* de origen español y uruguayo al infectar la abeja *A. mellifera iberiensis*.

5. CAPÍTULO 1: Variabilidad genética de *N. ceranae*

5.1. INTRODUCCIÓN

La asociación de *N. ceranae* con los fenómenos de pérdida masiva de colmenas es un tema controversial ya que si bien en España dicha asociación es clara, este no sería el caso del resto de los países (Invernizzi *et al.*, 2009; Genersch *et al.*, 2010; Paxton *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos estudios, posiblemente existan distintas variantes de *N. ceranae* que podrían tener diferente virulencia y por lo tanto un punto importante es poder identificar las distintas variantes del microsporidio que podrían estar circulando.

Estudios previos han intentado abordar este problema sin resultados exitosos empleando principalmente técnicas de secuenciación (Sagastume *et al.*, 2011; Roudel *et al.*, 2013; Gomez-Moracho *et al.*, 2014).

Sagastume y colaboradores (2011) clonaron y secuenciaron un fragmento del operón ribosomal de 12 muestras de abejas naturalmente infectadas con *N. ceranae* provenientes de Alemania, Eslovaquia, Eslovenia, España, Francia y Kirguistán. Obtuvieron en total 105 clones cuyo análisis de la secuencia nucleotídica permitió definir la existencia de 79 haplotipos, pudiendo identificar diferencias en la secuencia de distintos clones de cada muestra. De esta forma, no fue posible definir cada muestra por un único haplotipo, habiendo casos en los que clones provenientes de la misma muestra fueron tan distintos entre sí como aquellos provenientes de muestras distintas. Roudel y colaboradores (2013) obtuvieron resultados similares analizando la secuencia nucleotídica de *N. ceranae* de los genes codificantes de SSUrRNA, PTP2, SWP25, SWP30, HSWP4, EnP1B y cuatro genes codificantes de proteínas hipotéticas estructurales y superficiales potencialmente con alta variabilidad genética.

En el presente trabajo se plantea emplear las técnicas de DGGE e ISSR como alternativas para abordar este problema.

5.1.1. DGGE

El DGGE es una técnica de *fingerprinting* que permite la separación de fragmentos del mismo tamaño en base a su secuencia nucleotídica (Fischer y Lerman, 1983).

Como primer paso, la técnica implica la amplificación mediante PCR de un fragmento de un gen. El producto de dicha amplificación es sometido a electroforesis en gel en gradiente de condiciones desnaturizante de urea y formamida. De esta forma, la doble hebra de ADN se posicionará en su punto de desnaturización. La completa desnaturización del producto de PCR es impedida debido a la incorporación de una región rica en guanina y citosina en uno de los cebadores, la cual genera un punto estrecho de unión entre ambas hebras de ADN (Myers *et al.*, 1985).

Considerando que la unión de guanina y citosina es de tres puentes de hidrógeno mientras que la de adenina y timina es de dos, aquellos productos cuya composición GC sea mayor que otros precisarán más fuerza para desnaturizarse y por lo tanto se ubicarán en regiones donde la fuerza de desnaturización sea mayor. Así, fragmentos de igual tamaño pero distinta secuencia migrarán de forma diferencial en el gel (Myers *et al.*, 1985). De esta forma, a partir de cada muestra se obtiene un patrón de bandas las cuales dependiendo de su secuencia nucleotídica se ubicarán a distinta altura en el gel. Los patrones de bandas obtenidos son altamente reproducibles, aunque en ocasiones es necesario el empleo de *Software* específicos para analizar patrones de banda complejos. Si bien la técnica permite analizar un gran número de muestras en un corto período de tiempo, su puesta a punto resulta muy laboriosa.

Esta técnica es empleada principalmente para el análisis de comunidades microbianas (Green *et al.*, 2009), aunque en algunos casos también ha sido útil para el análisis de diversidad intraespecífica (Antúñez *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2011). En estos casos, se emplean cebadores cuya secuencia blanco es una región específica del organismo en análisis.

5.1.2. ISSR

Los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repetitions*) son repeticiones en tándem de di, tri o tetra nucleótidos los cuales se encuentran distribuidos al azar en los genomas de eucariotas; son muy polimórficos y específicos de cada especie (Bornet y Branchard, 2001; Reddy *et al.*, 2002). Debido a sus características composicionales, la ADN polimerasa puede agregar o quitar repeticiones en el proceso de replicación del ADN (principalmente en aquellos organismos cuyo mecanismo de corrección de errores no es muy efectivo), y por lo tanto suelen existir variaciones en la composición de los microsatélites a nivel de poblaciones. Sin embargo, si bien el análisis de estas regiones es una herramienta útil para el estudio de la diversidad intraespecífica, su estudio implica el conocimiento detallado de sus regiones flanqueantes, lo cual constituye una limitante a la hora de estudiar ciertos organismos.

Una alternativa es el estudio de las regiones que se encuentran entre los microsatélites (ISSR), técnica ampliamente documentada para el estudio de diversidad genética principalmente de plantas (Kantety *et al.*, 1995; Huang y Sun, 2000; Joshi *et al.*, 2000). Consiste en la amplificación de dichas regiones mediante PCR empleando cebadores cuya secuencia blanco es el microsatélite (Fig. 6). Una vez que los productos son analizados mediante electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, se obtienen patrones de bandas correspondientes a las distintas variantes analizadas. A nivel de microsporidios, esta técnica resultó útil para la identificación de variantes de *Nosema bombysis*, microsporidio que infecta el gusano de seda *Bombyx mori* (Rao *et al.*, 2005).

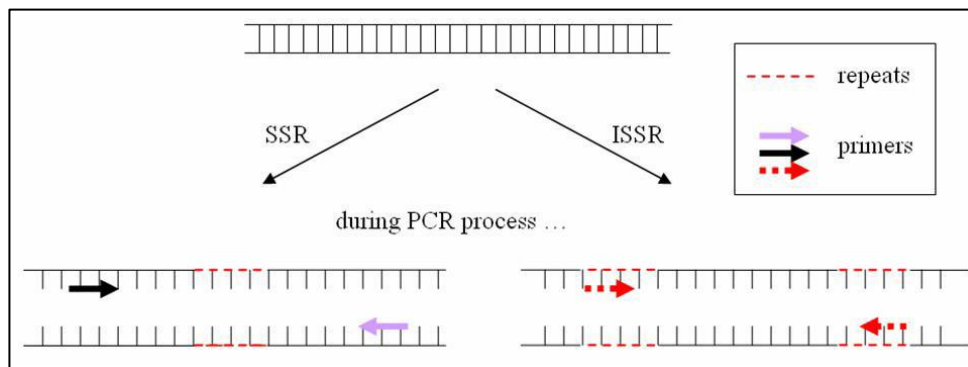


Figura 6. Esquema comparativo del proceso de amplificación de SSRs e ISSRs. Tomado de Yip *et al.*, 2007.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Muestras de *Nosema ceranae*

Las muestras de *N. ceranae* a emplear en los análisis de diversidad genética se obtuvieron a partir de abejas *A. mellifera* naturalmente infectadas con el microsporidio provenientes de una colmena. Estas muestras fueron enviadas desde distintos centros de investigación (Anexo 1) al Departamento de Microbiología del IIBCE donde se procesaron según se describe a continuación y se integraron a la colección de dicha institución. Las mismas se almacenaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

5.2.2. Procesamiento de abejas

Veinte abejas seleccionadas al azar de cada muestra se homogeneizaron con 10 ml de agua destilada estéril empleando un *Stomacher 80 Lab Blender* (Seward, London UK) a máxima velocidad durante 120 segundos. El homogeneizado se filtró para eliminar restos del esqueleto de la abeja y se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 6 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 2 ml de agua destilada estéril y se empleó para la purificación de esporas.

5.2.3. Purificación de esporas de *Nosema* spp.

Para la obtención de una suspensión pura de esporas de *Nosema* spp. se empleó la técnica de centrifugación en gradiente de Percoll (Martín-Hernández *et al.*, 2009). Para esto, se centrifugó 1 ml del homogeneizado obtenido en la etapa anterior con 10 ml de Percoll 95 % a $11.000 \times g$ durante 40 minutos. Esto permitió la concentración de las esporas formando una “nube de esporas”. Luego que se recuperó dicha “nube de esporas”, se resuspendió en cinco ml de agua destilada estéril, se centrifugó a $650 \times g$ durante diez minutos y se descartó el sobrenadante. Este último proceso se repitió dos veces con el fin de lavar las esporas y quitar los excedentes de Percoll.

Como control negativo se realizó este procedimiento en cinco muestras de abejas escogidas al azar en las cuales se chequeó previamente que no estaban infectadas con *Nosema* spp. mediante *multiplex* PCR (“controles de purificación”) (Martín-Hernández *et al.*, 2007). En estos casos se tomó muestra de la zona en que debería estar la nube de esporas en caso que estas hubiesen estado infectadas.

En todos los casos, el sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril. En suspensión, las esporas permanecen viables como máximo dos semanas.

Por otro lado, es importante considerar que debido a que las esporas de *N. ceranae* y *N. apis* poseen la misma densidad, se ubican a la misma altura en el gradiente de Percoll, por lo que esta técnica no permite separarlas.

5.2.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras a emplear en los análisis de diversidad genética se realizó a partir de las esporas purificadas según se describe en la sección anterior. Para esto, se utilizó el *Qiamp viral ARN mini kit* (*Qiagen, Hilden, Alemania*) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El ADN obtenido se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los siguientes análisis.

5.2.5. Discriminación entre *Nosema ceranae* y *Nosema apis*

Dado que el objetivo de esta tesis es el estudio de *N. ceranae* y no de *N. apis*, fue necesario detectar la presencia de ambas especies en las muestras y eliminar aquellas que evidenciaran la presencia de *N. apis*. Para esto, se amplificó mediante *multiplex* PCR un fragmento específico de cada uno de los microsporidios correspondientes al operón ribosomal (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Para la identificación de *N. ceranae* se emplearon los cebadores 218MITOC-F (5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA-3', T_m : $55,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) y 218MITOC-R (5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG-3', T_m : $58,9\text{ }^{\circ}\text{C}$) que amplifican un fragmento de 218 pb, mientras que para *N. apis* se emplearon los cebadores 321APIS-F (5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTAATGTA-3', T_m : $59,9\text{ }^{\circ}\text{C}$) y 321 APIS-R (5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG-3', T_m : $60,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) que amplifican un fragmento de 321 pb. La mezcla de reacción consistió en $0,4\text{ }\mu\text{M}$ de cada cebador, 3 mM de MgCl_2 , $0,4\text{ mM}$ de dNTPs, 2 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), *buffer* 1X, y $2,5\text{ }\mu\text{l}$ de ADN en un volumen final de $25\text{ }\mu\text{l}$. En cada reacción se incluyó un control negativo en el cual se empleó agua bidestilada estéril en lugar del ADN. Las condiciones de ciclado consistieron en $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, 10 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos, $61,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 segundos, 20 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos, $61,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 segundos con una extensión de 5 segundos en cada ciclo y por último $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 minutos. La reacción se realizó en termociclador *MultiGene OptiMax Thermal Cycler* (Labnet International, USA).

Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TBE 0,5X (Tris 5,4 g, ácido bórico 2,75 g, EDTA 0,5 M 2 ml por litro de agua destilada estéril pH 8) a 130 V durante 30 - 40 minutos, se tiñeron con GelRed (Biotium, USA) y se visualizaron mediante transiluminador de luz UV (Biometra T13).

5.2.6. Puesta a punto de la técnica Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Para el análisis de la diversidad genética de *N. ceranae* se optimizó la técnica de DGGE. Para esto, se trabajó con cuatro muestras de abejas provenientes de Argentina, Chile, España y Uruguay infectadas naturalmente con *N. ceranae*.

En una primera instancia se puso a punto la amplificación mediante PCR de tres fragmentos del genoma de *N. ceranae*: un fragmento del gen que codifica para la subunidad menor ribosomal (SSUrRNA), un fragmento del gen que codifica para el filamento polar 1 (PTP1) y un fragmento de la región intergénica (IGS) (Tabla 1) (Huang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2011). La mezcla de reacción en los tres casos consistió en 0,2 μ M de cada cebador, 2 mM de MgCl₂, 0,1 mM de dNTPs, 1U de Taq (Invitrogen), *buffer* 1X y 2 μ l de ADN en un volumen final de 25 μ l. El programa de ciclado para la amplificación del gen que codifica para el SSUrRNA y de la región IGS consistió en 2 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 68 °C y una extensión final de 2 minutos a 68 °C. El programa de amplificación del gen *ptp1* consistió en 2 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador *MultiGene OptiMax Thermal Cycler* (Labnet International, USA).

Tabla 1. Cebadores empleados para la amplificación específica de los fragmentos correspondientes al SSUrRNA, IGS y PTP1 de *N. ceranae*. En letra negra se indica la grapa GC.

Nombre	Secuencia	Región blanco	Tamaño del amplicón	Referencia
NcerF1	5'- CGCGCCGCGCGCGCGGCGGCG GGATAAAAGAGTCCGTTACC-3'	SSUrRNA	250 pb	Chen <i>et al.</i> , 2009
NcerR1	5'-TGAGCAGGGTTCTAGGGAT-3'			
NcerF2	5'- CGCCCGCCGCGCGCGGCGGCGG GACAAAACTACAGCACCTAGS-3'	IGS	606 pb	Huang <i>et al.</i> , 2007
NcerR2	5'-ACGTCAGGCAGAATCAAC-3'			
NcORF_1664_PTPF	5'- CCC GCCGCGCGCGGCGGCGGGGCGG GGGCGACAACAAGGAGACCTGGAAGTG-3'	PTP1	838 pb	Chaimanee <i>et al.</i> , 2011
NcORF 1664 PTPR	5'-TGTGAATAAGAGGGTGATCCTGTTGAG-3'			

Para verificar la amplificación de una única banda, los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TBE 0,5X a 120 V durante 30 a 40 minutos. Los mismos se tiñeron con GelRed (Biotium, USA) y se visualizaron mediante transiluminador de luz UV (Biometra T3).

Posteriormente, los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de acrilamida 6% en gradiente desnaturante de urea y formamida en *buffer* TAE 0,5X (tris base 60,5 g, ácido acético glacial 14,28 ml, EDTA 0,5 M pH 8 25 ml, pH final 9, en un volumen final de 25 litros) a 70 V durante 16 horas a 60 °C en el equipo para DGGE del IIBCE (C.B.S *Scientific*, USA). Para la puesta a punto del gradiente del gel se variaron las condiciones de desnaturación entre un 20 y 80% con el fin de obtener una mejor resolución de las bandas. Así mismo, para visualizar mejor las bandas tenues y obtener patrones de bandas comparables se varió el volumen de siembra de los productos obtenidos.

La resolución de los patrones de bandeo se realizó mediante tinción con GelRed (Biotium, USA) durante una hora y los geles se escanearon empleando el escáner de genes *FujiFilm Starion FLA 9000 Image Scanner* del IIBCE.

5.2.7. Puesta a punto de la técnica de Análisis de Inter Regiones de Repeticiones Simples (ISSR)

Con el fin de poner a punto la técnica de ISSR para el análisis de *N. ceranae* se probaron 28 cebadores los cuales fueron empleados previamente para la amplificación del genoma de *Nosema bombysis* (Rao *et al.*, 2005) (Tabla 2). Al igual que en el caso de la optimización del DGGE, se emplearon cuatro muestras de distintos orígenes (Argentina, Chile, España y Uruguay). Para la reacción de PCR se probó la enzima Taq estándar y Platinum® Taq (Invitrogen). La mezcla de reacción consistió en todos los casos en 0,3 µM de cada cebador, 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 1U de Taq (Invitrogen), *buffer* 1X y 1 µl de ADN en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación consistieron en 2 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 40 °C, 2 minutos a 72 °C y 10 minutos a 72 °C y las reacciones se realizaron en un termociclador *MultiGene OptiMax Thermal Cyclor* (Labnet International, USA).

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en el gel de agarosa 2% en *buffer* TBE 0,5X a 90 V durante 160 minutos. La visualización se realizó mediante tinción con GelRed (Biotium, USA) durante una hora y los geles se escanearon empleando el escáner de genes *FujiFilm Starion FLA 9000 Image Scanner* del IIBCE.

Tabla 2. Cebadores empleados para la puesta a punto de la técnica de ISSR.

Tomados de Rao *et al.*, 2005

Nombre	Secuencia
807	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'
808	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'
809	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGG-3'
812	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3'
816	5'-CACACACACACACAT-3'
817	5'-CACACACACACACAA-3'
818	5'-CACACACACACACAG-3'
825	5'-ACACACACACACACT-3'
826	5'-ACACACACACACACC-3'
827	5'-ACACACACACACACG-3'
834	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'
842	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3'
850	5'-GTGTGTGTGTGTGTGYC-3'
851	5'-GTGTGTGTGTGTGTGYG-3'
855	5'-ACACACACACACACYT-3'
856	5'-ACACACACACACACYA-3'
862	5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGC-3'
864	5'-ATGATGATGATGATGATG-3'
866	5'-CTCCTCCTCCTCCTC-3'
869	5'-GTTGTTGTTGTTGTTGTT-3'
873	5'-GACAGACAGACAGACA-3'
881	5'-GGGTGGGGTGGGGTG-3'
886	5'-VDVCTCTCTCTCTCT-3'
887	5'-DVDTCTCTCTCTCTC-3'
888	5'-BDBCACACACACACA-3'
889	5'-DBDACACACACACAC-3'
890	5'-VHVGTGTGTGTGTGTG-3'
891	5'-HVHTGTGTGTGTGTG-3'

Referencia: R, purina; Y, pirimidina; N, cualquier nucleótido.

5.2.8. Análisis de diversidad genética de *Nosema ceranae*

Una vez puesto a punto el DGGE e ISSR se escogió para el análisis de la colección de muestras de *N. ceranae* aquella técnica que permitió observar diferentes patrones de amplificación entre las cuatro muestras empleadas y que resultó reproducible. Se incluyó como grupo externo seis muestras de ADN de *N. apis* cedidas por Carolina Abud e Ivanna Tomasco del Laboratorio de Evolución de Facultad de Ciencias, UdelaR.

Los análisis de diversidad genética de las muestras de *N. ceranae* empleadas en los ensayos de infección se realizaron al final de dicho ensayo y los resultados obtenidos se compararon con la filogenia de la colección de muestras.

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el *Software GelCompar II (Applied Maths, Brasil)*. Los patrones de bandas se marcaron automáticamente y corrigieron manualmente muestra por muestra. Se variaron los valores de porcentaje de tolerancia (porcentaje de distancia admitida para que si dos bandas se encuentran a esa distancia sean reconocidas como la misma banda) y optimización (libertad en el movimiento de la imagen) de modo de que las diferencias observadas no fueran artefactos metodológicos sino que tuvieran sentido biológico. Se empleó el coeficiente de similitud “*Different bands*” para el cálculo de la matriz de similitud, el cual asigna el puntaje según el número de bandas distintas entre las dos muestras que se están comparando. Este coeficiente responde a la fórmula $S = 1 - ((N_A + N_B) - 2N_{AB})$, siendo S el puntaje de similitud entre ambas muestras, N_A el número de bandas de la muestra A, N_B el número de bandas de la muestra B y N_{AB} el número de bandas en común entre las muestras A y B.

Se emplearon los métodos de inferencia filogenética UPGMA y *Neighbor Joining* para generar los agrupamientos basados en los patrones de bandas y la significancia de los agrupamientos se determinó por el índice de correlación cofenética, el cual es una medida de correlación entre las similitudes derivadas del dendograma y la matriz de similitud.

La significancia interna de grupo se evaluó mediante el método de Jackknife (por máxima similitud), el cual compara cada muestra con la más similar dentro de cada grupo predefinido asignándole un valor de pertenencia a cada uno. De esta forma, se obtuvo una tabla de porcentajes la cual indica qué porcentaje de las muestras fue efectivamente incluida en cada uno de los grupos.

Por otro lado, con el fin de evaluar la diversidad genética de *N. ceranae* a nivel biogeográfico y de cada agrupamiento se empleó el índice de diversidad de Simpson (D) según la fórmula $D = \sum n_i (n_i - 1) / N(N - 1)$ siendo n_i el número de individuos dentro de la categoría i y N el número de individuos en la población. Este índice tiene en cuenta la diversidad y su equitatividad, es decir la uniformidad en la distribución de los individuos en esas categorías. Valores cercanos a 0 indican mucha diversidad dentro del grupo mientras que valores cercanos a 1 indican diversidad nula.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Colección de muestras de *Nosema ceranae*

Se recibieron 146 muestras de abejas naturalmente infectadas con *N. ceranae* provenientes de 16 países distintos, de las cuales 74 mostraron la presencia únicamente de *N. ceranae* (Fig. 7). En las 72 muestras restantes no fue posible detectar la presencia de *N. ceranae* ni de *N. apis*. En base a esto, se seleccionaron las 74 muestras positivas para *N. ceranae* para los siguientes análisis. Dichas muestras provinieron de 13 países: Argentina, Brasil, Canadá, Croacia, Eslovenia, España, Hawaii, Holanda, Francia, Portugal, Suiza, Turquía y Uruguay (Fig. 8; Tabla 3). Si bien todos los investigadores que enviaron muestras informaron que las mismas estaban infectadas con *N. ceranae*, en el proceso de purificación de la nube de esporas obtenidas a partir de la centrifugación en gradiente de Percoll se pierde cierto volumen y por lo tanto si la carga de esporas en la muestra no es alta, no es posible posteriormente extraer el ADN del microsporidio.

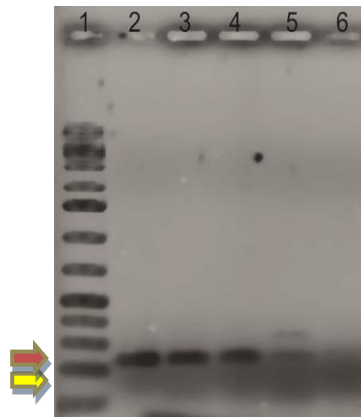


Figura 7. Ejemplo de gel de agarosa de los productos obtenidos mediante *multiplex* PCR para la amplificación específica de los fragmentos del ARNr 16S de *N. ceranae* (→) y *N. apis* (→). (1): Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Fermentas); (2), (3) y (4) Muestras problema; (5) Control positivo *N. ceranae* y *N. apis* (6) Control negativo.

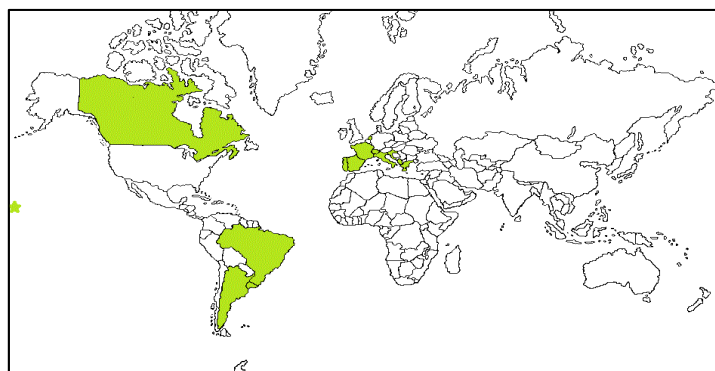


Figura 8. Distribución mundial de las muestras empleadas en los análisis de diversidad genética.

Tabla 3. Colección de muestras empleadas para evaluar la diversidad genética de *N. ceranae*.

Nombre	Origen	Año de colecta	Nombre	Origen	Año de colecta
08_736	Argentina	2008	09_855	Francia	2009
Tuc	Argentina	2012	09_861	Francia	2009
Zar	Argentina	2012	C3	Francia	2010
T22	Argentina	2012	7_C2	Francia	2010
T23	Argentina	2012	8_C6	Francia	2010
T24	Argentina	2012	9_C7	España	2010
T25	Argentina	2012	10_C10	Francia	2010
T26	Argentina	2012	13_C11	Francia	2010
T27	Argentina	2012	C8	Francia	2010
500	Argentina	2012	C9	Francia	2010
502	Brasil	2012	10_1170	Hawái	2010
503	Brasil	2012	10_1065	Hawái	2010
504	Brasil	2012	10_1066	Hawái	2010
10_377	Canadá	2010	10_1067	Hawái	2010
13-002	Canadá	2013	10_1074	Hawái	2010
07_1176	Croacia	2007	10_1159	Hawái	2010
07_1177	Croacia	2007	10_1165	Hawái	2010
07_1181	Croacia	2007	10_1204	Hawái	2010
1_3	Eslovenia	Sin Dato	10_1075	Hawái	2010
11_912	España	2011	10_1082	Hawái	2010
11_246	España	2011	10_1154	Hawái	2010
11_253	España	2011	10_1163	Hawái	2010
A	España	2009	10_1194	Hawái	2010
C4	España	2009	08_1001	Holanda	2008
C5	España	2010	08_1110	Holanda	2008
6_C1	España	2010	08_1111	Holanda	2008
11_CER1	España	2007	09_552	Holanda	2009
12_CER2	España	2009	09_567	Holanda	2009
14_C12	España	2011	09_142	Portugal	2009
15_CER37	España	2007	06_476	Suiza	2006
08_1268	Francia	2008	06_481	Suiza	2006
08_1277	Francia	2008	Uru	Uruguay	2012
09_859	Francia	2009	505	Uruguay	2011
09_342	Francia	2009	507	Uruguay	2011
09_858	Francia	2009	508	Uruguay	2011
09_857	Francia	2009	10_230	Turquía	2010
09_863	Francia	2009			

5.3.2. Puesta a punto de DGGE

Para el análisis de la diversidad genética de *N. ceranae* se trabajó en una primera instancia empleando la técnica de DGGE. Se usaron juegos de cebadores que amplifican específicamente un fragmento del gen que codifica para la SSUrRNA, un fragmento del gen que codifica para el PTP1 y un fragmento de la región IGS empleando muestras de *N. ceranae* de distinto origen geográfico (Argentina, Chile, España y Uruguay). El análisis mediante electroforesis en gel de agarosa permitió visualizar una única banda del peso molecular esperado según su producto: 250 pb para el fragmento del gen que codifica para la SSUrRNA, 606 pb para el fragmento de la región intergénica (IGS) y 838 pb para un fragmento del gen que codifica para la subunidad 1 del filamento polar.

Posteriormente, se optimizó la concentración del gradiente de desnaturizante para cada producto de amplificación, estableciéndose en 45 – 65 para el SSUrARN, 20 – 50 para el IGS, y 30 – 60 para el PTP1. Como es posible observar en la Figura 9, no fue posible identificar diferencias entre las muestras de distinto origen geográfico mediante ninguno de los tres juegos de cebadores.

Por otro lado, es posible observar la existencia de varias copias con diferencias en la secuencia nucleotídica de cada región analizada: al menos 11 copias diferentes para el SSUrRNA, 17 copias para el IGS y 4 copias para el *ptp1*.

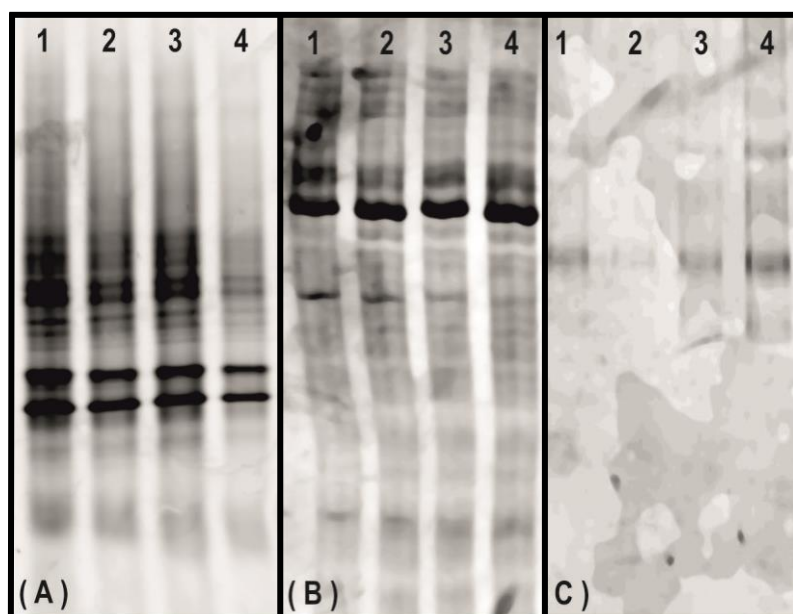


Figura 9. Ejemplo de: (A) Gel desnaturizante en gradiente 45 – 65 para la resolución del fragmento del gen que codifica para SSUrRNA de *N. ceranae*; (B) Gel desnaturizante en gradiente 20 – 50 para la resolución de un fragmento de la región intergénica de *N. ceranae*; (C) Gel desnaturizante en gradiente 30 – 60 para la resolución del fragmento del gen que codifica para el PTP1 de *N. ceranae*. (1) *N. ceranae* de origen argentino; (2) *N. ceranae* de origen chileno; (3) *N. ceranae* de origen español; (4) *N. ceranae* de origen uruguayo.

5.3.3. Puesta a punto de ISSR

Como otra opción para el análisis de diversidad genética se planteó la técnica de ISSR. En primer lugar se probó con la enzima Taq estándar y Platinum® Taq (Invitrogen), escogiéndose esta última debido a que fue la única con la que no se observaron productos de amplificación en los controles negativos. De los 28 cebadores empleados, seis se escogieron para los siguientes análisis debido a que fueron los únicos que amplificaron las cuatro muestras y mostraron distintos patrones de amplificación entre las mismas (cebadores 809, 816, 825, 827, 834 y 851) (Fig. 10).

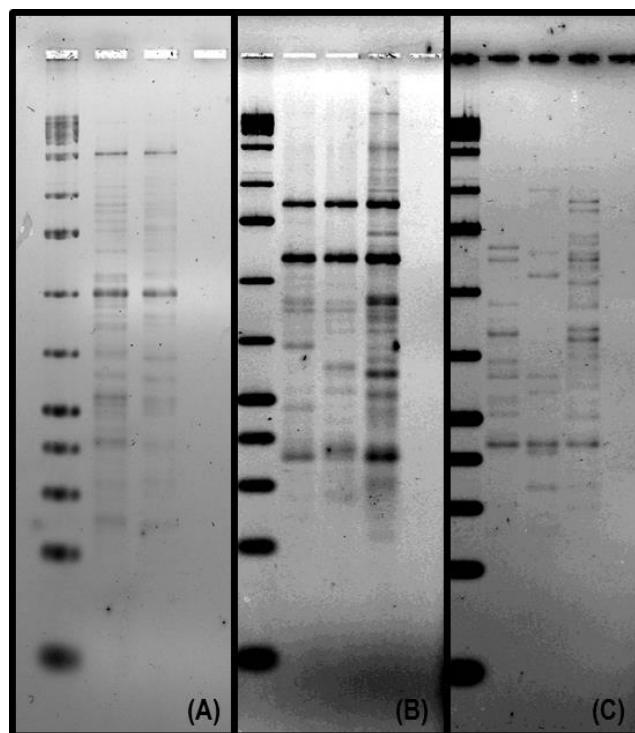


Figura 10. Ejemplo de geles de agarosa correspondientes al análisis mediante la técnica de ISSR con los cebadores (A) 834, 1- Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Fermentas), 2 y 3 muestras problema, 4- control negativo; (B) 827, 1- Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Fermentas), 2, 3 y 4 muestras problema y 5- control negativo; (C) 825, 1- Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Fermentas), 2, 3 y 4 muestras problema y 5- control negativo.

Posteriormente, se emplearon estos cebadores para amplificar el ADN obtenido de abejas que resultaron negativas para *N. ceranae* y *N. apis* ("controles de purificación"). Los cebadores 809, 816, 825, 827 y 834 reconocen ADN de la abeja que sedimenta en la zona correspondiente al de la nube de esporas, ya que fue posible visualizar bandas de amplificación en los controles de purificación cuando estos cebadores se emplearon en la reacción de PCR. El cebador 851 fue el único cuya reacción no evidenció amplificación (Fig. 11).

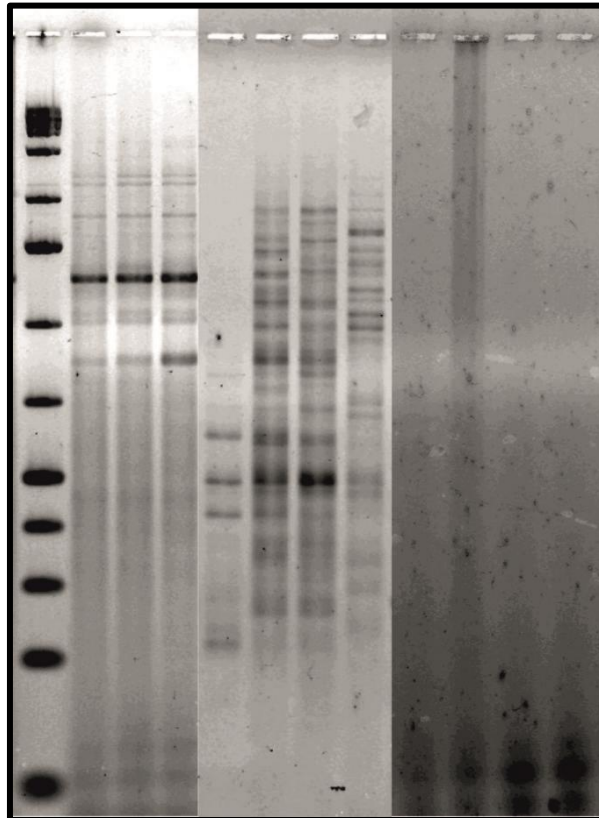


Figura 11. Ejemplo de gel de agarosa de muestras analizadas mediante la técnica de ISSR empleando el cebador 851. (1) Marcador de peso molecular 1kb Plus (Fermentas), de (2) a (4) muestras problema que posteriormente fueron agrupadas en el grupo A; de (5) a (8) muestras problema; de (9) a (12) controles de purificación de esporas (muestras negativas para *N. ceranae*).

5.3.4. Diversidad genética de *N. ceranae*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la puesta a punto de DGGE e ISSR, la técnica escogida para el análisis de diversidad genética de *N. ceranae* fue la de ISSR empleando el cebador 851. Los patrones de amplificación obtenidos fueron reproducibles, ya que se obtuvieron los mismos patrones de amplificación una vez repetida la reacción de PCR. Para el análisis de los resultados se establecieron los valores de optimización y tolerancia en 0,3% y 0,6% respectivamente.

En la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos del análisis de diversidad genética de la colección de muestras de *N. ceranae*. Teniendo en cuenta que fue posible observar la misma topología empleando los métodos de inferencia UPGMA y *Neighbour Joining*, a continuación se presentan los resultados obtenidos con este último. Los patrones de amplificación obtenidos permiten observar la existencia de tres grupos principales, A, B y C, con altos valores en la consistencia de cada agrupamiento según el índice de correlación cofenética.

El grupo A se caracteriza por un patrón de amplificación en común caracterizado por la presencia de las bandas de 2420, 2230, 1780, 1260, 1060 y 1020 Kb. El índice de diversidad de Simpson se calculó considerando este patrón de amplificación común como característico del grupo, indicando que la diversidad genética dentro del grupo es nula ($D=1$). Este grupo está conformado por muestras provenientes de Europa (Holanda, Francia, Croacia, Suiza e Italia), Hawaii, Canadá y una muestra de Argentina.

Los grupos B y C poseen muestras principalmente de origen Europeo y de América del Sur: el grupo B posee muestras provenientes de Canadá, España, Francia, Suiza, Eslovenia, Turquía, Portugal y Argentina, mientras que el grupo C se conformó por muestras de España, Francia, Argentina y Uruguay. Los índices de diversidad de Simpson son de 0,04 para el grupo B y de 0 para el grupo C, lo cual indica que la diversidad en ambos grupos es muy alta. Las muestras provenientes de Brasil y algunas de las muestras argentinas, se ubicaron por fuera de estos tres grupos, sin formar ningún grupo definido.

La significancia interna de grupo se evaluó mediante el método de Jackknife definiendo los tres grupos establecidos por el análisis filogenético. El 100% de las muestras agrupadas en los grupos A y B fueron identificadas con los grupos A y B respectivamente, mientras que del total de muestras del grupo C el 94,7% de éstas se ubicaron en este grupo y el 5,3% restante se asoció al grupo B.

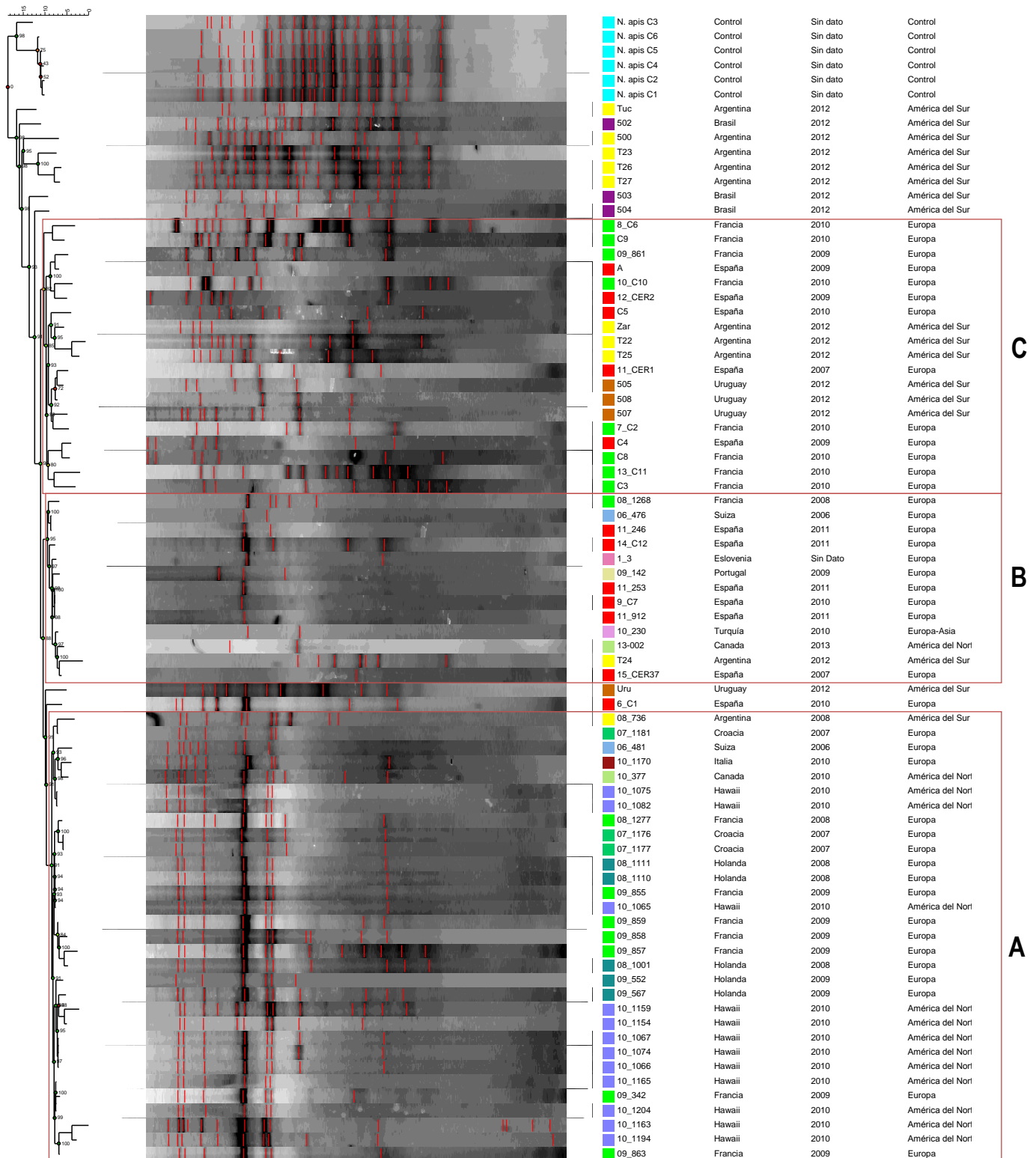


Figura 12. Cladograma de la colección de muestras de *N. ceranae* mediante el método de inferencia filogenética Neighbour Joining. Cada región geográfica se muestra con un color distinto y el apoyo del nodo se representa en colores verdes para aquellos casos en que el valor del agrupamiento fue alto y en degradé hacia el rojo a medida que el respaldo del agrupamiento disminuyó. Se incluyeron seis muestras de *N. apis* como grupo externo.

En total se analizaron 42 muestras provenientes de Europa, de las cuales 12 fueron de España y 16 de Francia, siendo éstos los países con mayor representación de muestras. El 40,4% de las muestras de origen europeo se asoció con el grupo A, quedando todas las muestras de España por fuera de este grupo (Fig. 13). Si este cálculo se reformula excluyendo las muestras provenientes de España (debido a que quedó por fuera del grupo A), el 56,6% de las muestras europeas presentan el patrón de amplificación característico de este grupo, con un índice de diversidad de Simpson de 0,51 lo cual indica una diversidad genética media de *N. ceranae* en Europa. Además, el 100% (12) de las muestras de Hawaii se identificaron con el patrón característico del grupo A.

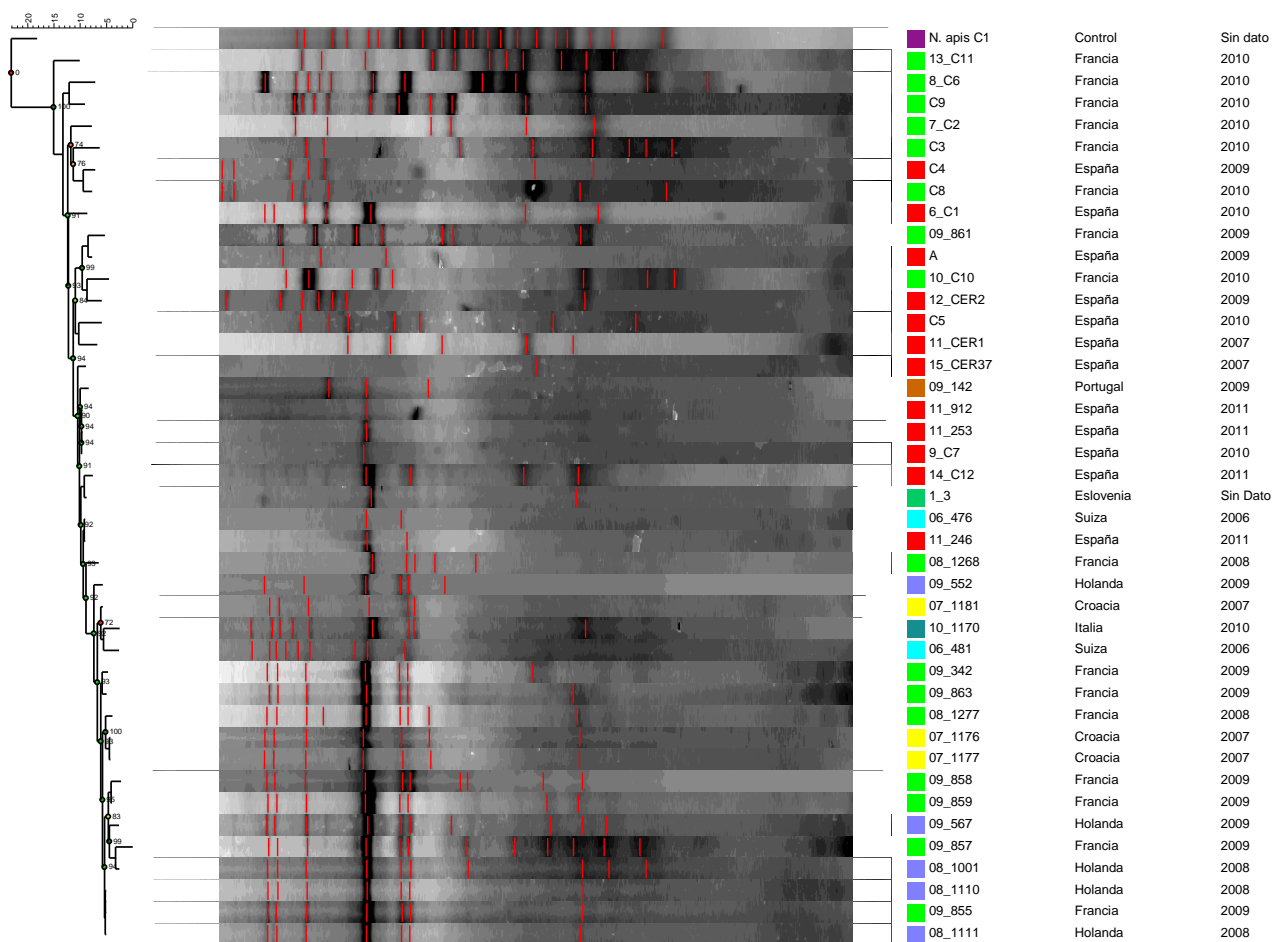


Figura 13. Cladograma de las muestras de *N. ceranae* provenientes de Europa mediante el método de inferencia filogenética Neighbour Joining. Cada región geográfica se muestra con un color distinto y el apoyo del nodo se representa en colores verdes para aquellos casos en que el valor del agrupamiento fue alto y en degradé hacia el rojo a medida que el respaldo del agrupamiento disminuyó. Se incluyó una muestra de *N. apis* como grupo externo.

Existe una gran diversidad de variantes de *N. ceranae* circulando en España (D=0,04) (Fig. 14) y este mismo comportamiento fue observado al analizar las muestras de América del Sur (D=0,005) (Fig. 15).

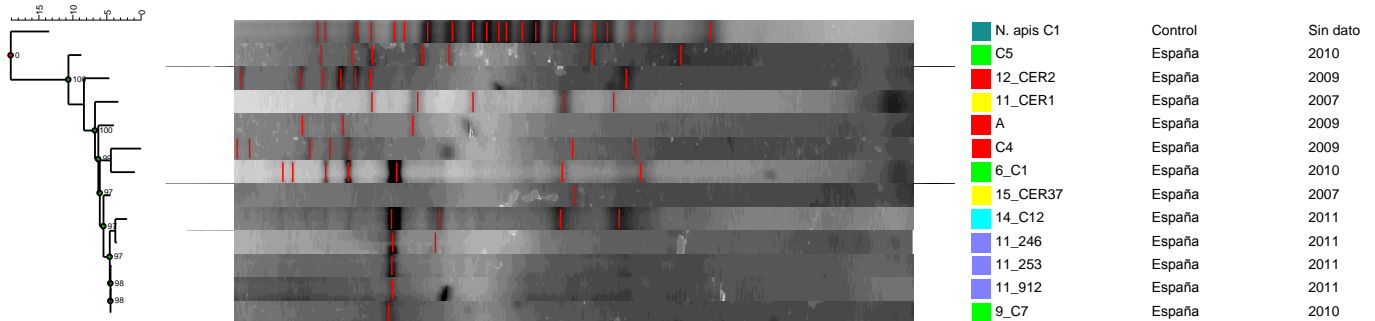


Figura 14. Cladograma de las muestras de *N. ceranae* provenientes de España mediante el método de inferencia filogenética Neighbour Joining. Las muestras se presentan en distintos colores según el año de colecta, y el apoyo del nodo se representa en colores verdes para aquellos casos en que el valor del agrupamiento fue alto y en degradé hacia el rojo a medida que el respaldo del agrupamiento disminuyó. Se incluyó una muestra de *N. apis* como grupo externo.

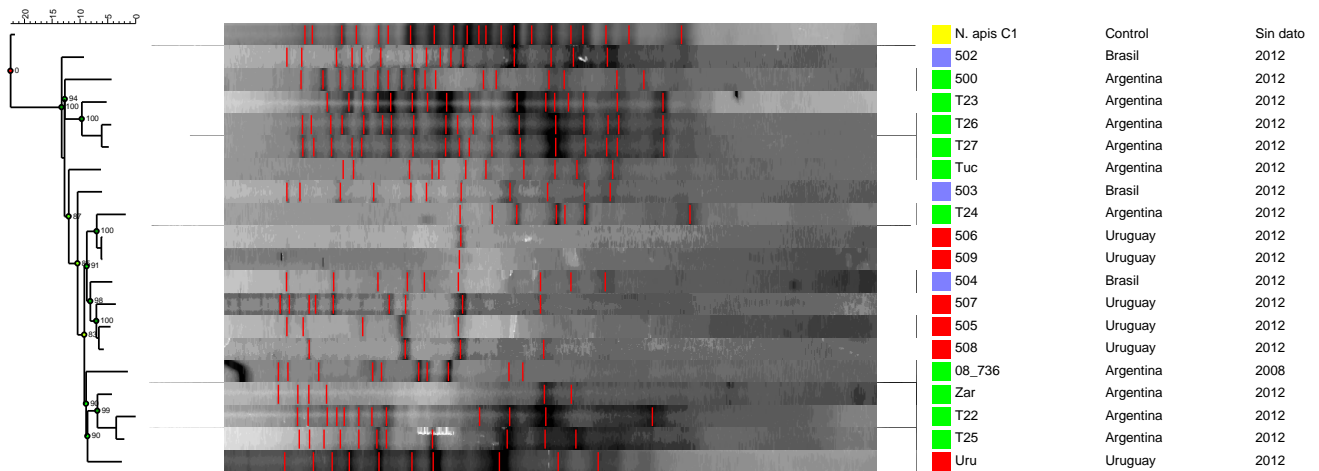


Figura 15. Cladograma de las muestras de *N. ceranae* provenientes de América del Sur mediante el método de inferencia filogenética Neighbour Joining. Los distintos países se presentan con diferentes colores, y el apoyo del nodo se representa en colores verdes para aquellos casos en que el valor del agrupamiento fue alto y en degradé hacia el rojo a medida que el respaldo del agrupamiento disminuyó. Se incluyó una muestra de *N. apis* como grupo externo.

Es importante destacar que no fue posible asociar las muestras de acuerdo al año en que fueron tomadas.

5.4. DISCUSIÓN

En el presente capítulo se planteó la caracterización de muestras de *N. ceranae* provenientes de distintas partes del mundo mediante el análisis de su diversidad genética. Esta identificación es necesaria a la hora de evaluar si existen distintas variantes circulando y si las mismas poseen diferente virulencia, aspectos que contribuyen a comprender las características y dinámica de la enfermedad. Esta caracterización ha sido abordada por distintos grupos de investigación con poco éxito hasta el momento, debido principalmente a las técnicas escogidas para dicho análisis y al alto nivel de variación genética detectado en las secuencias escogidas para analizar (Sagastume *et al.*, 2011; Roudel *et al.*, 2013; Gomez–Moracho *et al.*, 2014). Por tal motivo, en este trabajo se planteó el empleo de dos técnicas alternativas: DGGE e ISSR. Dichas técnicas tienen como principal característica que no implican el análisis detallado base a base de la secuencia nucleotídica, sino que brindan información mediante patrones de amplificación generales de secuencias específicas en el caso de DGGE o mediante el análisis de todo el genoma en el caso de ISSR (Reddy *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2009).

La técnica de DGGE no resultó informativa para cumplir el objetivo planteado ya que evidenció un único patrón de amplificación en las muestras analizadas y por lo tanto no permitió la diferenciación entre las mismas. Por otro lado, esta técnica permitió identificar la existencia de varias copias de cada región del genoma en estudio. Genomas adaptados al parasitismo extremo como es el caso de *N. ceranae*, tienden a ser sumamente reducidos, manteniendo aquella información genética básica para su ciclo de vida y aprovechando la maquinaria del hospedero, por lo que las distintas copias de los genes analizados en el presente trabajo podrían llamar la atención (Keeling y Fast, 2002; Cornman *et al.*, 2009). Sin embargo, la existencia de varias copias funcionales del operón ribosomal ya ha sido planteada aunque su número aún no ha sido determinado (Cornman *et al.*, 2009; Hatjina *et al.*, 2011; Sagastume *et al.*, 2011; Sagastume *et al.*, 2013). Por otro lado, si bien diversos estudios han propuesto que los genes que codifican para los tres PTPs se encuentran en una única copia en el genoma de ciertos microsporidios (Delbac *et al.*, 1998; Delbac *et al.*, 2001), este no sería el caso para *N. ceranae* (Hatjina *et al.*, 2011; Gomez–Moracho *et al.*, 2014). Considerando estos resultados y la multiplicación explosiva que tiene *N. ceranae* en *A. mellifera*, es posible plantear que la existencia de las múltiples copias del operón ribosomal y del PTP1 sea una adaptación del microorganismo para optimizar la traducción de ciertos péptidos en determinadas circunstancias y de esta forma mejorar su *fitness* al infectar la abeja *A. mellifera*.

Por otro lado, la técnica de ISSR permitió visualizar distintos patrones de amplificación y resultó reproducible, por lo que fue la escogida para los análisis de diversidad genética. El empleo de la enzima Taq Platinum fue clave para que los controles negativos no presentaran amplificación, lo cual puede deberse a que dicha enzima es más sensible y específica que la Taq estándar, disminuyendo principalmente amplificación inespecífica y la presencia de dímeros de cebadores (*Life Technologies Team®*). Por tal motivo a la hora de reproducir esta técnica, es importante que este aspecto sea tenido en cuenta.

En relación a los análisis de diversidad genética de la colección de muestras de *N. ceranae*, este estudio es el primero que permite diferenciar las mismas según su origen (Dussaubat *et al.*, 2013; Roudel *et al.*, 2013; Gomez–Moracho *et al.*, 2014; van der Zee *et al.*, 2014). El grupo A presentó un patrón de amplificación predominante caracterizado por una baja diversidad genética (evidenciada tanto por el índice de diversidad de Simpson como por el largo de las ramas del agrupamiento). En este grupo se identificaron muestras principalmente de Europa y Hawaii. Varios de los países europeos en análisis estuvieron representados por pocas muestras (entre 1 y 5) y en muchos casos todas éstas se incluyeron dentro de este grupo. Si bien es posible que en los distintos países existan otras variantes de *N. ceranae*, teniendo en cuenta que dichas muestras se escogieron al azar y fueron tomadas entre los años 2006 a 2010 parecería ser que esta variante es la predominante entre la mayoría de los países de Europa y se encuentra conservada en el tiempo.

Las muestras provenientes de Hawaii también se incluyeron dentro de este grupo. En este caso todas las muestras son del 2010 y no se cuenta con información específica de su ubicación geográfica. Por tal motivo, no es posible descartar que dichas muestras provengan de ubicaciones cercanas y por lo tanto no se puede afirmar que esta variante sea la predominante en Hawaii. Además, si bien Hawaii es tradicionalmente exportador de material vivo debido a su aislamiento geográfico, los resultados obtenidos en el presente trabajo y la reciente detección de patógenos no presentes hasta el momento como es el caso de *V. destructor*, brindan evidencia de que existe ingreso de material vivo a la isla (Martin *et al.*, 2012).

En el caso de Francia, fue el único país que presentó variantes dentro de los tres grupos, lo cual es de esperarse considerando que fue el país con mayor representación de muestras en el análisis. Dussaubat y colaboradores (2013) evaluaron la diversidad genética de clones del ARNr de muestras provenientes de España y Francia, no pudiendo diferenciar las mismas según su origen. Es posible que la muestra de Francia empleada en este estudio perteneciera a los grupos B o C, los cuales presentaron muestras en común de ambos países.

Por otro lado, uno de los aspectos más interesantes es que ninguna de las muestras de España se incluyó dentro del grupo A. Considerando que fue uno de los países de los cuales se contaba con mayor número de muestras, que las mismas provenían de distintas regiones de España y que se tomaron en distintos años, la ausencia de este patrón de amplificación no parece ser una coincidencia. Esta diferenciación entre las muestras de *N. ceranae* de España del resto de los países de Europa plantea un antecedente interesante que podría explicar las diferencias en las consecuencias de la infección con *N. ceranae* reportado por distintos países (Genersch *et al.*, 2010; Paxton, 2010; Higes *et al.*, 2013). La diversidad genética en los distintos organismos manifiesta su éxito en la naturaleza y en el caso de *N. ceranae* en España, este éxito es notorio. Sin embargo, las consecuencias de la infección con este microsporidio en América del Sur (donde también es posible observar una gran diversidad genética) no son tan devastadoras como en España y su asociación con la despoblación de colmenas se da en casos puntuales (Invernizzi *et al.*, 2009; Vandame y Palacio, 2010; Higes *et al.*, 2013). Teniendo esto en cuenta, posiblemente en España las condiciones ambientales afecten a la abeja de tal forma que se favorezca el *fitness* del patógeno, mientras que en Uruguay dichas condiciones se podrían estar dando en particular, en las plantaciones de *E. grandis* (Invernizzi *et al.*, 2011).

En cuanto a América del Sur, se contó solamente con muestras provenientes de Argentina (Tandil y Mar del Plata), Brasil (San Pablo) y Uruguay. Sería interesante incluir muestras del resto de los países del continente de forma de contar con un panorama general de su diversidad genética.

Por otro lado, el hecho que muestras de *N. ceranae* provenientes de países alejados geográficamente se agrupen (como fue el caso del grupo C), refleja los efectos del comercio de material vivo a nivel mundial y la falta de controles sanitarios efectivos. De esta forma, se promueve la dispersión de los distintos patógenos, lo cual ha sido documentado para el ácaro *V. destructor* y la bacteria *Paenibacillus larvae* entre otros (Antúnez *et al.*, 2007 ; Martin *et al.*, 2012). De hecho, ya ha sido reportada la dispersión de *N. ceranae* asociada a la introducción artificial de reinas (Muñoz *et al.*, 2014). A nivel nacional, también se da comercialización de material vivo generalmente en ausencia total de controles sanitarios por lo que la dispersión de los distintos patógenos es inevitable. Además, dicha dispersión se estaría viendo potenciada por la transhumancia, actividad sumamente desarrollada en ciertos países y que implica la concentración de las colmenas en cierto cultivo, promoviendo de esta forma la transmisión de las enfermedades entre las mismas.

Por otro lado, en aquellas ocasiones en las que se da un salto de hospedero reciente es esperable observar una baja diversidad genética debido que el salto de una variante (con cierto *background* genético) genera un cuello de botella. Con el paso del tiempo, la variante comienza a expandirse y esa diversidad genética aumenta. En este trabajo si bien observamos una variante predominante en Europa, la gran diversidad genética detectada considerando los distintos países analizados no coincide con un salto de hospedero reciente. De hecho, se ha reportado muestras de abejas naturalmente infectadas con *N. ceranae* guardadas en Brasil del año 1975, en Estados Unidos de 1995 y en Uruguay de 1990 (Chen *et al.*, 2007; Invernizzi *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha propuesto que *N. ceranae* podría experimentar reproducción sexual y su genoma tiene claros indicios de recombinación genética (Sagastume *et al.*, 2011; Roudel *et al.*, 2013; Gomez–Moracho *et al.*, 2014) por lo que es posible que la gran diversidad genética observada sea reflejo de dichas estrategias reproductivas.

Por último, es importante considerar que en la técnica empleada para el estudio de diversidad genética se partió de un conjunto de abejas, las cuales podrían estar infectadas con distintas variantes del microsporidio. Si este fuese el caso, es posible que lo que se esté detectando sean diferencias de las variantes en conjunto que se encuentran infectando la colmena. Sin embargo, teniendo en cuenta que se detectó un patrón de amplificación en común entre muestras provenientes de distintos países y tomadas en distintos años, sería poco probable que las mismas se encontrasen infectadas con las mismas variantes.

6. CAPÍTULO 2: Virulencia de variantes de *N. ceranae* de origen español y uruguayo en la abeja *A. mellifera iberiensis*

6.1. INTRODUCCIÓN

La asociación de *N. ceranae* con los fenómenos masivos de pérdidas de colmenas ha sido ampliamente documentada en España (Higes *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009; Higes *et al.*, 2013). Sin embargo, no existe un consenso en relación a ésto en los distintos países, ya que los efectos devastadores de este microsporidio en la abeja *A. mellifera* no han podido ser comprobados (Cox-Foster *et al.*, 2007; van Engelsdorp *et al.*, 2009; Genersch *et al.*, 2010).

En este sentido, se ha comparado la infección experimental de la abeja española *A. mellifera iberiensis* con *N. ceranae* proveniente de Francia y Holanda, no siendo posible observar diferencias histopatológicas, de mortalidad y nivel de infección de las abejas infectadas con las variantes de *N. ceranae* de ambos orígenes en relación a la variante de *N. ceranae* de origen español (Dussaubat *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y que *N. ceranae* se encuentra en Uruguay hace largo tiempo y no se ha reportado muerte masiva de colmenas (Invernizzi *et al.*, 2009), en el presente capítulo se planteó estudiar la existencia de virulencia diferencial de dos variantes de *N. ceranae* provenientes de España y Uruguay en la abeja española *A. mellifera iberiensis*. Dicha virulencia se evaluó mediante análisis de la respuesta inmune de la abeja frente a la infección con ambas variantes del microsporidio, su mortalidad y nivel de infección de *N. ceranae* como medida de éxito reproductivo.

6.1.1. PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real permite la detección y cuantificación de una secuencia blanco de entre 100 y 600 pb en tiempo real, es decir a medida que transcurren los ciclos de amplificación. Esto se debe a la incorporación en la reacción de un sistema reportero cuya emisión de fluorescencia es proporcional al producto que se está amplificando y la cual es detectada por un lector del termociclador (Wong y Medrano, 2005). De esta forma, las ventajas que presenta esta técnica con respecto a la PCR convencional es que se disminuyen los riesgos de contaminación, los tiempos de trabajo (ya que no es necesario analizar los productos a posteriori), la sensibilidad es muy superior y es posible cuantificar la región o gen en estudio (Costa, 2004).

Los sistemas reporteros pueden dividirse en dos grupos dependiendo si son o no específicos de secuencia. El SYBR *Green* es una molécula que al unirse al ADN doble hebra emite fluorescencia, independientemente de la secuencia. Por tal motivo, como forma de asegurar que el producto amplificado es el deseado, es necesario analizar su temperatura de desnaturalización (T_m), temperatura en la cual el 50% de la doble hebra de ADN se encuentra desnaturalizada (Costa, 2004). De esta forma, la T_m depende del largo y de la composición nucleotídica del fragmento y aquellos fragmentos más largos y con mayor contenido GC precisarán más temperatura para desnaturalizarse. Es necesario establecer la T_m de cada fragmento a analizar y de esta forma su análisis en cada reacción permite evitar falsos positivos. Las principales ventajas de este sistema reportero es su bajo costo en relación a los sistemas específicos de secuencia y debido a que se unen al ADN doble hebra independientemente de su secuencia pueden ser empleados para la detección de distintas regiones blanco (Wong y Medrano, 2005).

Por otro lado, se encuentran los sistemas que emplean sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas en horquilla para la detección de secuencias específicas (Livak *et al.*, 1995; Whitcombe *et al.*, 1999; Bernard y Wittwer, 2000; Nazarenko *et al.*, 2002). El principio de estos sistemas reporteros consiste básicamente en la emisión de fluorescencia por una molécula donadora y su captación por una molécula aceptora o *quencher*. La separación física de ambas moléculas como consecuencia de la hibridación de la sonda con su secuencia blanco genera la emisión de fluorescencia, la cual es captada por el lector del termociclador (Wong y Medrano, 2005). Las diferencias entre estos tipos de sondas radican en el diseño de las mismas y de los cebadores empleados en la reacción y las principales ventajas en su uso son su especificidad, la posibilidad de analizar varios genes en una misma reacción y que permiten realizar análisis de genotipificación y discriminación alélica (Tyagi y Kramer, 1995; Bernard y Wittwer, 2000). Sin embargo, resultan sumamente costosas. En el presente estudio, se trabajó con sondas de hidrólisis.

Las sondas de hidrólisis (o de actividad nucleasa 5') consisten en una sonda específica de secuencia marcada en su extremo 5' con un fluoróforo donador (FAM, 6-carboxil-fluoresceína) y en su extremo 3' con un *quencher* (TAMRA, 6-carboxil-tetrametil-rodamina) que capta la energía emitida por el donador (Lee *et al.*, 1993; Livak *et al.*, 1995). En la etapa de extensión, la sonda es hidrolizada debido a la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa por lo que de esta forma el donador y el *quencher* se separan físicamente y es posible que el lector del termociclador capte la fluorescencia emitida (Holland *et al.*, 1991; Gibson *et al.*, 1996).

Durante la reacción de PCR en tiempo real se dan cuatro fases: lineal, exponencial, logarítmica y de *plateau* (Fig. 16) (Wong y Medrano, 2005). La fase lineal se da en general dentro de los primeros 10 - 15 ciclos y en esta etapa no se aprecia fluorescencia. Cuando dicha fluorescencia alcanza un valor umbral se da la fase de crecimiento exponencial, punto en el cual es posible la cuantificación del producto de interés. Este punto se define como Cp ("*crossing point*") y representa el número de copias iniciales. Posteriormente continúa una fase logarítmica en la cual la amplificación del producto se da de forma óptima alcanzando la duplicación en cada ciclo. Por último se da la etapa de *plateau* en la cual los componentes de la reacción comienzan a agotarse y por lo tanto la fluorescencia ya no es informativa (Wong y Medrano, 2005).

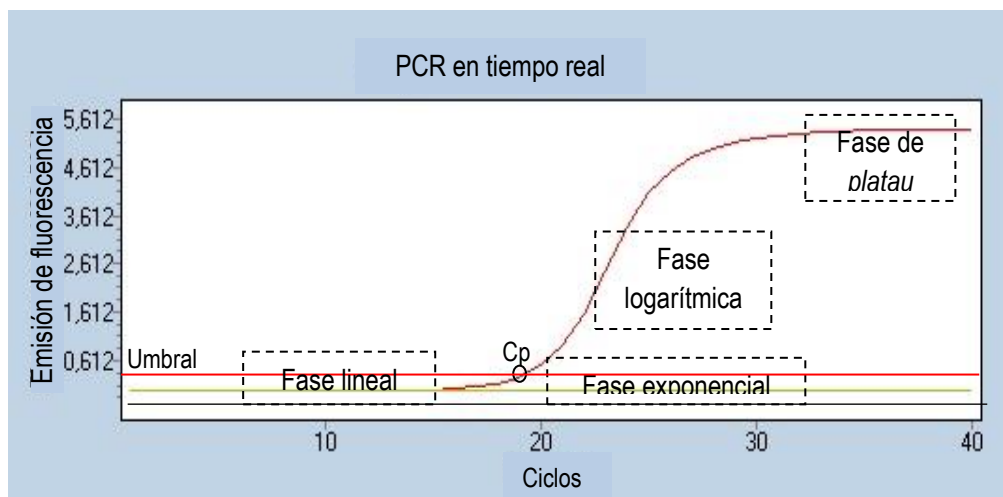


Figura 16. Fases de la reacción de PCR en tiempo real.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Muestras de *Nosema ceranae*

Las dos muestras de *N. ceranae* a emplear en los ensayos de infección se obtuvieron a partir de abejas naturalmente infectadas con el microsporidio provenientes de España y Uruguay. Los muestreos se realizaron el mismo día (21/08/2013), por técnicos de la Sección Apicultura de INIA La Estanzuela en Colonia, Uruguay y por técnicos del laboratorio de Patología Apícola del Centro Agrario Regional de Marchamalo (CAR), Castilla La Mancha, España. Cada una de las colmenas escogidas pertenecen a ambos centros y las mismas se seleccionaron debido a que presentaba altos niveles de infección con *N. ceranae*. Teniendo en cuenta que las abejas pecoreadoras son las que presentan mayor carga de esporas (Fries *et al.*, 2013), para su colecta se tapó la piquera de la colmena y se muestrearon las abejas que fueron llegando a la misma. Estas abejas se conservaron en sobres de papel a temperatura ambiente.

Las esporas de *N. ceranae* son muy sensibles a la temperatura, y su viabilidad disminuye drásticamente si las mismas no son conservadas en el hospedero. Por tal motivo, la muestra proveniente de Uruguay se envió inmediatamente a España para su procesamiento junto con la muestra de este país y de esta forma realizar los ensayos de infección en el menor tiempo posible desde el día del muestreo. Una vez en España, ambas muestras se procesaron y las esporas se purificaron según se describe en las secciones 5.2.2 y 5.2.3.

6.2.2. Cuantificación de esporas

Para el cálculo de la concentración de esporas se tomó una alícuota de 10 μ l de la suspensión obtenida según se describe en la sección 5.2.3 y se cuantificó mediante microscopía óptica 400X en cámara de Neubauer.

6.2.3. Viabilidad de esporas

Para la realización de los ensayos de infección, además de cuantificar las esporas es necesario determinar su viabilidad. Para esto se discriminó esporas vivas y muertas empleando la técnica de citometría de flujo. La identificación de las esporas se realizó en base a su tamaño y granulosidad y la discriminación entre esporas vivas y muertas se realizó mediante tinción con yoduro de propidio, agente que ingresa en aquellas esporas cuya pared se ha dañado y se intercala en el ADN. De esta forma, la detección de su fluorescencia es un indicador de esporas muertas.

Las suspensiones de esporas de España y Uruguay (10.000 esporas / μ l) se incubaron con yoduro de propidio (0,3 μ M) durante 30 minutos. Con el fin de lavar el exceso de yoduro de propidio las suspensiones se centrifugaron a 600 x g durante diez minutos y posteriormente el sedimento de esporas se resuspendió en un ml de agua m \ddot{q} estéril. Para cada muestra se realizaron duplicados y se incluyó como control negativo una suspensión de esporas previamente sometida a esterilización mediante autoclave (10.000 esporas / μ l).

Esta técnica se encontraba puesta a punto en el Servicio de Citometría de Flujo de la Universidad de Alcalá de Henares, Madrid (Sanchez - Collado *et al.*, 2014).

6.2.4. Extracción de ADN de *N. ceranae*

Para la extracción de ADN de las muestras a emplear en los ensayos de infección, las esporas se agitaron en el equipo *MagNA Lyser* (Roche Applied Science, Suiza) a máxima velocidad con perlas de cerámica durante 90 segundos con el fin de romper la pared de las mismas. Doscientos μ l de esta suspensión se emplearon para la extracción de ADN con el *kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation* (Roche Applied Science, Suiza) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante empleando el robot *MagNA Pure Compact* (Roche Applied Science, Suiza).

6.2.5. Abejas a emplear en los ensayos de infección

Para la obtención de las abejas a emplear en los ensayos de infección, se tomó un cuadro de cría cerrada con abejas prontas a emerger de una colmena sana de abejas *A. mellifera iberiensis* perteneciente al Laboratorio de Patología Apícola del CAR.

El cuadro de cría se incubó a $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ y a medida que las abejas emergieron se colocaron en jaulas de 15 – 17 abejas y se mantuvieron en incubadora a $33\pm 1\text{ °C}$. Las abejas se alimentaron diariamente *ad libitum* con jarabe de sacarosa 50 % en agua destilada estéril y 2% de Promotor L (Calier Lab) (Fig. 6).

Con el fin de evaluar el estado sanitario de estas abejas se analizó la presencia de:

- 1) *Nosema* spp. Para esto, 20 abejas de las jaulas se procesaron según se describe en la sección 5.2.2 y 500 μl del homogeneizado obtenido se empleó para la extracción de ADN empleando el *kit* de extracción de ácidos nucleicos *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit 1* (Roche, Suiza) según instrucciones del fabricante en el robot *MagNA Pure Compact* (Roche, Suiza). La ausencia de infección de estas abejas con *N. ceranae* y *N. apis* fue corroborada mediante una *triplex* PCR, la cual es una modificación de la *multiplex* PCR utilizada en el Capítulo 1, incorporándose en este caso un control interno de extracción ADN que consiste en la amplificación de un fragmento de 119 pb de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) de la abeja (Martín–Hernández *et al.*, 2009). En este caso, la mezcla de reacción consistió en 0,4 mM de cada *Nosema* spp. cebador (321–APIS– F/R y 218-MITOC-F/R), 0,03 mM de los cebadores COI-F (5'-GGGTCCAAGACCAGGAACTGGAT-3') y COI-R (5'-GCGCGGAAATTCCTGATATATGAAGAGAAAA-3'), 0,2 mg ml⁻¹ de BSA, 0,1% Triton X-100, 25 μl de *Fast Start PCR Master mix* (Roche Diagnostic, Suiza) y 5 μl de ADN. Como control negativo se empleó agua bidestilada estéril en lugar de ADN. El programa de amplificación consistió en 10 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 61,8 °C y 45 segundos a 72°C y por último una extensión final de 7 minutos a 72 °C. La reacción de PCR se realizó en un termociclador *Mastercycler® ep gradient S* (Eppendorf). En este caso, los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis capilar en *QIAxcel* (Qiagen, Alemania) empleando el *QIAxcel DNA High Resolution Kit* (Qiagen, Alemania).

2) Los virus de mayor importancia apícola (ABPV, BQCV, DWV, KBV, y SBV) a tiempo 0 y a los 11 días post infección. Para esto, previo a la infección se tomaron diez abejas al azar y al día 11 post infección todas las abejas muertas. Dichas abejas se homogeneizaron en 5 ml de PBS 1X (NaCl 8,2 g, Na₂HPO₄ 1,7 g, KH₂PO₄ 0,41 g por litro de agua destilada) en *Stomacher 80 Lab Blender* (Seward, London UK) a máxima velocidad durante 120 segundos. El homogeneizado obtenido se centrifugó a 1500 x g durante 15 minutos a 4 °C. La extracción de ARN se realizó a partir de 400 µl del sobrenadante, empleando *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I* (Roche) según las instrucciones pautadas por el fabricante en el equipo *MagNA Pure Compact* (Roche). El ADN co-extraído se digirió con DNasa (*RNase – Free DNase Set*, Qiagen, Hilden, Alemania) y el ARN obtenido se retrotranscribió a ADNc mediante el *kit QuantiTect Reverse Transcription* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se diluyó diez veces en agua destilada estéril.

La detección de los virus se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real. Para esto se emplearon sondas específicas de hidrólisis *Taqman* para la detección de cada virus y β-actina, gen de expresión constitutiva de la abeja cuya amplificación se empleó para comprobar la correcta extracción de ARN (Tabla 4). Para la detección de los virus y de la β-actina la mezcla de reacción consistió en 0,3 µM de cada cebador, 0,1 µM de la sonda, 10 µl *Light Cycler Master Mix* y 5 µl de ADNc en un volumen final de 20 µl. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y se incluyó un control negativo para cada una de ellas el cual consistió en agua bidestilada estéril en lugar del ADNc. Las condiciones de ciclado fueron 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 10 seg a 95 °C y 40 seg a 60 °C y por último 30 seg a 40 °C. Las reacciones se realizaron en un termociclador *Light Cycler*® 480 (Roche, Suiza).

Tabla 4. Cebadores y sondas empleadas para la detección específica de los virus ABPV, BQCV, DWV, KBV, SBV y el gen de referencia β -actina mediante PCR en tiempo real. Las sondas se marcaron en su extremo 5' con FAM, 6 carboxil fluoresceína y en su extremo 3' con el *quencher* TAMRA, tetra metil carboxiroadamina.

Nombre	Secuencia	Región blanco	Referencia
β -actinaF	5'-GTATGCCAACACTGTCCTTTCTG-3'	β -actina	Martín – Hernández, comunicación personal
β -actinaR	5'-AAGAATTGACCCACCAATCCA -3'		
β -actina sonda	5'-CCTAGCACCATCCACCATGAAAATTAAGATCATC-3'		
ABPV-F	5'-TCCTATATCGACGACGAAAGACAA-3'	VP, Proteína de la cápside	Perkins K, Budge G y Boonham N, comunicación personal
ABPV-R	5'-GCGCTTTAATTCCATCCAATTGA-3'		
ABPV-sonda	5'-TTTCCCCGGACTTGAC-3'		
BQCV-F	5'-GGTGCGGGAGATGATATGGA-3'	VP, Proteína de la cápside	Chantawannakul <i>et al.</i> , 2006
BQCV-R	5'-GCCGTCTGAGATGCATGAATAC-3'		
BQCV sonda	5'-TTTCCATCTTTATCGGTACGCCGCC-3'		
DWV-F	5'-CCTGGACAAGGTCTCGGTAGAA-3'	ribosome dependent RNA polymerase	Chantawannakul <i>et al.</i> , 2006
DWV-R	5'-ATTCAGGACCCACCCAAAT-3'		
DWV-sonda	5'-CATGCTCGAGGATTGGGTCGTCGT-3'		
KBV-F	5'-ACCAGGAAGTATCCCATGGTAAG-3'	Proteína estructural	Perkins K, Budge G y Boonham N, comunicación personal
KBV-R	5'-TGGAGCTATGGTTCCGTTCCAG-3'		
KBV-sonda	5'-CCGCAGATAACTTAGGACCAGATCAATCACA-3'		
SBV-F	5'-AAGTTGGAGGCGCGyAATTG-3'	Poliproteína	Chantawannakul <i>et al.</i> , 2006
SBV-R	5'-CAAATGTCTTCTTACdAGAGGyAAGGATTG-3'		
SBV-sonda	5'-CGGAGTGGAAGAT-3'		

6.2.6. Ensayos de infección de abejas *Apis mellifera* con *Nosema ceranae*

Los ensayos de infección se realizaron en el Laboratorio de Patología Apícola del CAR. Para esto se emplearon abejas de ocho días de edad. Las abejas de seis jaulas se infectaron con la variante de *N. ceranae* de origen español, las de otras seis jaulas con la variante de origen uruguayo y las abejas de otras seis jaulas se mantuvieron como grupo control sin infectar. Para esto, las abejas se anestesiaron con CO₂ al 15% y se infectaron de forma individual con dos µl conteniendo una suspensión de 100.000 esporas. Las abejas pertenecientes al grupo control se manipularon de igual manera que las infectadas con *N. ceranae*, pero en lugar de la suspensión de esporas se les administró un volumen equivalente de agua destilada estéril (Fig. 17). Posteriormente, las abejas se colocaron en sus respectivas jaulas, se incubaron a 33 ± 1 °C y se alimentaron diariamente *ad libitum* con jarabe de sacarosa 50% en agua destilada estéril y 2% de Promotor L (Calier Lab).

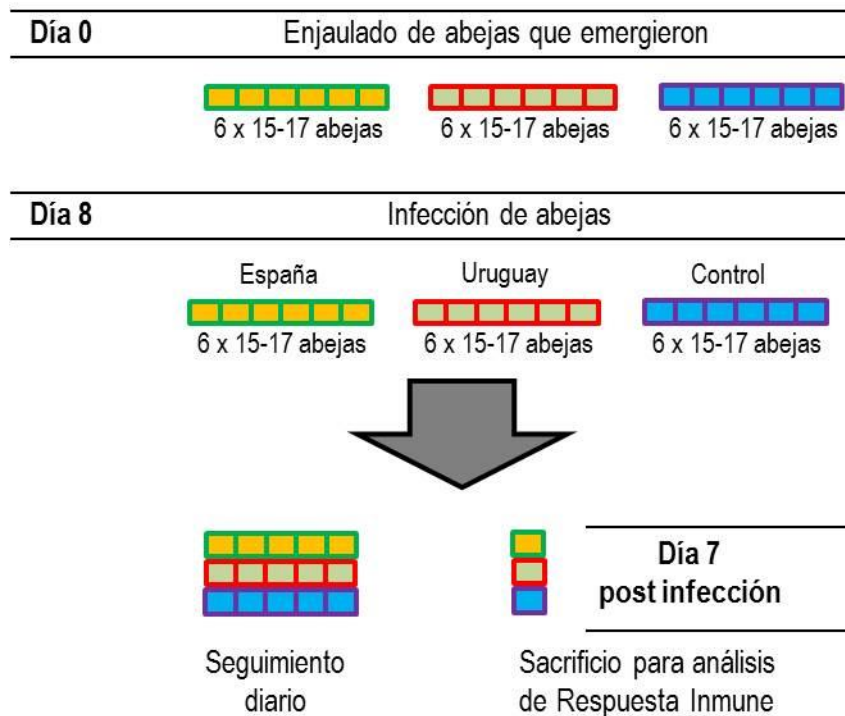


Figura 17. Diseño del experimento para evaluar la mortalidad, nivel de infección y respuesta inmune de las abejas infectadas con las variantes de *N. ceranae* de origen español, uruguayo y las abejas del grupo control sin infectar.

6.2.7. Mortalidad de las abejas infectadas

Las abejas de cinco jaulas de cada tratamiento y de cinco jaulas del grupo control se inspeccionaron diariamente. Se registró el número de individuos muertos en una tabla de datos y los mismos se removieron de sus jaulas. Para el procesamiento de los datos, se eliminaron aquellas abejas que murieron en el primer día ya que dichas muertes se asociaron al proceso de manipulación.

Se graficaron y analizaron las curvas de sobrevivencia entre las distintas réplicas de cada tratamiento empleando el análisis de sobrevivencia de Kaplan Meier. Dicho análisis computa las probabilidades condicionales de ocurrencia de los distintos eventos a determinado tiempo a lo largo de la curva de sobrevivencia (Goel *et al.*, 2010). Posteriormente, la existencia de diferencias significativas entre las réplicas de cada tratamiento se evaluó mediante el test de Log Rank planteando como hipótesis nula que no existen diferencias en el tiempo de sobrevivencia de las mismas. En aquellos tratamientos en los que se evidenció la existencia de diferencias significativas entre réplicas se evaluó entre cuál de ellas había diferencias mediante el test de Bonferroni y se eliminó aquellas cuya curva de sobrevivencia presentó diferencias significativas con el resto de sus pares. Posteriormente, se eligió al azar una curva de cada tratamiento y se analizó la existencia de diferencias entre los mismos según el procedimiento descrito previamente. Para todos los análisis se empleó el *Software SigmaStat* y se consideró un nivel de confianza de 95 %.

6.2.8. Nivel de infección de las abejas infectadas

Se evaluó el nivel de infección de aquellas abejas que murieron al día 10 post infección. Para esto, las abejas se homogeneizaron de forma individual en 200 μ l de agua destilada estéril y una alícuota de dicho homogeneizado se empleó para la cuantificación de esporas según se describe en la sección 6.2.2. Posteriormente, se compararon los niveles de infección entre las abejas sometidas a los dos tratamientos de acuerdo a lo establecido en la sección de Análisis Estadísticos.

Al finalizar el ensayo se analizaron las abejas del grupo control para determinar si estaban infectadas con *N. ceranae*, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.2.2.

6.2.9. Evaluación de la respuesta inmune de la abeja frente a la infección con *N. ceranae*

Con el fin de analizar si las variantes de *N. ceranae* provenientes de España y Uruguay generaron una respuesta inmune diferencial en las abejas infectadas, se evaluó la expresión de genes vinculados a la inmunidad de la abeja y del gen *vitelogenina*.

6.2.9.1. Extracción de ARNm y obtención de ADNc

Doce abejas de una jaula correspondiente a cada tratamiento así como de 12 abejas de una jaula del grupo control se sacrificaron a los siete días post infección y las mismas se mantuvieron a -80 °C con el fin de evitar la degradación del ARNm. Dichas abejas se homogeneizaron individualmente con *Qiazol Lysis Reagent* (Qiagen, Hilden, Alemania) con bolas de cerámica en el equipo *MAGNA Lyser* (*Roche Applied Science*, Suiza) a máxima velocidad durante 90 segundos. El ARN se extrajo empleando el *kit RNeasy Lipid Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania). Se incluyó un paso de digestión de ADN genómico que pudiera haber sido co-extraído con el ARN, empleando el *DNase – Free DNase Set* (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN extraído se retrotranscribió a ADNc mediante el *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) según instrucciones del fabricante y el ADNc obtenido se diluyó diez veces en agua destilada estéril. Se almacenó a -20 °C.

6.2.9.2. PCR en tiempo real

Se evaluó la expresión de los genes *abaecina*, *birc5*, *defensina*, *glucosa deshidrogenasa*, *himneoptecina*, *imd*, *lisozima*, *profenol oxidasa* y *vitelogenina* mediante la técnica de PCR en tiempo real. Como genes de referencia se emplearon los genes de expresión constitutiva de la abeja *β -actina* y *rps5* (proteína ribosomal S5) (Tabla 5). Además, con el fin de confirmar que las abejas infectadas con esporas de *N. ceranae* estuviesen infectadas y corroborar la ausencia de esporas en el grupo control sin infectar, se analizó la expresión del gen que codifica para la subunidad tres del filamento polar de *N. ceranae* (*ptp3*), gen que se expresa principalmente en la fase de meronte (Tabla 5).

El método de detección de los productos amplificados varió según el gen a analizar, empleándose *SYBR Green* y sondas específicas de hidrólisis *Taqman*. Teniendo en cuenta estos dos sistemas reporteros, se emplearon dos condiciones de ciclado y mezclas de reacción (Tabla 4):

1) Para el análisis de la expresión de los genes *abaecina*, *defensina*, *glucosa deshidrogenasa*, *himenoptecina*, *lisozima*, *profenol oxidasa* y *vitelogenina* se empleó *SYBR Green* como molécula reportera y en estos casos la mezcla de reacción consistió en 0,5 μM de cada cebador, 10 μl de *Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Mix* y 5 μl de ADNc en un volumen final de 20 μl . Para el análisis de expresión del gen *imd* la concentración de los cebadores fue de 0,2 μM . El programa de ciclado en ambos casos fue de 5 minutos a 95 °C, etapa de amplificación de 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 60 °C y 10 segundos a 72 °C, etapa de desnaturalización de 5 segundos a 95 °C, 1 minuto a 65 °C y aumento progresivo hasta 97 °C y por último una etapa de enfriamiento de 30 segundos a 40 °C.

2) En aquellas reacciones en las cuales se empleó como molécula reportera una sonda específica, se emplearon dos mezclas de reacción dependiendo del producto de expresión a analizar. Para el análisis de la expresión del gen *birc5* la mezcla de reacción consistió en 0,3 μM de cada cebador, 0,1 μM de la sonda, 10 μl de *Light Cycler 480 Probes Master* y 5 μl de ADN en un volumen final de 20 μl . Para el análisis de la expresión del gen *ptp3* la mezcla de reacción consistió en 0,5 μM de cada cebador, 0,5 μM de la sonda, 10 μl de *Light Cycler 480 Probes Master* y 2,5 μl de ADN en un volumen final de 20 μl . En ambos casos, el programa de ciclado fue de 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C y 40 segundos a 60 °C y una etapa final de 30 segundos a 40 °C.

Todas las reacciones se realizaron en el equipo *Light Cycler 480 Real time PCR System* (Roche).

En cada reacción se incluyeron controles negativos y cuatro diluciones seriadas de una de las muestras para el cálculo de la eficiencia de reacción.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el método de Pfaffl (2001) empleando la media geométrica de los valores obtenidos de la β -actina y *rps-5* como genes de referencia. Posteriormente los resultados se sometieron a análisis estadísticos según se describe a continuación.

Tabla 5. Cebadores y sondas empleados para los análisis de expresión de los genes vinculados con la inmunidad de la abeja y de la vitelogenina mediante PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia primers	Secuencia Blanco	Condiciones de ciclado	Referencia
β -actina F	5'-ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG-3'	β -actina	1	Yang y Cox-Foster (2005)
β -actina R	5'-GACCCACCAATCCATACGGA-3'			
RPS5 F	5'-AATTATTTGGTCGCTGGAATTG-3'	proteína ribosomal S5	1	Evans (2006)
RPS5 R	5'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA-3'			
Aba-F	5'-CAGCATTGCGATACGTACCA-3'	abaecina	1	Evans (2006)
Aba-R	5'-GACCAGGAAACGTTGGAAAC-3'			
Def-R	5'-TGTCGGCCTTCTCTTCATGG-3'	defensina	1	Yang y Cox-Foster (2005)
Def-R	5'-TGACCTCCAGCTTTACCCAAA-3'			
Hym-F	5'-CTCTTCTGTGCCGTTGCATA-3'	himenoptecina	1	Evans (2006)
Hym-R	5'-GCGTCTCCTGTCATTCCATT-3'			
Vg-F	5'-AGTTCCGACCGACGACGA-3'	vitelogenina	1	Corona et al. (2007)
Vg-R	5'-TTCCCTCCCACGGAGTCC-3'			
GLD-F	5'-CTGCACAACCAGTCTCGTT-3'	glucosa deshidrogenasa	1	Yang y Cox-Foster (2005)
GLD-R	5'-ACCGCCGAAGAAGATTTGG-3'			
PO-F	5'-AATCCATTACCTGAAATTGATGCTTAT-3'	profenol oxidasa	1	Yang y Cox-Foster (2005)
PO-R	5'-TAATCTTCCAATAATTCATACGCTCTT-3'			
Lis-F	5'-ACACGGTTGGTCACTGGTCC-3'	lisozima	1	Yang y Cox-Foster (2005)
Lis-R	5'-GTCCCACGCTTTGAATCCCT-3'			
IMD F	5'-TGTTAACGACCGATGCAAAA-3'	imd	1	Evans (2006)
IMD R	5'-CATCGCTCTTTTCGGATGTT-3'			
Birc5 F	5'-CTTCTGACAATTCGTGCAATCC-3'	deterina	2	Martín-Hernández, comunicación personal
Birc5 R	5'-GGGTTCTTTCTTACCACCCACTAC-3'			
Birc 5 sonda	5'-AGCGGATGGCTGCTGCTGGTTTT-3'			
PTP F	5'-TGCTGATGTTATGGCTACAGAAG-3'	filamento polar 3	2	Martín – Hernández, comunicación personal
PTP R	5'-TACAGATTGCGCTGCTTTAA-3'			
PTP sonda	5'-GCCAGGAA-3'			

6.2.10. Análisis estadísticos

En primer lugar se descartaron aquellos valores *outliers* con el criterio que estuviesen fuera del rango de la media del tratamiento ± 2 desvíos estándar. Posteriormente se evaluó si las variables en estudio cumplían con los supuestos básicos de estadística paramétrica: aleatoriedad, normalidad (Test de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (Test de Levene) (Sokal y Rohlf, 1979).

Posteriormente se analizaron las diferencias entre los tratamientos. En aquellos casos en que las distribuciones cumplieron con dichos supuestos se empleó el test de Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación entre medias de los tratamientos. En los casos en que se encontraron diferencias, se evaluó posteriormente mediante el Test de Scheffé entre qué grupos se dieron dichas diferencias. En los casos en que fue necesario emplear estadística no paramétrica se comparó las medianas entre grupos mediante el Test de Kruskal–Wallis con posterior comparación entre grupos empleando el Test de Man Whitney.

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el *Software Statistica* versión 7.0 estableciéndose un nivel de confianza del 95 %.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Muestras de *Nosema ceranae* a emplear en los ensayos de infección

Una vez que la muestra de abejas naturalmente infectadas con *N. ceranae* proveniente de Uruguay arribó al laboratorio de Patología Apícola del CAR, se procesó junto con la muestra de abejas infectadas con *N. ceranae* de España, se purificaron las esporas y se prepararon suspensiones de 50.000 esporas / μl de cada una de las mismas.

Se comprobó mediante *multiplex* PCR que en ambos casos se trataba de una suspensión pura de esporas de *N. ceranae* (Fig. 18).

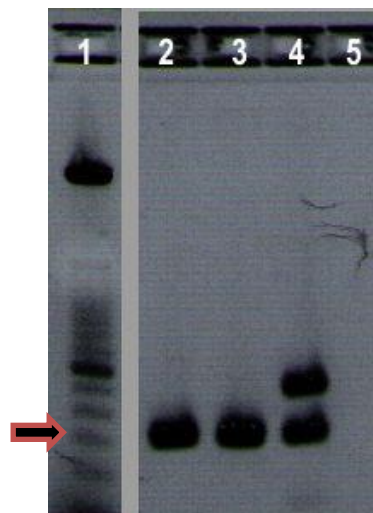


Figura 18. Gel de agarosa de los productos obtenidos mediante *multiplex* PCR de las variantes de *N. ceranae* de origen español y uruguayo a emplear en los ensayos de infección. (1) Marcador de peso molecular QX Alignment Marker 15 pb / 500 pb (Qiagen); (2) *N. ceranae* proveniente de España; (3) *N. ceranae* proveniente de Uruguay; (4) Control positivo de *N. ceranae* y *N. apis*; (5) Control negativo. La flecha indica el producto de 218 pb correspondiente a *N. ceranae*.

La caracterización genética de las muestras de *N. ceranae* empleadas en los ensayos de infección y su comparación con los análisis realizados en el Capítulo 1 de esta tesis permitió observar que al incluir estas dos muestras, los grupos A y B se mantuvieron, mientras que dentro del grupo C se formaron tres subgrupos: C1, C2 y C3 con apoyo de nodo de 92, 92 y 91 respectivamente (Fig. 19). La muestra de *N. ceranae* de España empleada en los ensayos de infección quedó incluida dentro del subgrupo C1, mientras que en el caso de la muestra de Uruguay quedó por fuera de este grupo evidenciando que son distintas genéticamente.

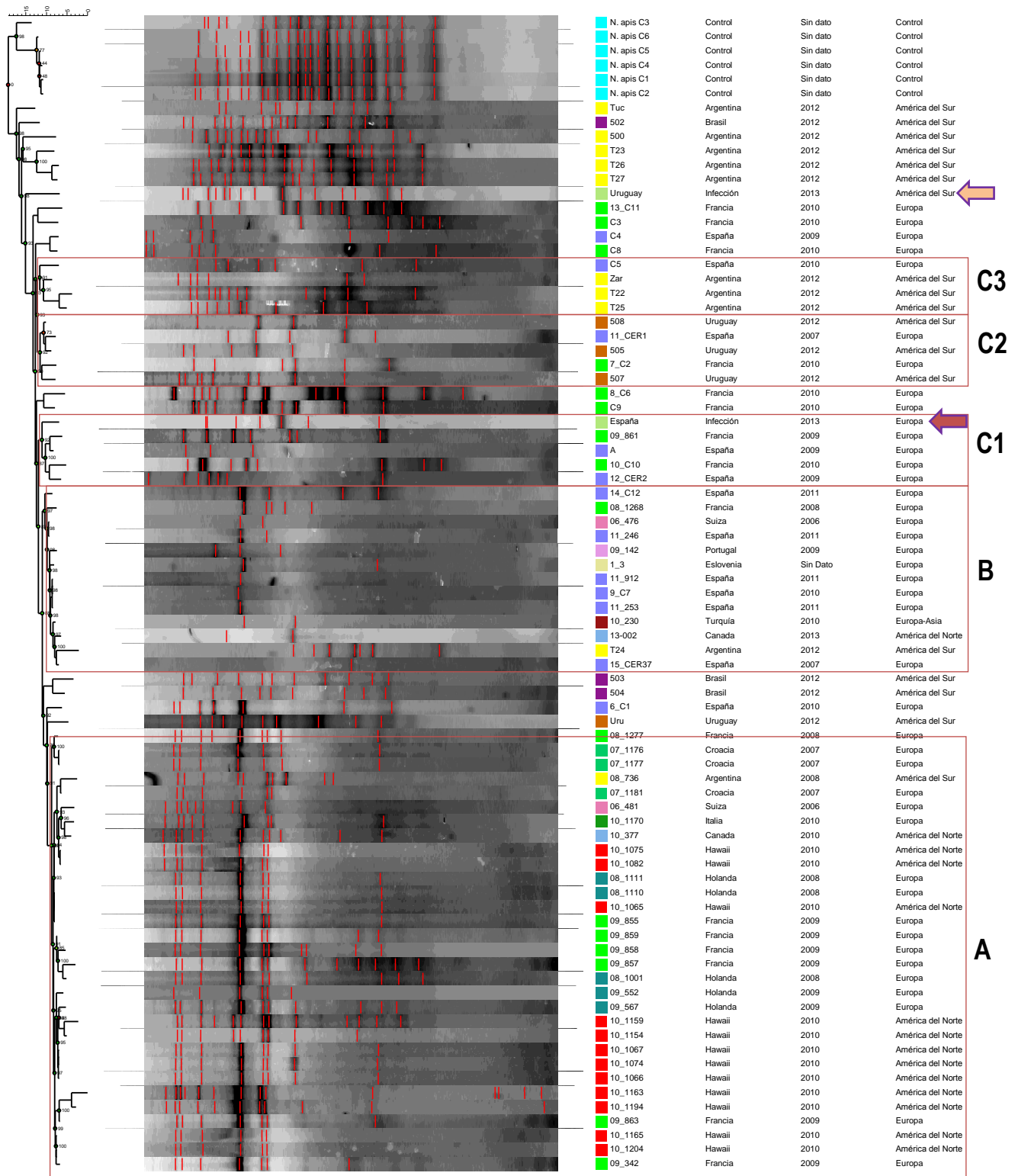


Figura 19. Cladograma de la colección de muestras de *N. ceranae* y las muestras provenientes de España (➡) y Uruguay (➡) empleadas para los ensayos de infección. El método de agrupamiento filogenético empleado fue Neighbour Joining. Cada región geográfica se muestra con un color diferente y el apoyo del nodo se representa en colores verdes para aquellos casos en que el valor del agrupamiento fue alto y en degradé hacia el rojo a medida que el respaldo del agrupamiento disminuyó. Se incluyeron seis muestras de *N. apis* como grupo externo.

Los análisis de viabilidad de las esporas empleadas en los ensayos de infección evidenciaron que el 99% y 98,5% de las esporas de *N. ceranae* provenientes de España y Uruguay respectivamente se encontraban viables. Estos resultados fueron reproducibles en ambas réplicas y en el caso del control negativo (esporas previamente esterilizadas mediante autoclave) todas las esporas fueron no viables (Fig. 20).

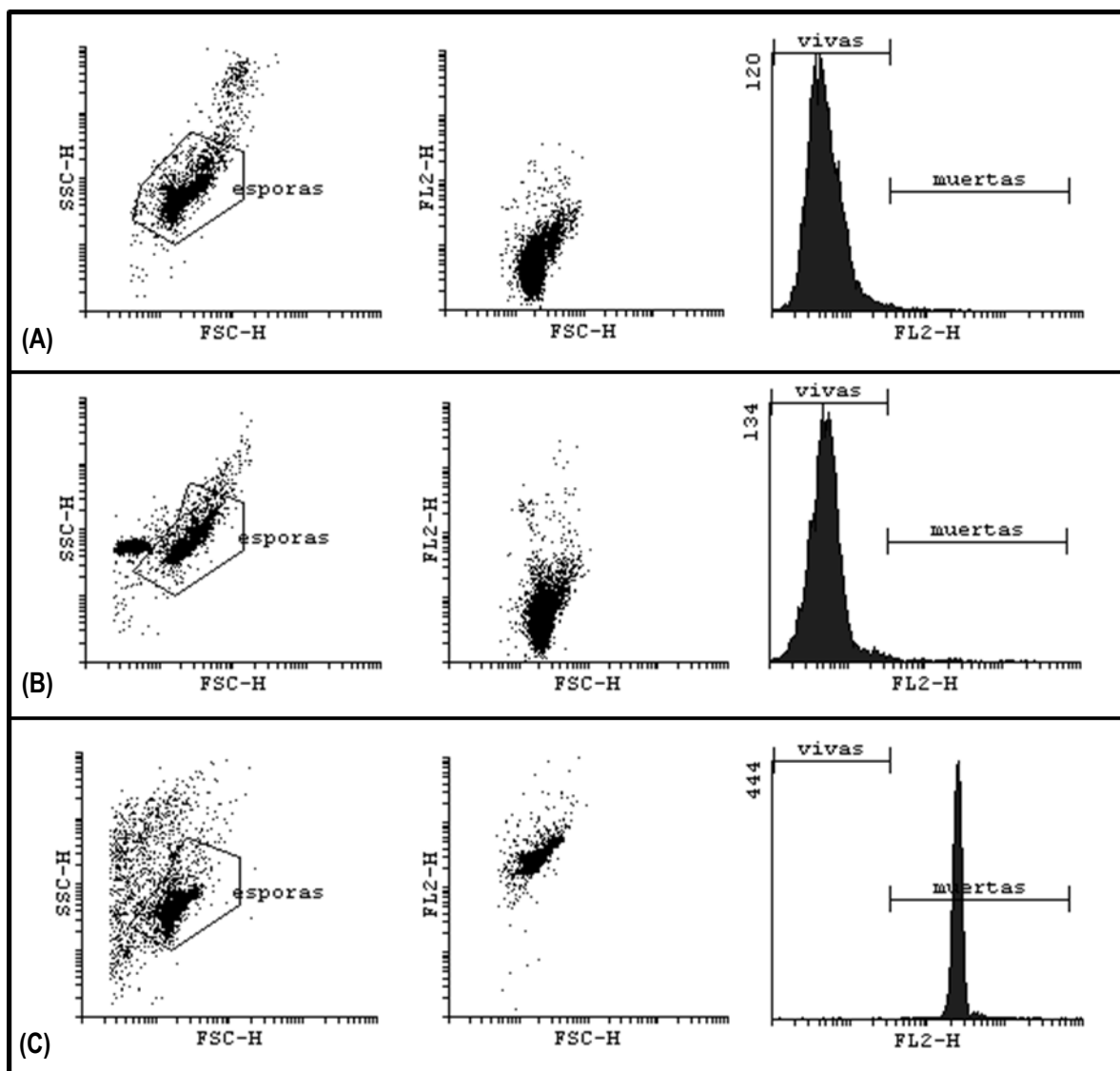


Figura 20. Análisis de viabilidad mediante citometría de flujo de (A) esporas de origen español a emplear en los ensayos de infección; (B) esporas de origen uruguayo a emplear en los ensayos de infección, y (C) control negativo (esporas esterilizadas mediante autoclave). Los parámetros de cada evento (esporas) se basan en su identificación mediante el análisis de su tamaño (FSC), complejidad (SSC) y detección de fluorescencia del yoduro de propidio (laser de Argón, emisión de 480 nm). Los polígonos representan la subpoblación de esporas establecida según estudios preliminares.

6.3.2. Estado sanitario de las abejas empleadas en los ensayos de infección

Las abejas empleadas en los ensayos de infección se encontraban libres de *N. ceranae* y *N. apis*, de acuerdo a los resultados de la *triplex* PCR (Fig. 21)

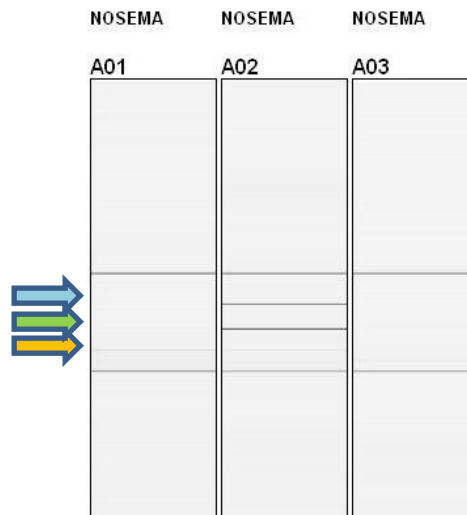





Figura 21. Electroforesis capilar de *triplex* PCR para la detección un fragmento específico de la SSUrRNA de *N. ceranae* y *N. apis* y de un fragmento de la citocromo oxidasa I de la abeja como control de extracción de ADN. (1) Abejas a emplear en los ensayos de infección; (2) Control positivo de COI-COII (), *N. ceranae* () y *N. apis* (); (3) Control negativo.

Por otro lado, los análisis de PCR en tiempo real para la detección de los distintos virus permitieron comprobar que las abejas empleadas en los ensayos de infección al día 0 estaban sanas, ya que no fue posible observar amplificación de los fragmentos específicos correspondientes a ninguno de los virus en análisis (ABPV, BQCV, DWV, KBV y SBV).

En cuanto a los distintos tratamientos al día 11 post infección, tampoco se observó amplificación correspondiente al ABPV, DWV, KBV y SBV, siendo la única excepción el virus BQCV en el tratamiento de abejas infectadas con *N. ceranae* de España cuyas réplicas mostraron amplificación en el ciclo 36 aproximadamente, indicando que la carga viral era muy baja. La amplificación positiva del ADNc correspondiente al gen que codifica para la β -actina permitió comprobar que en todas las muestras fue posible extraer ARN (Anexo 2).

Es importante destacar que durante el experimento llamó la atención que las abejas tanto infectadas como no infectadas mostraron un comportamiento particular: estuvieron nerviosas y con movimientos vigorosos y temblorosos.

6.3.3. Mortalidad de las abejas infectadas

A partir del registro diario del número de abejas muertas en cada tratamiento se evaluó la existencia de diferencias entre las cinco réplicas de cada uno, considerando las curvas de sobrevivencia hasta el día 11. En el tratamiento de las abejas infectadas con la variante de España se eliminó una réplica mientras que en el tratamiento control se eliminaron dos réplicas debido a que en ambos casos hubo diferencias significativas con sus pares. De esta forma, se obtuvieron tres tratamientos cuyas réplicas presentaron curvas de sobrevivencia similares entre sí (Log Rank Test, tratamiento control negativo: $p=0,35$; tratamiento España: $p=0,5$; tratamiento Uruguay $p=0,46$) y fue posible seleccionar al azar una de ellas como representativa del grupo para la comparación entre tratamientos. Las curvas de sobrevivencia de las abejas infectadas con *N. ceranae* de origen español y uruguayo, y el grupo control fueron similares, no mostrando diferencias significativas entre sí (Log Rank Test, $p=0,2$) (Fig. 22).

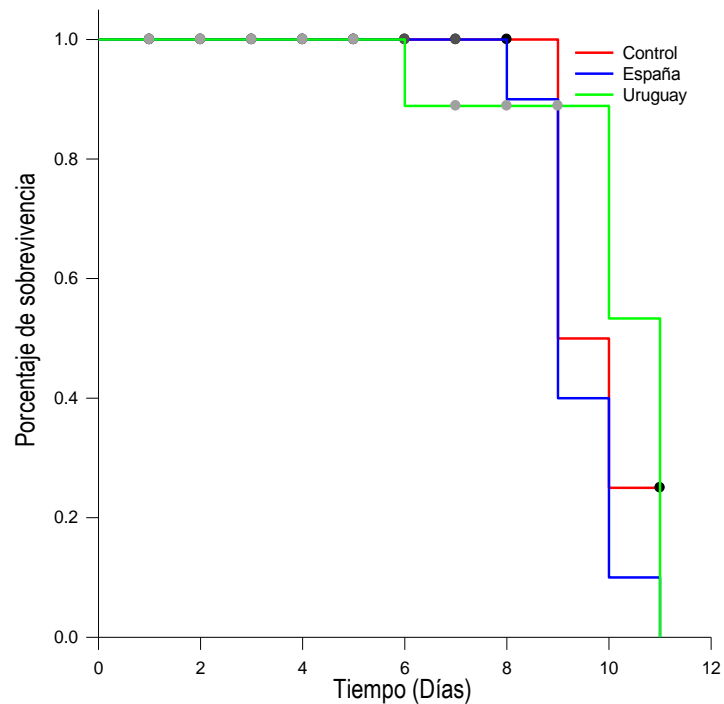


Figura 22. Curvas de sobrevivencia mediante el método de Kaplan-Meier de los tres tratamientos (abejas infectadas con variante de *N. ceranae* de origen español, *N. ceranae* de origen uruguayo y grupo de abejas control sin infectar) considerando una curva representativa de cada uno de ellos.

6.3.4. Nivel de infección de las abejas infectadas

Ninguna de las abejas pertenecientes al grupo control sin inocular mostró presencia de esporas de *N. ceranae* por lo que se comprobó que no hubo contaminación durante las distintas etapas del ensayo.

Por otro lado, en el día 10 post infección el nivel de infección de las abejas inoculadas con la variante de *N. ceranae* de origen español fue significativamente mayor en relación a las infectadas con la variante uruguaya (Man Whitney España - Uruguay, $p < 0,001$) (Fig. 23).

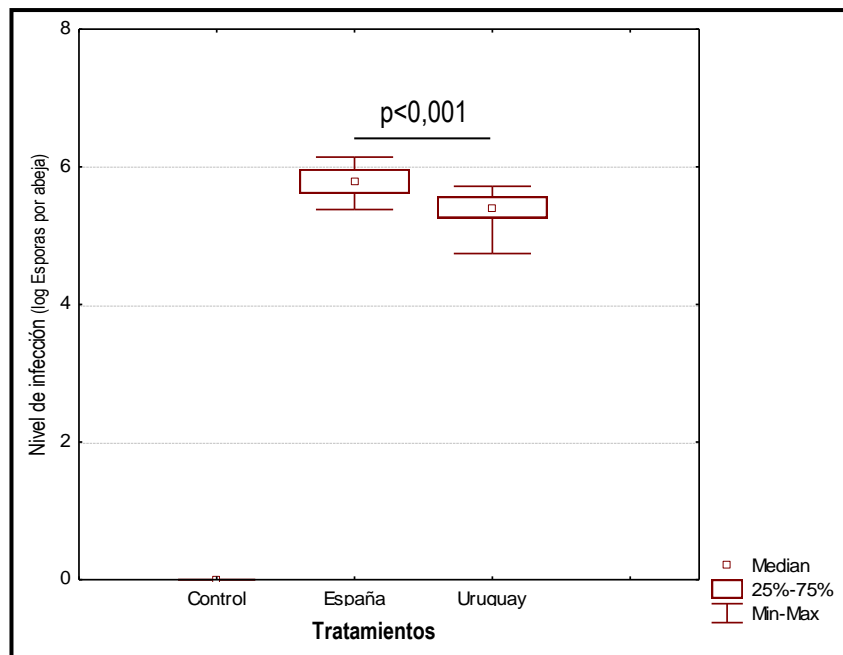


Figura 23. Nivel de infección de las abejas pertenecientes a cada tratamiento (abejas infectadas con variante de *N. ceranae* de origen español, *N. ceranae* de origen uruguayo y grupo de abejas control sin infectar) al día 10 post infección.

6.3.5. Respuesta inmune de la abeja frente a la infección con *Nosema ceranae*

Se evaluó la expresión de los genes involucrados en la inmunidad humoral y celular de las abejas infectadas con *N. ceranae* de distintos orígenes así como de las abejas del grupo control sin infectar. En todas las muestras analizadas se extrajo el ARN y se retrotranscribió y en todas ellas fue posible observar amplificación tanto de la β -actina como del RPS5 (Anexo 2).

Por otro lado, se confirmó que todas las abejas infectadas con las variantes de *N. ceranae* de origen español y uruguayo efectivamente estuvieron infectadas, ya que en todos los casos se observó amplificación correspondiente a la expresión del gen que codifica para el filamento polar de dicho microsporidio. En el caso de las abejas del grupo control, en ningún caso fue posible observar amplificación correspondiente a la expresión de dicho gen (Anexo 2).

Posteriormente, se analizó la expresión de los distintos genes vinculados a la inmunidad (*abaecina*, *defensina*, *deterina*, *glucosa deshidrogenasa*, *himenoptecina*, *imd*, *lisozima* y *profenol oxidasa*) y *vitelogenina*. En todos los casos se observó amplificación específica, lo cual fue corroborado por el análisis de la temperatura de desnaturalización en aquellos genes en cuya reacción se empleó *SYBR Green* como molécula reportera (Anexo 2). En ningún caso los controles negativos de la reacción de PCR en tiempo real mostraron amplificación. Por último, se realizaron los análisis estadísticos comparando los tres tratamientos.

La expresión relativa del gen *abaecina* se vio deprimida significativamente en aquellas abejas infectadas con las variantes de *N. ceranae* tanto de España como de Uruguay en relación al grupo control (Man Whitney: Control - España $p = 0,02$; Control - Uruguay $p < 0,01$; España - Uruguay $p = 0,74$) (Fig. 24).

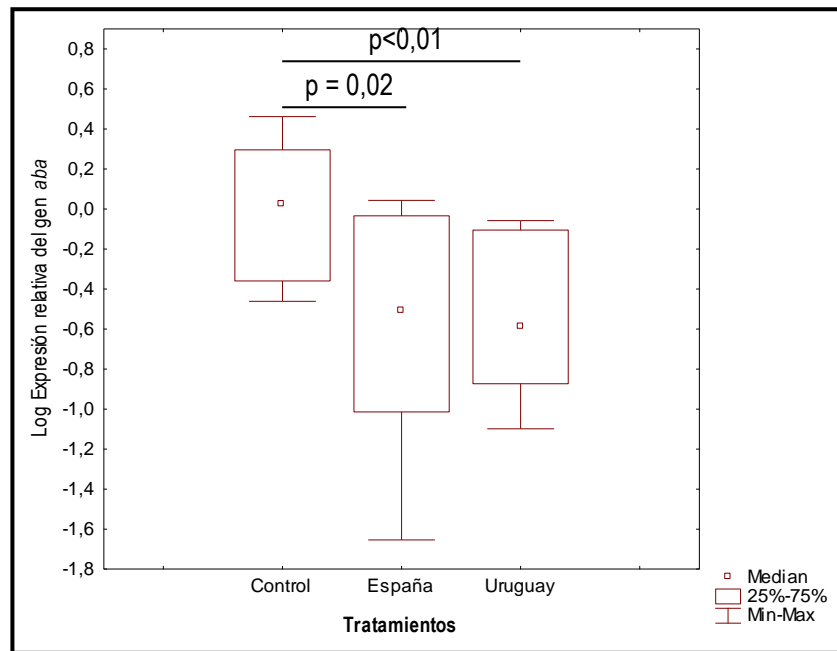


Figura 24. Expresión relativa del gen *abaecina* en función de los distintos tratamientos (abejas infectadas con variante de *N. ceranae* de origen español, *N. ceranae* de origen uruguayo y grupo de abejas control sin infectar). Kruskal Wallis, $p = 0,01$.

La expresión del gen *profenol oxidasa* presentó un patrón similar, ya que también se vio deprimida significativamente una vez que las abejas se infectaron con *N. ceranae* de ambos orígenes (Man Whitney: Control – España $p=0,02$; Control – Uruguay $p<0,01$), no habiendo diferencias entre ambos grupos infectados (Man Whitney $p=0,2$) (Fig. 25).

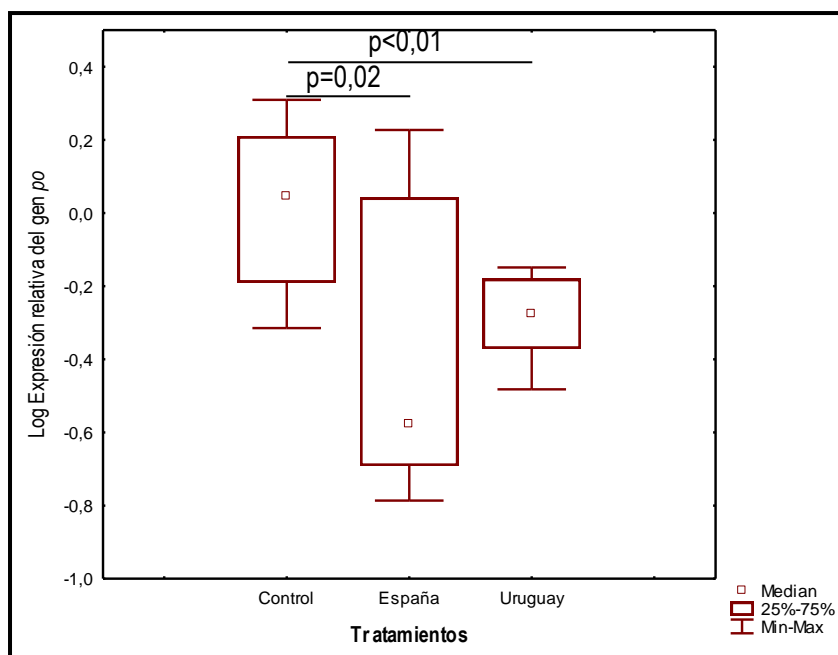


Figura 25. Expresión relativa del gen *profenol oxidasa* en función de los distintos tratamientos (abejas infectadas con variante de *N. ceranae* de origen español, *N. ceranae* de origen uruguayo y grupo de abejas control sin infectar). Kruskal Wallis, $p=0,01$.

En cuanto a la expresión del gen *birc5*, la infección causada por *N. ceranae* también generó su depresión, aunque debido a la alta variabilidad encontrada en el grupo control, la disminución fue solo significativa en el caso de *N. ceranae* proveniente de Uruguay (Man Whitney: Control – España $p=0,13$; Control - Uruguay $p<0,01$). Además, la expresión de este gen es significativamente menor en las abejas infectadas con la variante proveniente de Uruguay en comparación a la variante de origen español (Man Whitney $p=0,04$) (Fig. 26).

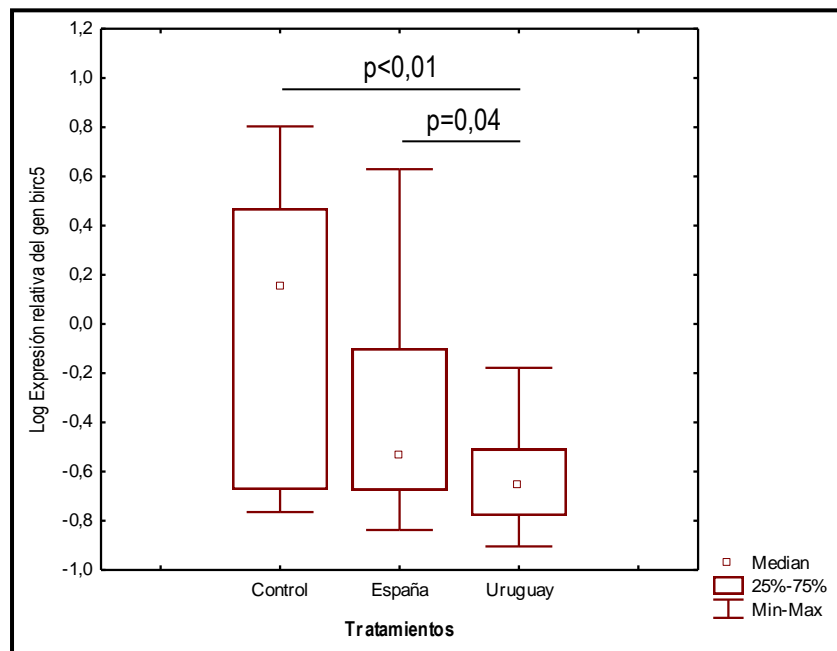


Figura 26. Expresión relativa del gen *birc5* en función de los distintos tratamientos (abejas infectadas con variante de *N. ceranae* de origen español, *N. ceranae* de origen uruguayo y grupo de abejas control sin infectar). Kruskal Wallis, $p = 0,02$.

Al igual que en el caso de *birc5*, la expresión del gen *imd* también disminuyó en los grupos de abejas infectadas con *N. ceranae* de ambos orígenes en relación al grupo control, aunque dicha disminución fue significativa solo para la variante de Uruguay (Scheffé: Control – España $p=0,52$; Control – Uruguay $p=0,03$, España – Uruguay $p=0,26$) (Fig. 27).

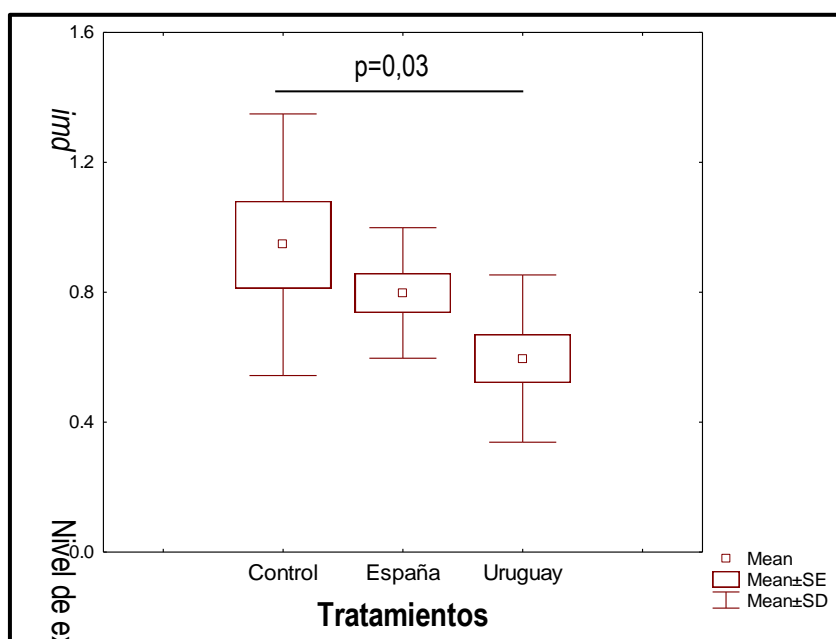


Figura 27. Expresión relativa del gen *imd* en función de los distintos tratamientos (abejas infectadas con variante de *N. ceranae* de origen español, *N. ceranae* de origen uruguayo y grupo de abejas control sin infectar). ANOVA, $p=0,03$.

La expresión del gen *lisozima* se vio estimulada una vez que las abejas fueron infectadas con la variante de *N. ceranae* de origen español (Man Whitney $p=0,01$), mientras que la variante de origen uruguayo no generó tal modificación (Man Whitney: Control – Uruguay $p=0,18$; España – Uruguay $p<0,001$) (Fig. 28).

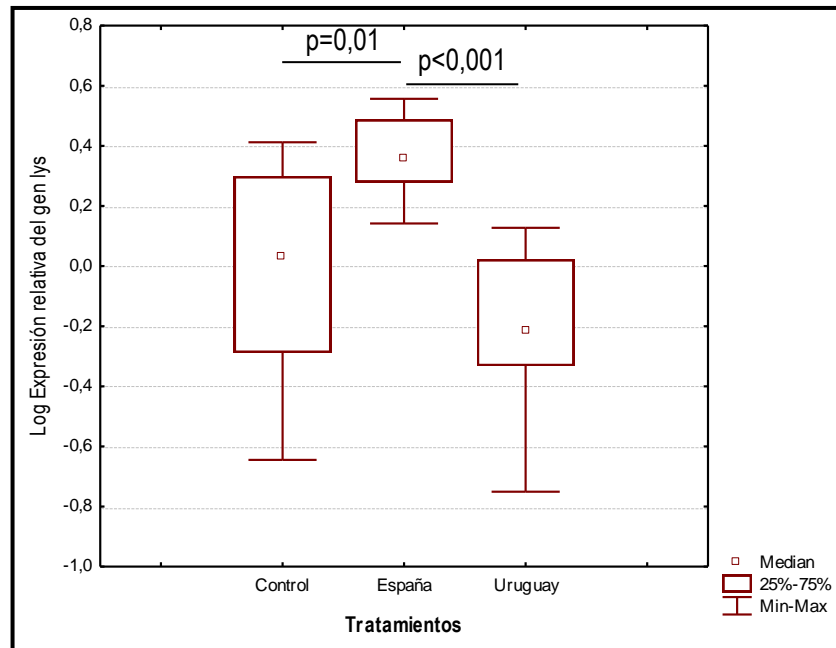


Figura 28. Expresión relativa del gen que codifica para LISOZIMA en función de los distintos tratamientos (abejas infectadas con variante de *N. ceranae* de origen español, *N. ceranae* de origen uruguayo y grupo de abejas control sin infectar). Kruskal Wallis, $p<0,001$.

Por último, la expresión de los genes *defensina*, *glucosa deshidrogenasa*, *himenoptecina* y *vitelogenina* no se vieron alteradas una vez que las abejas se infectaron con *N. ceranae* de ambos orígenes (ANOVA, *def* p=0,89; *gld*, p=0,58; *hym* p=0,55) (Kruskal Wallis, *vg* p=0,14) (Fig. 29).

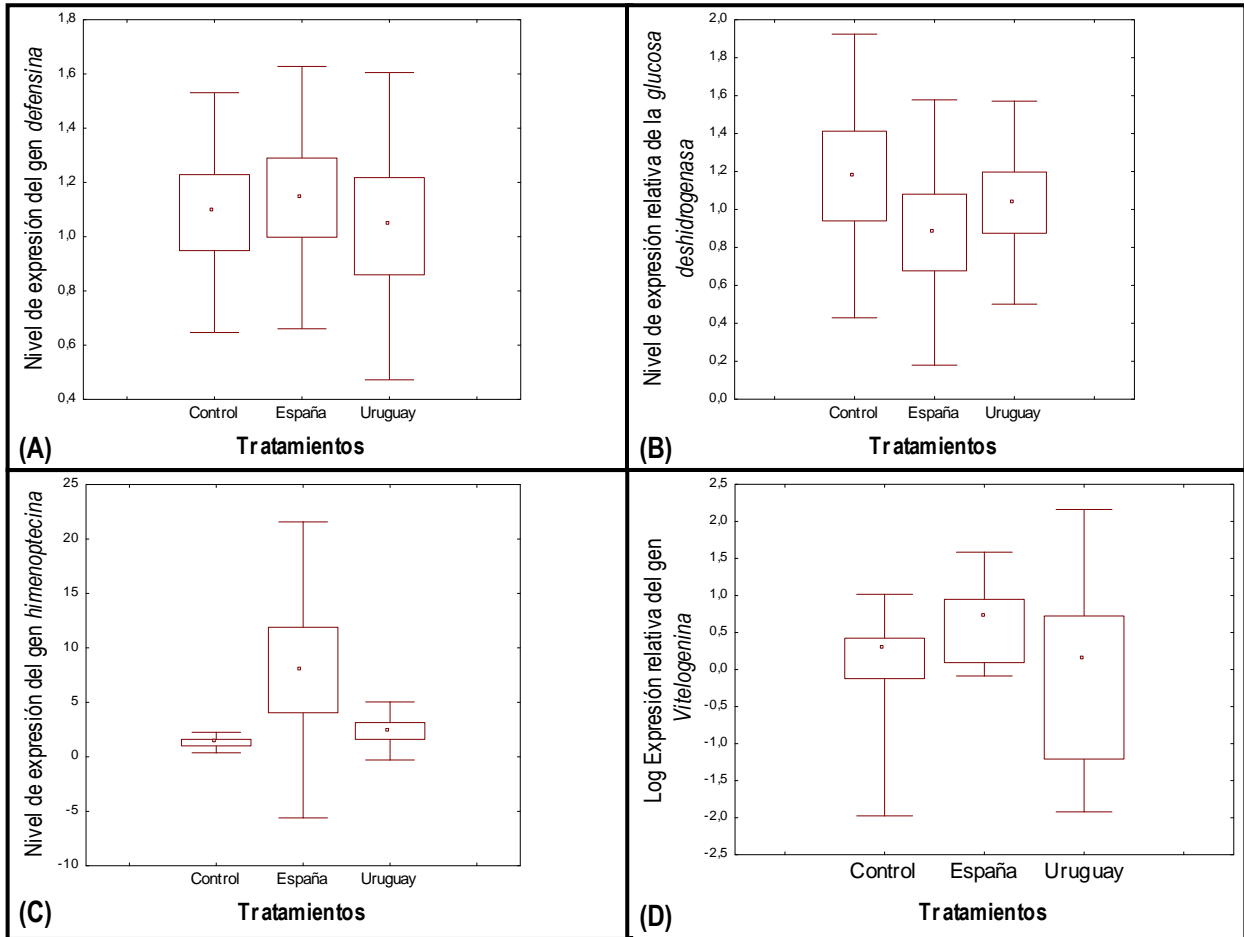


Figura 29. Expresión relativa de los genes (A) *defensina*; (B) *glucosa deshidrogenasa*; (C) *himenoptecina*; y (D) *vitelogenina* en función de los distintos tratamientos (abejas infectadas con variante de *N. ceranae* de origen español, *N. ceranae* de origen uruguayo y grupo de abejas control sin infectar).

6.4. DISCUSIÓN

La amplia distribución de *N. ceranae* y su posible vinculación con los fenómenos masivos de despoblación de colmenas es un tema de preocupación mundial (Neumann y Carreck, 2010). Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se planteó como hipótesis la existencia de distintas variantes del microsporidio asociadas a virulencia diferencial, el objetivo de este capítulo fue comparar la virulencia de variantes de *N. ceranae* provenientes de España y Uruguay. En condiciones naturales en ambos países, se dan diferencias en cuanto a la interacción de *N. ceranae* y *A. mellifera*, ya que mientras que en España se ha planteado que los efectos de la infección con el microsporidio en la abeja son devastadores (Higes *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009; Higes *et al.*, 2013), en Uruguay dicha asociación se ha dado sólo bajo condiciones ambientales puntuales y si las medidas preventivas no son puestas en práctica (Invernizzi *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2012). En este sentido, este estudio constituye una primera aproximación a esta problemática al comparar los efectos de la infección de una variante de *N. ceranae* proveniente de un país del hemisferio sur, donde no se han reportado pérdidas masivas de colmenas, con los efectos de *N. ceranae* en España.

Los análisis comparativos se abordaron analizando la interacción hospedero–patógeno tanto desde el punto de vista del éxito del patógeno, así como de la respuesta de la abeja frente a la infección (sobrevivencia de las abejas frente a la infección, respuesta inmune de las mismas y nivel de infección de *N. ceranae* al día 10 post infección).

Las abejas de todas las réplicas, independientemente del tratamiento recibido sobrevivieron como máximo 15 días. La dosis infectiva empleada en el presente trabajo y la edad en que las abejas se infectaron es comparable a estudios llevado a cabo por van der Zee y colaboradores (2014) en el cual se reportó que las abejas lograban sobrevivir períodos de tiempo más prolongados (hasta 23 días), por lo que es posible descartar que estos dos factores hayan influido en la corta vida de las abejas.

Además, el hecho que no se detectaran diferencias en la sobrevivencia de las abejas infectadas y las del grupo control, junto con el comportamiento nervioso observado durante el transcurso del experimento, dio indicios que posiblemente las abejas estuviesen siendo afectadas por factores externos a la administración experimental de las esporas de *N. ceranae*.

Teniendo en cuenta lo expuesto previamente, se realizó dos veces este experimento, pero no fue posible obtener resultados que pudieran revertir esta situación. Por lo tanto, se profundizó en los aspectos que podrían haber determinado dichos resultados. En este sentido la posibilidad que

las abejas empleadas estuviesen naturalmente infectadas con el microsporidio o se hubiesen contaminado con esporas del mismo durante el transcurso del ensayo se descartó tanto por análisis moleculares previos a la infección como por análisis microscópicos de cada abeja muerta. Por otro lado, es posible descartar que la causa de muerte del grupo control se haya dado debido a una infección viral previa a nivel de campo, ya que la ausencia de los virus de mayor importancia apícola (ABPV, BQCV, DWV, KBV y SBV) se comprobó mediante análisis moleculares.

A pesar de esto, es importante tener en cuenta que existen muchos otros patógenos cuya detección no se abordó y que las consecuencias de su infección no han sido estimadas con precisión, como es el caso del CBPV o *Chritidia mellificae* (Ravoet *et al.*, 2013; Doublet *et al.*, 2014). Por tal motivo, es posible que la razón de la muerte de las abejas del grupo sin infectar sea una infección previa con algún otro patógeno cuya detección no se llevó a cabo.

Por otro lado, teniendo en cuenta los niveles de infección por *N. ceranae*, es posible plantear que el éxito reproductivo de la variante de origen español fue mayor que la variante de origen uruguayo al día 10 post infección (hubiese sido interesante evaluar el nivel de infección de abejas vivas durante todo el ciclo infectivo, lo cual no fue posible debido a limitaciones experimentales). Dicho éxito no se vio reflejado en las curvas de sobrevivencia de las abejas sometidas a ambos tratamientos, ya que la mortalidad de las abejas fue la misma independientemente de la variante de *N. ceranae* empleada en los ensayos de infección.

En este sentido, estudios previos evaluaron la interacción entre la abeja *A. mellifera iberiensis* (empleada en el presente trabajo) y *N. ceranae* proveniente de España en comparación con variantes del microsporidio provenientes de Francia y Holanda (Dussaubat *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2014). En ninguno de los casos fue posible observar diferencias de las abejas infectadas en cuanto a su mortalidad y a nivel histopatológico, pero a diferencia del presente trabajo, los niveles de infección de ambas variantes de *N. ceranae* fueron similares, lo cual estaría indicando que en ambos estudios el éxito del patógeno es comparable y su patogenicidad es similar. Teniendo en cuenta que las variantes de *N. ceranae* de España, Francia y Holanda poseen una ubicación geográfica más cercana, es posible que las mismas sean genéticamente más similares entre sí y compartan más características de su virulencia.

Teniendo en cuenta que en el presente estudio las abejas infectadas con *N. ceranae* de origen uruguayo sobrevivieron tanto como las infectadas con la variante de origen español, aún con menores niveles de infección es posible proponer que este hecho sea una consecuencia de la infección de la abeja *A. mellifera iberiensis* con una variante novedosa y distinta genéticamente como lo es la uruguayana. Esta hipótesis se respalda también por los resultados obtenidos a partir

del análisis de la respuesta inmune de la abeja, los cuales evidenciaron que dicho organismo no es capaz de defenderse de igual manera cuando es infectada con ambas variantes de *N. ceranae*, siendo la infección con *N. ceranae* de origen uruguayo la que causa una mayor inmunodepresión.

La inmunodepresión debido a la infección con *N. ceranae* ya ha sido descrita por Antúnez y colaboradores (2009) y Chaimanee y colaboradores (2011). En este caso se vio reflejada en la expresión de genes involucrados tanto a nivel humoral como celular. Por un lado la expresión del gen que codifica para la ABAECINA (péptido antimicrobiano) disminuyó significativamente, mientras que lo mismo sucedió con la expresión del gen *imd* en las abejas infectadas con la variante de *N. ceranae* de origen uruguayo, gen cuyo producto está involucrado en los primeros pasos de la cascada de señalización que desencadena la producción de péptidos antimicrobianos (Evans, 2006). A nivel celular, los procesos de melanización también se vieron modificados debido a una disminución en la expresión de la *profenol oxidasa*. Además, la expresión del gen *birc5* se vio deprimida en las abejas infectadas con la variante de origen uruguayo. La Deterina, (codificada por dicho gen) es un inhibidor de apoptosis (IAP), proceso cuyo objetivo es eliminar células dañadas o cuyo funcionamiento no se está dando de forma correcta (Kerr *et al.*, 1972; Bergmann *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000). Células apoptóticas presentan la cromatina condensada y el ADN cromosómico fragmentado formando cuerpos apoptóticos, por lo que son reconocidas por macrófagos y fagocitadas (Kerr *et al.*, 1972). Por lo tanto, los menores niveles de expresión de la Deterina desencadenan mayores niveles de apoptosis y teniendo en cuenta que *N. ceranae* se replica dentro de las células, dichos procesos de apoptosis incrementados podrían explicar el menor nivel de infección de las abejas infectadas con la variante del microsporidio de origen uruguayo.

Poulin y Combes (1999), plantean que la virulencia de cierto patógeno depende de la interacción entre éste y su hospedero, en la cual factores genéticos de ambos organismos y aspectos ambientales jugarían un rol determinante. En el presente trabajo se abordó la caracterización genética de las variantes de *N. ceranae* empleadas en los ensayos de infección y las mismas mostraron diferencias entre sí. Dichas diferencias genéticas podrían explicar los distintos comportamientos de las mismas al infectar la abeja *A. mellifera iberiensis* y la respuesta diferencial por parte de la abeja. Sin embargo, en las condiciones ideales de laboratorio, estas diferencias no se reflejaron en la sobrevivencia de las abejas. Teniendo en cuenta que i) las abejas empleadas en los ensayos de infección provienen de una colmena sana y bien nutrida, ii) dichas abejas se mantuvieron en condiciones óptimas a nivel de laboratorio y iii) se observaron diferencias en la virulencia de ambas variantes de *N. ceranae*, aunque no así en relación a la sobrevivencia de las mismas; es posible plantear que bajo ciertas condiciones ambientales como

podiera ser déficit nutricional (Invernizzi *et al.*, 2011) o supresión del sistema inmune (debido por ejemplo a la contaminación con pesticidas) (Garrido *et al.*, 2013), las dos variantes de *N. ceranae* podrían tener diferentes efectos a nivel colonial.

7. CONSIDERACIONES FINALES

Si bien la variabilidad genética entre las distintas muestras de *N. ceranae* de diferentes países resultó sumamente alta como fue previamente descrito (Sagastume *et al.*, 2011; Roudel *et al.*, 2013; Gomez – Moracho *et al.*, 2014), la técnica empleada permitió diferenciar claramente un grupo (A) formado principalmente por muestras de Europa y Hawaii y otro grupo (B) compuesto por muestras de Europa y América del Sur. Sin embargo, el tercer grupo (C) se subdividió cuando las muestras de España y Uruguay empleadas en los ensayos de infección fueron incluidas. En análisis evolutivos, este evento suele suceder cuando la variabilidad genética entre las muestras en análisis es muy alta y se debe a que el exceso de variabilidad genética muchas veces determina que se pierda información referente a las asociaciones filogenéticas (Ivanna Tomasco, comunicación personal). En este sentido, el grupo C presentó esta característica (de hecho todas las muestras fueron diferentes), por lo que dicha falta de consistencia puede deberse a un artefacto metodológico debido a la gran variabilidad genética detectada.

Por otro lado, teniendo en cuenta el problema que constituye la infección de las abejas españolas *A. m. iberiensis* con *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009) y que países del hemisferio sur aún en presencia del microsporidio no han sufrido pérdidas masivas de colmenas (Neumann y Carreck, 2010; Vandame y Palacio, 2010), la posibilidad que existan variantes de *N. ceranae* con diferencias en su virulencia es muy probable. En este sentido, el presente trabajo constituye un primer abordaje en comparar la virulencia de variantes del microsporidio provenientes de países con y sin pérdidas de colmenas.

Hubiese sido interesante haber escogido las variantes de *N. ceranae* a emplear previo a los ensayos de infección en relación a su asociación filogenética, eligiendo muestras pertenecientes a grupos claramente distintos, lo cual no fue posible debido a limitaciones de tiempo (debido a la baja viabilidad de las esporas es necesario tomar la muestra e emplear en los ensayos de infección e infectar en el menor tiempo posible). En este sentido, si bien las muestras de *N. ceranae* empleadas en los ensayos de infección difirieron genéticamente entre sí así como las características patogénicas de ambas variantes en relación a los niveles de infección y la respuesta inmune de la abeja, no fue posible comprobar a nivel de laboratorio que exista una variante de *N. ceranae* más virulenta que la otra.

Además, a la hora de evaluar la posible relación de *N. ceranae* con los fenómenos de despoblación de colmenas, es importante considerar que más allá de que posiblemente existan variantes de *N. ceranae* con virulencia diferencial, podrían haber otros factores involucrados en la interacción entre este microsporidio y la abeja. La asociación de *N. ceranae* a las pérdidas

puntuales de colmenas en el ambiente particular de las plantaciones de *E. grandis* en Uruguay, da una idea de que factores ambientales y nutricionales (en relación a la calidad proteica) que podrían estar involucrados (Invernizzi *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2013). En este sentido, son amplios los estudios que aportan evidencia acerca del estrés energético de la abeja ocasionado por la infección con *N. ceranae* y las consecuencias de la misma en relación a dietas con distintos aportes nutricionales (Mayack y Naug, 2009; Naug y Gibbs, 2009; Porrini *et al.*, 2011). También, teniendo en cuenta que existen abejas con marcadas diferencias raciales, es posible que las mismas respondan diferente a la infección con *N. ceranae*. De hecho en Uruguay, las abejas africanizadas están ampliamente distribuidas en todo el territorio y se ha reportado que abejas africanizadas tienen la capacidad de limitar el desarrollo infectivo de *N. ceranae* con consecuencias claras a nivel productivo (Mendoza *et al.*, 2013; Branchiccela *et al.*, 2014).

Por otro lado, existen antecedentes que plantean que *N. ceranae* podría estar interaccionado con distintos patógenos y / o pesticidas, por lo que esta posibilidad debe también ser tenida en cuenta a la hora de evaluar dicha interacción (Ravoet *et al.*, 2013; Toplak *et al.*, 2013; Doublet *et al.*, 2014). Por último, las prácticas apícolas así como el comportamiento de la abeja puede tener consecuencias en el desarrollo infectivo, ya que el recambio de la reina ya sea natural o por parte del apicultor, es un factor que influye en el desarrollo de la infección, disminuyendo el efecto de la misma (Botías *et al.*, 2011).

Todos estos aspectos dan idea de la multiplicidad de factores que podrían estar en juego y en este sentido, este trabajo constituye un primer abordaje a uno de los tantos factores que podrían estar involucrados.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la hipótesis planteada, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que existen distintas variantes genéticas de *N. ceranae*, las cuales mostraron diferencias en sus características patogénicas (nivel de infección y respuesta inmune) a nivel de laboratorio pero no tuvieron efectos diferenciales en la mortalidad de las abejas infectadas.

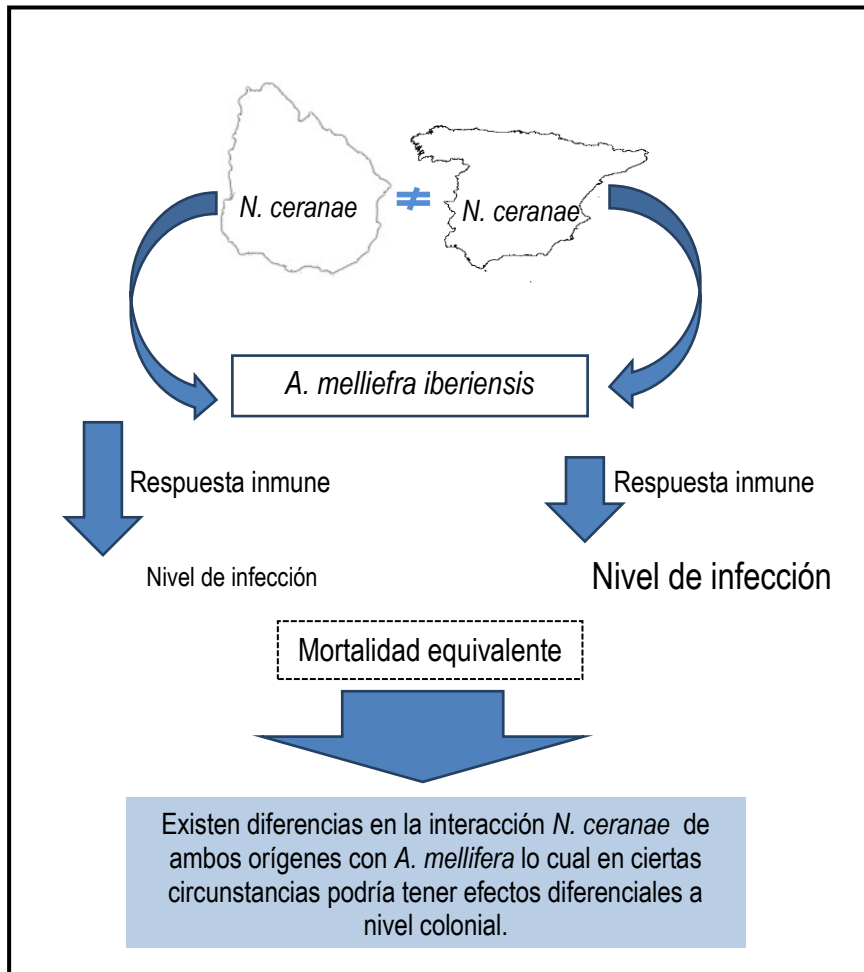


Figura 30. Resumen esquemático de los principales resultados obtenidos en el presente trabajo.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió por un lado conformar una colección de muestras de *N. ceranae* provenientes de 13 países.

Se puso a punto la técnica de DGGE empleando tres juegos de cebadores que amplifican diferentes regiones del genoma del microsporidio. Si bien dicha técnica no permitió la caracterización genética de *N. ceranae*, corroboró la existencia de distintas copias de los genes en estudio (SSUrRNA, IGS y PTP).

Se puso a punto la técnica de ISSR, la cual fue escogida para los análisis de diversidad genética de la colección de muestras de *N. ceranae*. Dichos análisis mostraron la existencia de tres grupos: el grupo A definido por un patrón en común, con baja diversidad genética y característico de las muestras de Europa (a excepción de España) y Hawaii y los grupos B y C con muestras principalmente de Europa y América del Sur. Estos grupos presentaron alta diversidad genética. El hecho que ninguna muestra de España se incluyera dentro del grupo característico de Europa estaría indicando que existen diferencias distinguibles a menos a nivel genético entre las variantes circulando en Europa. Las muestras de este continente presentaron una diversidad genética media, mientras que la diversidad de las muestras de *N. ceranae* de España y América del Sur fue muy alta.

Los análisis de infección mostraron que, en condiciones de laboratorio, no existen diferencias en la virulencia de *N. ceranae* de origen uruguayo y español debido a que la sobrevivencia de las abejas infectadas con ambas variantes fue la misma. Sin embargo, teniendo en cuenta que ambas variantes mostraron diferencias en cuanto a ciertas características de su patogenia como la respuesta inmune y los niveles de infección, es posible que a nivel de campo si se dan ciertas condiciones ambientales que favorezcan el *fitness* del patógeno, posiblemente existan diferencias en la mortalidad de las abejas infectadas con ambas variantes.

Las variantes de *N. ceranae* empleadas en los ensayos de infección fueron capaces de deprimir la respuesta inmune de la abeja, aunque la variante de Uruguay lo hizo en mayor medida. Esto podría deberse a que la variante de *N. ceranae* de España y la abeja *A. mellifera iberiensis* han co-evolucionado y por lo tanto la abeja es capaz de responder más efectivamente que cuando la misma es infectada con una variante novedosa como lo puede ser la uruguayana.

9. PERSPECTIVAS

El presente trabajo constituye una primera aproximación al estudio de la epidemiología de *N. ceranae*. Teniendo en cuenta que se trata de un patógeno novedoso, cuya asociación con la abeja *A. mellifera* es reciente y dada la multiplicidad de factores que podrían estar influyendo en la relación entre *N. ceranae* y la abeja, existe un amplio abanico de temas a abordar a la hora de profundizar en la biología, características patogénicas e historia del microsporidio.

Por un lado, sería interesante realizar análisis de diversidad genética mediante ISSR incluyendo muestras de abejas infectadas naturalmente con *N. ceranae* provenientes del resto de los países de América del Sur, Centroamérica y América del Norte, de forma de ver cuáles son las relaciones y características entre las variantes del microsporidio circulando en nuestro continente. Además, también se podrían incluir en estos análisis muestras de *N. ceranae* provenientes de *A. ceranae*, *A. florea*, *A. dorsata* y abejorros *Bombus* spp. de América del Sur como forma de evaluar si *N. ceranae* está co-circulando entre estos tres hospederos.

Por otro lado, teniendo en cuenta que fue posible observar diferencias en la respuesta inmune generada entre las abejas infectadas con las variantes de *N. ceranae* de España y Uruguay y en los niveles de infección de ambas variantes, se podría evaluar si existen diferencias en los factores de virulencia que se están expresando en ambas variantes mediante un abordaje proteómico.

Por último, teniendo en cuenta que existen muchos patógenos como por ejemplo *Chritidia mellificae*, *Aethinia tumida*, *Malpighamoeba mellificae*, *Spiroplasma melliferum*, *Apicystis bombi*, y *Apocephalus borealis*, que infectan la abeja *A. mellifera*, que podrían potencialmente interactuar con *N. ceranae* y cuya detección en Uruguay no ha sido abordada, sería interesante poner a punto técnicas que permitan su detección y analizar su efecto en las colmenas uruguayas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamovich A., Atela O., De la Rúa P., Galián J. 2007. Assesment of the mitochondrial origin of honey bees from Argentina. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 46: 191-194.

Actualidad Apícola. 2013. Apicultura en Eucaliptus. Parte 1. No. 97. Montevideo, Uruguay.

Anido, M. 2013. Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Uruguay.

Antúnez K., Anido M., Branchiccela B., Harriet J., Campá J., Invernizzi C., Santos E., Martín – Hernández R., Higes M., Zunino P. 2013a. Despoblación de colmenas. Serie FPTA – INIA 41. ISSN: 1688 – 924X. Ed. Hemisferio Sur S.R.L. Montevideo, Uruguay.

Antúnez K., D'Alessandro B., Corbella E., Ramallo G., Zunino P. 2006. Honey bee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*. 93: 67 - 70.

Antúnez K., D' Alessandro B., Corbella E., Zunino P. 2005. Detection of Chronic bee paralysis virus and Acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 90: 69–72.

Antúnez K., Harriet J., Gende L., Maggi M., Eguaras M., Zunino P. 2008. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology*. 131: 324 – 331.

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., Menzoza Y., Santos E., Invernizzi C. 2013b. Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research*. 52: 227 – 234.

Antúnez K., Piccini C., Castro - Sowinski S., Rosado A., Seldin L., Zunino P. 2007. Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Veterinary Microbiology*. 124: 178-183.

Arbulo N., Salvarrey S., Santos E., Antúnez K., Martín-Hernández R., Higes M., Invernizzi C. 2013. *Nosema ceranae* detection in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. Apimondia Congress 2013. Kiev.

Ares A., Nozal M., Bernal J., Martín - Hernández R., Higes M., Bernal J. 2012. Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of chromatography B*. 899: 146 – 153.

Aumeier P. 2001. Bioassay for grooming effectiveness towards *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees. *Apidologie*. 32: 81 – 90.

Bastos E., Simone M., Macedo J., Egea Soares A., Spivak M. 2007. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology. 97: 273–281.

Bergmann A., Agapite J., Steller H. 1998. Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates. Oncogene. 17: 3215 – 3223.

Bernard P., Wittwer C. 2000. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. Clinical Chemistry. 46: 147 – 148.

Blanchard P., Schurr F., Celle O., Cougoule N., Drajnudel P., Thiéry R., Faucon J., Ribière M. 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology. 99: 348 – 350.

Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., Gallmann P. 2008. Honey for nutrition and health: a review. American Journal of the College of Nutrition. 27: 677-689.

Bornet B., Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 209 – 215.

Botías C., Martín – Hernández R., Barrios L., Aránzazu M., Higes M. 2013a. Nosema spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. Veterinary Research. 44: 2 - 14.

Botías C., Martín – Hernández R., Días J., García – Palencia P., Matabuena M., Juarranz A., Barrios L., Meana A., Nanetti A., Higes M. 2011. The effect of induced queen replacement on Nosema spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. Environmental Microbiology. 14: 845 – 859.

Botías C., Martín – Hernández R., Meana A., Higes M. 2013b. Screening alternative therapies to control Nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. Research in Veterinary Science. 95: 1041- 1045.

Bou G., Fernández – Olmos A., García C., Sáez – Nieto J., Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 29: 601 – 608.

Branchiccela B., Aguirre C., Parra G., Estay P., Zunino P., Antúnez K. 2014. Genetic changes in *Apis mellifera* after forty years of Africanization. Apidologie. En prensa.

Burgett, M., Shorney, S., Cordara, J., Gardiol, G., Sheppard, W. 1995. The present status of Africanized honey bees in Uruguay. American Bee Journal. 135: 328-330.

Campos M., Bogdanov S., de Almeida - Muradian L., Szczesna T., Mancebo Y., Frigerio C., Ferreira F. 2008. Pollen composition and standardization of analytical methods. Journal of Apicultural Research and Bee World. 47: 156–163.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. 1993. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection - inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). The Journal of Biological Chemistry. 268: 7044 – 7054.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. The EMBO Journal. 8: 2387 - 2391.

Castells P., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*. 187: 381 – 386

Casteels – Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P. 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide – antibiotics gene repertoire and required post - translational conversion of the precursor structures. *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (46): 28569 - 28575.

Chaimanee V., Chen Y., Pettis J., Cornman R., Chantawannakul P. 2011. Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*. 107: 229–233.

Chantawannakul P., Ward L., Boonhamb N., Brown M. 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real - time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91: 69 – 73.

Chauzat M., Faucon J., Martel A., Lachaize J., Cougoule N., and Aubert M. 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Entomological Society of America Apiculture and Social Insects*. 99: 253 – 262.

Chen Y., Evans J., Zhou L., Boncristiani H., Kimura K., Xiao T., Litkowski A., Pettis J. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 204–209.

Chen Y., Huang Z. 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie*. 41: 364–374.

Chen y Siede. 2007. Honey bee viruses. *Advances in Virus Research*. 70: 33 – 80.

Cordara, J. 2005. La historia de la apicultura en Uruguay. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de la empresa. Montevideo, Uruguay.

Cornman R., Chen Y, Schatz M, Street C., Zhao Y., Desany B., Egholm M., Hutchison S., Pettis J., Lipkin W., Evans J. 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *Plos Pathogens*. 5: e1000466 - e1000466.

Corona M., Valerde R., Remolina S., Moran – Lauter A., Wang Y., Hughes K., Robinson G. 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signalling and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 7128 – 7133.

Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22: 299 – 305.

Cox Foster E., Conlan S., Holmes E., Palacios G., Evans J., Moran N., QuanP., Briese T., Hornig M., Geiser D., Martinson V., vanEngelsdorp D., Kalkstein A., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S., Simons J., Egholm M., Pettis S., Lipkin I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318: 283 – 287.

Cox-Foster D., Stehr J. 1993. Induction and localization of FAD-glucose dehydrogenase (GLD) during encapsulation of abiotic implants in *Manduca sexta* larvae. *Journal of Insect Physiology*. 40: 235-249.

Cremer S., Armitage S., Schmid - Hempel S. 2007. Social Immunity. *Current Biology*. 17: R693 – R702.

Delbac F., Peyret P., Metenier G., David D., Danchib A., Vivares C. 1998. On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular Microbiology*. 29: 825 – 834.

Delbac F., Peuvél I., Metenier G., Peyretailade E., Vivares C. 2001. Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of *ptp1* and *ptp2* genes in three *Encephalitozoon* species. *Infection and Immunity*. 69: 1016 – 1024.

Diniz N., Soares A., Sheppard W., Del Lama M. 2003. Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology*. 26: 47 – 52.

Doublet V., Labarussias M., de Miranda J., Moritz R., Paxton R. 2014. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.12426.

Dussaubat C., Maisonnasse A., Alaux C., Tchamitchan S., Brunet J., Plettner E., Belzunces L., Le Conte Y. 2010. *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*. 36: 522 – 525.

Dussaubat C., Sagastume S., Gómez - Moracho T., Botías C., García - Palencia P., Martín - Hernández R., Le Conte Y., Higes M. 2013. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Veterinary Microbiology*. 162: 670 – 678.

Evans J. 2006. Beepath: An ordered quantitative - PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*. 93: 135 – 139.

Evans J., Aronstein K., Chen Y., Hetru C., Imler J., Jiang H., Kanost M., Thompson G., Zou Z., Hultmark D. 2006. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*. 15: 645 – 656.

Evans J., Spivak M. 2009. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: S62 – S72.

FAO, 2014. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y agricultura. <http://www.fao.org>

Fischer S. Lerman L. 1983. DNA fragments differing by single base - pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 80: 1579 - 1583.

Fitch W. 2000. Homology. *Trends in Genetics*. 16: 227 - 231.

Fontbonne R., Garnery L., Vidau C., Aufauvre J., Texier C., Tchamitchian S., El Alaoui H., Brunet J., Delbac F., Biron D. 2013. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution*. 17: 188 – 194.

Fries I. 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie*. 19: 319 – 328.

Fries, I. 1989. Observations on the development and transmission of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Journal of Apicultural Research* 28: 107-117.

Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: S73 – S79.

Fries I., Chauzat M., Chen Y., Doublet V., Genersch E., Gisder S., Higes M., McMahon D., Martín-Hernández R., Natsopoulou M., Paxton R., Tanner G., Webster T., Williams G. 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*. 52: 1 - 28.

Fries I., Granados R., Morse R. 1992. Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie*. 23: 61 – 70.

Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S., Pieniazek N. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*. 32: 356 – 365.

Garrido P., Antunez K., Martin M., Porrini M., Zunino P., Eguaras M. 2013. Immune - related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology*. 59: 113 – 119.

Garrido - Bailón E., Martín – Hernández R., Bernal J., Martínez – Salvador A., Barrios L., Meana A., Higes M. 2010. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 8: 658 – 661.

Gebara E., Lima L., Mayer M. 2002. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 365-369

Genersch E., von der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C., Buchler R., Berg S., Ritter W., Muhlen W., Gisder S., Meixner M., Liebig G., Rosenkranz P. 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*. 41: 332 – 352.

Gibson U., Heid C., Williams M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*. 6: 995 – 1001.

Goel M, Khanna P., Kishore J. 2010. Understanding survival analysis: Kaplan - Meier estimate. *International Journal of Ayurveda Research*. 1: 274 – 278.

Gomez-Moracho T., Maside X., Martín-Hernández R., Higes M., Bartolomé C. 2014. High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. *Parasitology*. 141: 475-481.

Green S., Leigh M., Neufeld J. 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. 4137 - 4158.

Handelsman J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Review*.68: 669 – 685.

Hatjina F., Tsoktouridis G., Bouga M., Charistos L., Evangelou V., Avtzis D., Meeus I., Brunain M., Smagghe G., de Graaf D. 2011. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology*. 108: 131 – 134.

Higes M., García - Palencia P., Martín - Hernández R., Meana A. 2006b. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*. 94: 211 – 217.

Higes M., Martín – Hernández R., Botías C., Garrido Bailón E., González – Porto A., Barrios L., del Nozal M., Bernal J., Jiménez J., García Palencia P., Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*. 10: 2659 -2669.

Higes M., Martín – Hernández R., Garrido – Bailón E., González – Porto A., García – Palencia P., Meana A., Nozal M., Mayo R., Bernal J. 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*. 1: 110 – 113.

Higes M., Martín – Hernández R., Meana A. 2006a. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92: 81 – 83.

Higes M., Martín – Hernández R., Meana A. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 41: 375 – 392.

Higes M., Meana A., Bartolomé C., Botías C., Martín – Hernández R. 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*. 5: 17 – 29.

Holland P., Abramson R., Watson R., Gelfand D. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 7276 - 7280.

Holt H., Aronstein K., Grozinger C. 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.

Huang J. C., Sun M. 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*.100: 1050-1060.

Huang W., Bocquet M., Lee K., Sung I., Jiang J., Chen Y., Wang C. 2008. The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97: 9 – 13.

- Huang W., Jiang J., hen Y., Wang C. 2007.** A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*. 38: 30 – 37.
- Huang W., Solter L., Yau P., Imai B. 2013.** *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *Plos Pathogens*. 9: e1003185.
- Huang W., Tsai S., Lo C., Soichi Y., Wang C. 2004.** The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 473 – 481.
- Invernizzi C. 2001.** Resistencia a la enfermedad de cría yesificada por colonias *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higiénico (Hymenoptera, Apidae). *Iheringia. Série Zoologia*. 91: 109-114.
- Invernizzi C., Abud C., Tomasco I., Harriet J., Ramallo G., Campá J., Katz H., Gardiol G., Mendoza Y. 2009.** Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 150 – 153.
- Invernizzi C., Santos E., García E., Daners G., Di Landro R., Saadoun A., Cabrer, C. 2011.** Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations. *Archivos de Zootecnia*. 60: 1303 – 1314.
- Johnson R., Ellis M., Mullin C., Frazier M. 2010.** Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*. 41: 312–331.
- Johnson R., Pollock., H., Berenbaum M. 2009.** Synergistic interactions between in hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology*. 102: 474 – 479.
- Jones G., Jones D., Zhou L., Steller h., Chu Y. 2000.** Deterin, a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 22157 - 22165.
- Joshi S., Gupta V., Aggarwal R., Ranjekar R., Brar D. 2000.** Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. [Theoretical and Applied Genetics](#). 100: 1311-1320
- Kantety R., Zeng X., Bennetzen J., Zehr B. 1995.** Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**. 4: 365-373
- Katinka M., Duprat S., Cornillot E., Metenier G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Peyretailade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., El Alaoui H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivares C, 2001.** Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 414: 450 – 453.
- Keeling. 2006.** *Genomics and Evolution of Microbial Eucaryotes*. New York: Oxford University Press Inc.
- Keeling P., Fast N. 2002.** Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*. 56: 93 – 116.
- Kerr, W. 1957.** Introduction of African honey bees in Brazil. *Brasil Apicola*. 3: 211 - 213.

Kerr J., Wyllie A., Currie A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26: 239 – 257.

Kim, K., Oguro J. 1999. Update of the status of the Africanized honey bees of the Western states. *The Western Journal of Medicine*. 170: 220 - 222.

Klee J., Besana A., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Quyet Tam D., Xuan Chinh T., Puerta F., Ruz J., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I., Paxton R. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96: 1 – 10.

Kralj J., Fuchs S. 2010. *Nosema sp.* influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*. 41: 21 – 28.

Krebes L., Zeidler L., Frankowski J., Bastrop R. 2014. (Cryptic) sex in the microsporidian *Nosema granulosis* – Evidence from parasite rDNA and host mitochondrial DNA. *Infection, Genetics and Evolution*. 21: 259 – 268.

Lavine M., Strand M. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1295 – 1309.

Lee L., Connell ., Bloch W. 1993. Allelic discrimination by nick - translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research*. 21: 3761 - 3766.

Lee S., Corradi N., Byrnes E., Torres – Martínez S., Dietrich F., Keeling P., Heitman J. 2008. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Current Biology*. 18: 1675 – 1679.

Li Y., Xiang Q., Huang Y., Su Z. 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 37: 207-215.

Livak K., Flood S., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*. 4: 357-362

Martín - Hernández R., Botías C., Barrios L., Martínez – Salvador A., Meana A., Mayack C., Higes M. 2011b. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research*. 109: 605 – 612.

Martín – Hernández R., Botías C., Garrido Bailón E., Martínez – Salvador A., Prieto L., Meana A., Higes M. 2011a. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology*. 14: 2127 – 2138.

Martín – Hernández R., Meana A., García – Palencia P., Marín P., Botías C., Garrido – Bailón E., Barrios L., Higes M. 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 2554 – 2557.

Martín – Hernández R., Meana A., Prieto L., Martínez Salvador A., Garrido – Bailón E., Higes M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 6331 – 6338.

- Martin S., Highfield A., Brettell L., Villalobos E., Budge G., Powell M., Nikaido S., Schroeder D. 2012.** Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*. 336: 1304 – 1306.
- Mayack C., Naug D. 2009.** Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 100: 185 – 188.
- McGregor, S. 1976.** Insect pollination of cultivated crop plants. *Agriculture Handbook*. 496: 93 – 98.
- Mendoza Y., Antúnez K., Branchiccela B., Anido M., Santos E., Invernizzi C. 2013.** *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie*. DOI: 10.1007/s13592-013-0241-6.
- Mendoza Y., Díaz S., Ramallo G., Invernizzi C. 2012.** Incidencia de *Nosema ceranae* durante el invierno en colonias de abejas melíferas retiradas de una forestación de *Eucalyptus grandis*. *Veterinaria*. 48: 13 – 19.
- Mendoza Y., Santos E., Antúnez K., Invernizzi C. 2013.** Bidirectional selection for resistance and susceptibility to nosemosis in honeybees. *Apimondia Congress 2013*. Kiev.
- MGAP, Anuario estadístico. 2013.** <http://www.mgap.gub.uy>
- Miranda J., Genersch E. 2009.** Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: S48 - S61.
- Moran N., Wernegreen J. 2000.** Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Tree*. 15: 321 – 326.
- Morse R., Calderone N. 2000.** The value of honey bees as pollinators of United States. *Bee Culture*. 128: 1 – 15.
- Mullin C., Frazier M., Frazier J., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J. 2010.** High Levels of miticides and agrochemicals in north american apiaries: Implications for honey bee health. *Plos One*. 5: e9754.
- Muñoz I., Cepero A., Pinto M., Martín-Hernández R., Higes M., De la Rúa P. 2014.** Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. *Infection, Genetics and Evolution*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.008>
- Muyzer G., Smalla K. 1998.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* .73: 127–141.
- Myers R., Fischer S., Lerman L., Maniatis T. 1985.** Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC - clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. 13: 3131 – 3145.
- Naug D. 2009.** Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*. 142: 2369 – 2372.

Naug D., Gibbs A. 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*. 40: 595 – 599.

Nazarenko I., Lowe B., Darfler M., Ikonomi P., Schuster D., Rashtchian A. 2002. Multiplex quantitative PCR using self - quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acid Research*. 30: 1 – 7.

Nelson M., Ihle K., Fondrk K., Page R., Amdam G. 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *Plos Biology*. 5: e62.

Neumann P., Carreck N. 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*. 49: 1 – 6.

Oldroyd B. 2007. What's Killing American Honey Bees? *Plos Biology*. 5: 1195 – 1199.

Ono M, Igarashi T, Ohno E, Sasaki M. 1995. Unusual termal defense by a honeybee against mass attack by hornets. *Nature*. 377: 334 – 336.

OMS, 2014. <http://www.who.int>

Paxton R. 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*. 49: 80 – 84.

Pettis J., Lichtenberg E., Andree M., Stitzinger J., Rose R., vanEngelsdorp D. 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *Plos One*. 8: e70182.

Pettis J., vanEngelsdorp D., Johnson J., Dively G. 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*. 99: 153 – 158.

Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT PCR. *Nucleic Acid Research*. 29: 2002 – 2007.

Pfennig K. 2001. Evolution of pathogen virulence: the role of variation in host phenotype. *Proceedings: Biological Sciences*. 268: 755 – 760.

Porrini M., Sarlo E., Medici S., Garrido P., Porrini D., Damiani N., Eguaras M. 2011. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *Journal of Apicultural Research*. 50: 35 – 41.

Poulin R., Combes C. 1999. The concept of virulence: Interpretations and Implications. *Parasitology Today*. 15: 474 – 475.

Rao S., Nath B., Saratchandra B. 2005. Characterization and phylogenetic relationships among microsporidia infecting silkworm, *Bombyx mori*, using inter simple sequence repeat (ISSR) and small subunit rRNA (SSU-rRNA) sequence analysis. *Genome*. 48: 355 – 366.

Ravoet J., Maharramov J., Meeus I., De Smet L., Wenseleers T., Smaghe G., de Graaf D. 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellifica* as a new contributory factor to winter mortality. *Plos One*. 8: e72443.

Reddy M., Sarla M., Siddiq E. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 128: 9 – 17.

Ren H., Zhang X., Song Z., Rupert W., Gao G., Guo S., Zhao L. 2011. Comparison of microbial community compositions of injection and production well samples in a long - term water - flooded petroleum reservoir. *Plos One*. 6: e23258.

Reyes K., Zervos M. 2010. Role of molecular techniques in the epidemiologic investigation of hospital - acquired infections. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. Cap. 9. 1 Ed. Academic Press. Inc.

Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. 2009. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: S96 – S119.

Roudel M., Aufauvre J., Corbara B., Delbac F., Blot N. 2013. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology*. 140: 1346 – 1356.

Sagastume S., del Águila C., Martín – Hernández R., Higes M., Henriques - Gil N. 2011. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environmental Microbiology*. 13: 84 – 95.

Sagastume S., Martín – Hernández R., Higes M., Henriques – Gil N. 2013. Ribosomal gene polymorphism in small genomes: analysis of different 16S rRNA sequences expressed in the honeybee parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 61: 42 – 50.

Sánchez – Collado J., Higes M., Barrio L., Martín – Hernández R. 2014. Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitology Research*. DOI 10.1007/s00436-014-3814-z.

Santos E, Mendoza Y, Díaz R, Harriet J., Campá J. 2009. Valor económico de la polinización realizada por abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una aproximación. Publicación de la Jornada de Apicultura del INIA. Serie Actividades de Difusión N°568. 25 - 28.

Santos E., Mendoza Y., Días-Cetti S., Ramallo G., Machado J., Muñoz P., Invernizzi C., Porrini M. 2013. Comparison of two commercial products against the parasite *Nosema ceranae*. Apimondia Congress 2013. Kiev.

Seehuus S., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 962 – 967.

Seeley T., Tarpay D. 2007. Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 274: 67 – 72.

Sheppard W., Rinderer T., Garnery L., Shimanuki H. 1999. Analysis of the Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity origin. *Genetics and Molecular Biology*. 22: 73 - 75.

Simone - Finstrom M., Spivak M. 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41: 295 – 311.

Smith, D. 1991. African bees in the Americas: Insights from Biogeography and Genetics. *Tree*. 6: 17 – 21.

Sokal R., Rohlf F. 1979. *Biometria. Principio y métodos estadísticos en la investigación biológica.* Blume Ediciones. Primera Edición. España.

Starcks P., Blackie C., Seeley T. 2000. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*. 87: 229 – 231.

Stepanović S., Antić N., Dakić I., Švabić - Vlahović M. 2003. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiology Research*. 158: 353 – 357.

Tenover F., Arbeit R., Goering R. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review of healthcare epidemiologist. *Infection. Control and Hospital Epidemiology*. 18: 426 – 439.

Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M., Bergoin M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 7185 – 7191.

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

Toplak I., Ciglenečki U., Aronstein K., Gregorc A. 2013. Chronic Bee Paralysis Virus and *Nosema ceranae* experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses*. 5: 2282 – 2297.

Tsaousis A., Kunji E., Goldberg A., Lucocq J., Hirt R., Embley M. 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 453: 553 – 557.

Tyagi S., Kramer R. 1995. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*. 14: 303 – 308.

Uzel A., Sorkun K., Oncag O., Cogulu D., Gencay O., Salih B. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*. 160: 189 – 195.

van der Zee R., Gómez – Moracho T., Pisa L., Sagastume S., García – Palencia P., Maside J., Bartolomé C., Martín – Hernández R., Higes M. 2014. Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberiensis*). *Environmental Microbiology Reports*. doi:10.1111/1758-2229.12133.

Vandame R., Palacio M. 2010. Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low intensity agricultura and beekeeping? *Apidologie*. 41: 243 – 255.

vanEngelsdorp D., Evans J., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpay D., Pettis J. 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *Plos One*. 4: e6481.

vanEngelsdorp D., Hayes J., Underwood R., Pettis J. 2008. A Survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *Plos One*. 3: e4071.

Vargas-Abores F., Ortega Rubio A. 1994. El sistema inmune humoral de los insectos. *Tópicos de Investigación y Posgrado*. 4: 21-28.

Viuda - Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández J., Perez J. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*. 73: R117 – R124.

Vossbrinck C., Maddox J., Friedman S., Debrunner - Vossbrinck B., Woese C. 1987. Ribosomal - RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*. 326: 411 – 414.

Whitcombe D., Theaker J., Guy S., Brown T., Little S. 1999. Detection of PCR products using self – probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*. 17: 804 – 807.

Williams B., Hirt R., Lucocq J., Embley T. 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*. 418: 865 – 869.

Wong M., Medrano. 2005. Real – Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 39: 1 – 11.

Xu Y., Weiss L. 2005. The microsporidian polar tube: A highly specialized invasion organelle. *International Journal for Parasitology*. 35: 941 – 953.

Yang X., Cox – Foster D. 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.

Yip P., Chau C., Mak C., Kwan H. 2007. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chinese Medicine*. 2: 9.

Yue C., Genersch E. 2005. RT - PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*. 86: 3419 – 3424.

ANEXO 1. Muestras enviadas al Departamento de Microbiología del IIBCE para su análisis.

Muestra	Origen	Investigador asociado	Centro de Investigación asociado
08-736	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-737	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-740	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-899	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-748	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-749	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-871	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-881	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-745	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-752	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-887	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-882	Argentina	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
Tuc	Argentina	Dra. Marina Basualdo	Área de Producción Apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires. Argentina
Zar	Argentina	Dra. Marina Basualdo	Área de Producción Apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires. Argentina
T22	Argentina	Dra. Marina Basualdo	Área de Producción Apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires. Argentina
T23	Argentina	Dra. Marina Basualdo	Área de Producción Apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires. Argentina
T24	Argentina	Dra. Marina Basualdo	Área de Producción Apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires. Argentina
T25	Argentina	Dra. Marina Basualdo	Área de Producción Apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires. Argentina
T26	Argentina	Dra. Marina Basualdo	Área de Producción Apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires. Argentina
T27	Argentina	Dra. Marina Basualdo	Área de Producción Apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires. Argentina
500	Argentina	Dr. Martín Porrini	Laboratorio de Artrópodos. Universidad de Mar del Plata. Argentina
08-1268	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España

Muestra	Origen	Investigador asociado	Centro de Investigación asociado
08-1269	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1272	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1277	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-859	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-342	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-858	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-857	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-863	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1273	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1282	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-855	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-861	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-862	Francia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1001	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1003	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1008	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-596	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1028	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1035	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1080	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1098	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-558	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1110	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-1111	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-552	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-598	Holanda	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España

Muestra	Origen	Investigador asociado	Centro de Investigación asociado
10-1194	Hawaii	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
10-1208	Hawaii	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
1//3	Eslovenia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
4//32	Eslovenia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
10-1170	Italia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
07-1175	Croacia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
07-1176	Croacia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
07-1177	Croacia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
10-1181	Croacia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
06-476	Suiza	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
06-481	Suiza	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
09-142	Portugal	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
10-377	Canadá	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
13-002	Canadá	Dr. Carlos Castillos	National Bee Diagnostic Centre. Centre for Research & Innovation. Canadá
11-912	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
11-246	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
11-253	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
13-010	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
13-011	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
3	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
4	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
5	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
6	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
7	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
8	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
9	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España

Muestra	Origen	Investigador asociado	Centro de Investigación asociado
10	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
C8	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
C9	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
España infección	España	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
08-834	Argelia	Dr. Mariano Higes	Laboratorio de Patología Apícola. Centro Agrario Regional. Castilla La Mancha. España
Uru	Uruguay	Msc. Estela Santos	Laboratorio de Entomología. Facultad de Ciencias. UdelaR. Montevideo, Uruguay
2	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
7	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
10	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
15	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
33	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
34	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
43	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
46	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
48	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
50	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
56	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
63	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
68	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
75	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
86	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
121	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
505	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
506	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
507	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
508	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay

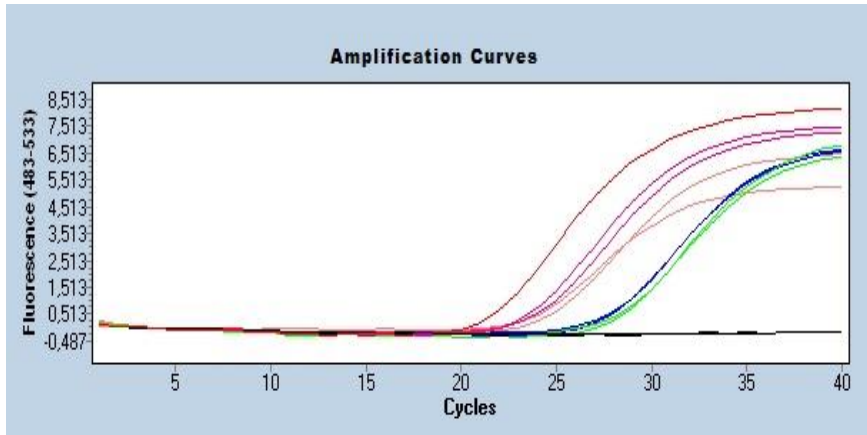
Muestra	Origen	Investigador asociado	Centro de Investigación asociado
509	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
510	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
515	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
517	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
518	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
519	Uruguay	Dra. Karina Antúnez	Departamento de Microbiología. IIBCE. Montevideo, Uruguay
Uruguay infección	Uruguay	Msc. Yamandú Mendoza	Sección apicultura. INIA La Estanzuela. Colonia. Uruguay
Chile	Chile	Dra. Martha Rodríguez	Escuela de Postgrado en Ciencias Agrarias. Universidad de Concepción. Chillán. Chile
501	Chile	Dra. Jessica Martínez	Instituto de Ciencias. Facultad de Medicina Clínica Alemana. Universidad del Desarrollo. Santiago, Chile
13-001	Chile	Dra. Jessica Martínez	Instituto de Ciencias. Facultad de Medicina Clínica Alemana. Universidad del Desarrollo. Santiago, Chile
502	Brasil	Dr. Dejair Message	Departamento de Ciencias Animales. Universidad Federal Rural de Semiárido. San Pablo. Brasil
503	Brasil	Dr. Dejair Message	Departamento de Ciencias Animales. Universidad Federal Rural de Semiárido. San Pablo. Brasil
504	Brasil	Dr. Dejair Message	Departamento de Ciencias Animales. Universidad Federal Rural de Semiárido. San Pablo. Brasil
13-003	Brasil	Dra. Erika Texeira	Laboratorio de Sanidad Apícola. Polo Regional de Valle de Paraíba. Agencia Paulista de Tecnología de Agronegocios. Secretaría de Agricultura y Abastecimiento de Estado de San Pablo. Brasil
13-004	Brasil	Dra. Erika Texeira	Laboratorio de Sanidad Apícola. Polo Regional de Valle de Paraíba. Agencia Paulista de Tecnología de Agronegocios. Secretaría de Agricultura y Abastecimiento de Estado de San Pablo. Brasil
13-005	Brasil	Dra. Erika Texeira	Laboratorio de Sanidad Apícola. Polo Regional de Valle de Paraíba. Agencia Paulista de Tecnología de Agronegocios. Secretaría de Agricultura y Abastecimiento de Estado de San Pablo. Brasil
13-006	Brasil	Dra. Erika Texeira	Laboratorio de Sanidad Apícola. Polo Regional de Valle de Paraíba. Agencia Paulista de Tecnología de Agronegocios. Secretaría de Agricultura y Abastecimiento de Estado de San Pablo. Brasil
13-007	Brasil	Dra. Erika Texeira	Laboratorio de Sanidad Apícola. Polo Regional de Valle de Paraíba. Agencia Paulista de Tecnología de Agronegocios. Secretaría de Agricultura y Abastecimiento de Estado de San Pablo. Brasil
13-008	Brasil	Dra. Erika Texeira	Laboratorio de Sanidad Apícola. Polo Regional de Valle de Paraíba. Agencia Paulista de Tecnología de Agronegocios. Secretaría de Agricultura y Abastecimiento de Estado de San Pablo. Brasil

Muestra	Origen	Investigador asociado	Centro de Investigación asociado
13-009	Brasil	Dra. Erika Texeira	Laboratorio de Sanidad Apícola. Polo Regional de Valle de Paraíba. Agencia Paulista de Tecnología de Agronegocios. Secretaría de Agricultura y Abastecimiento de Estado de San Pablo. Brasil

10. ANEXO 2

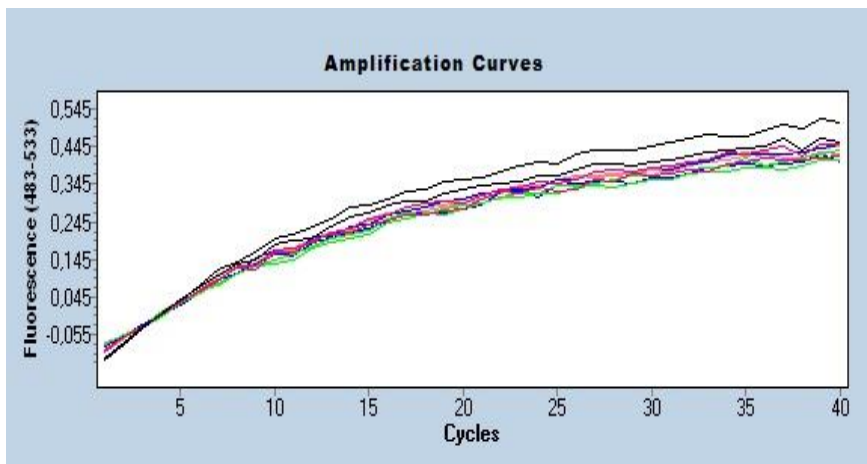
10.1. Curvas de amplificación para la detección del ADNc de la β - actina y los virus ABPV, BQCV, DWV, KBV y SBV.

β - actina:



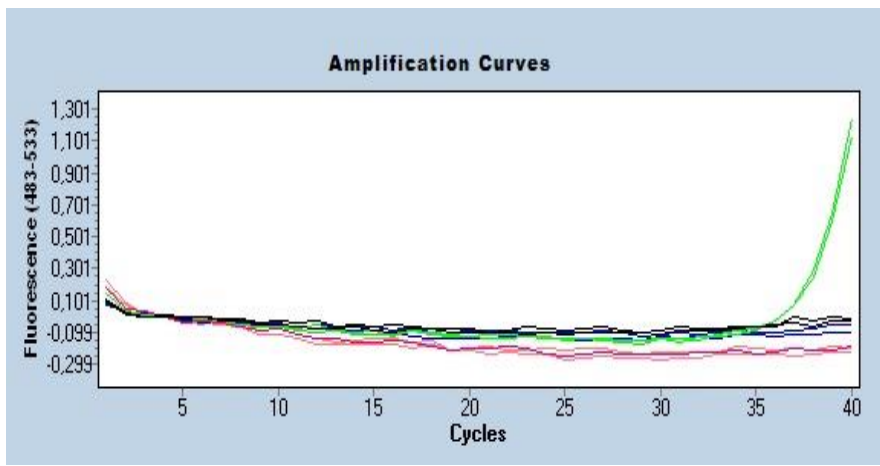
Día 0
Día 11 Uruguay
Día 11 España
Día 11 sin infectar
Control +
Control -

ABPV



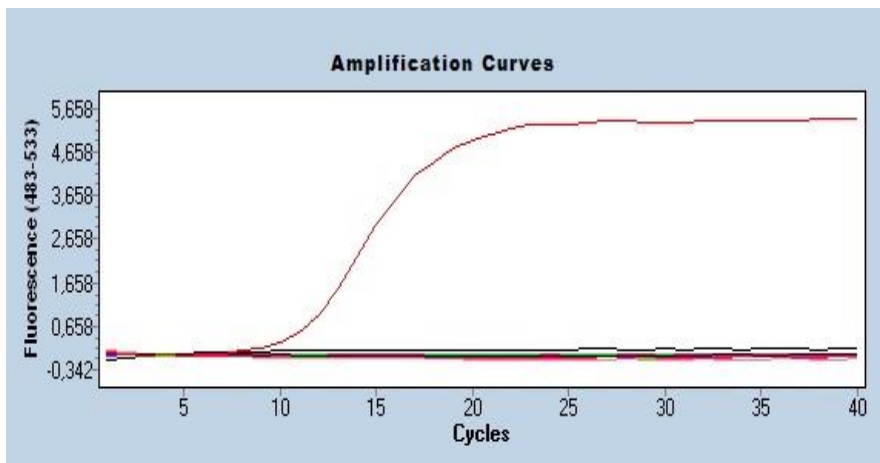
Día 0
Día 11 Uruguay
Día 11 España
Día 11 sin infectar
Control -

BQCV:



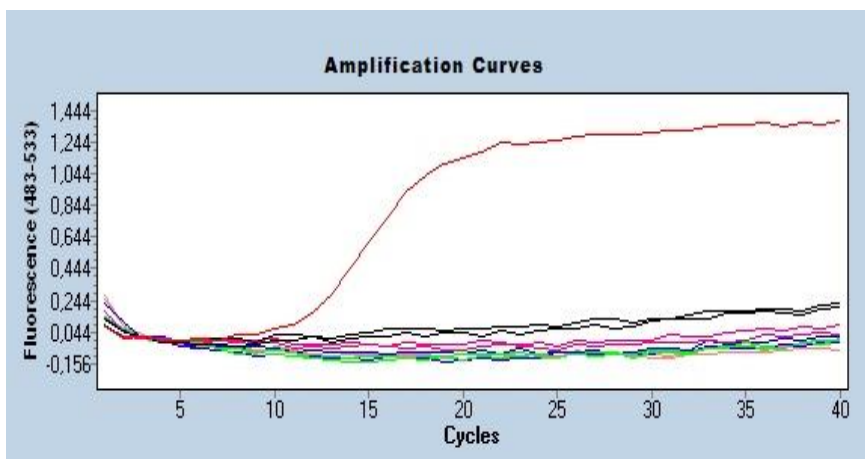
Día 0
Día 11 Uruguay
Día 11 España
Día 11 sin infectar
Control -

DWV:



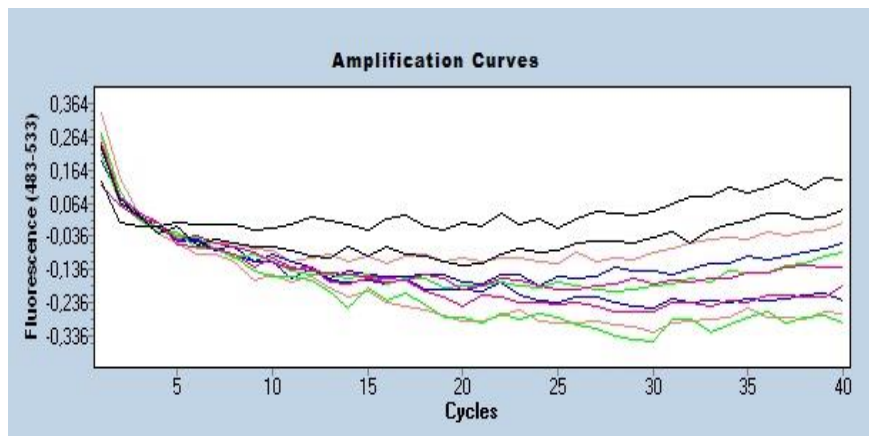
Día 0
Día 11 Uruguay
Día 11 España
Día 11 sin infectar
Control +
Control -

KBV:



Día 0
Día 11 Uruguay
Día 11 España
Día 11 sin infectar
Control +
Control -

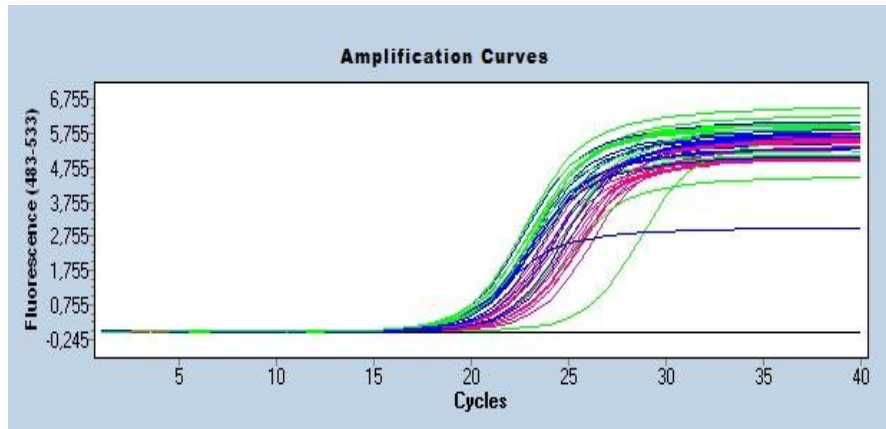
SBV:



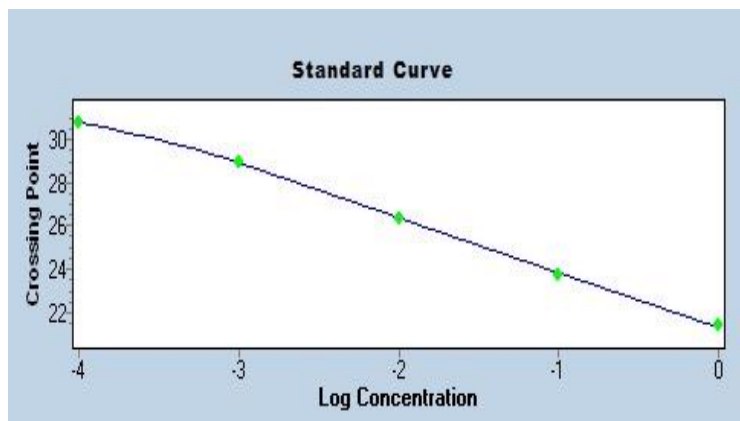
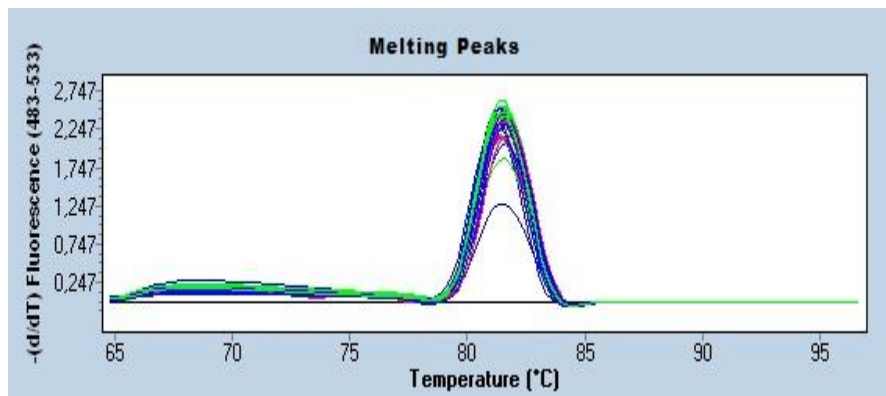
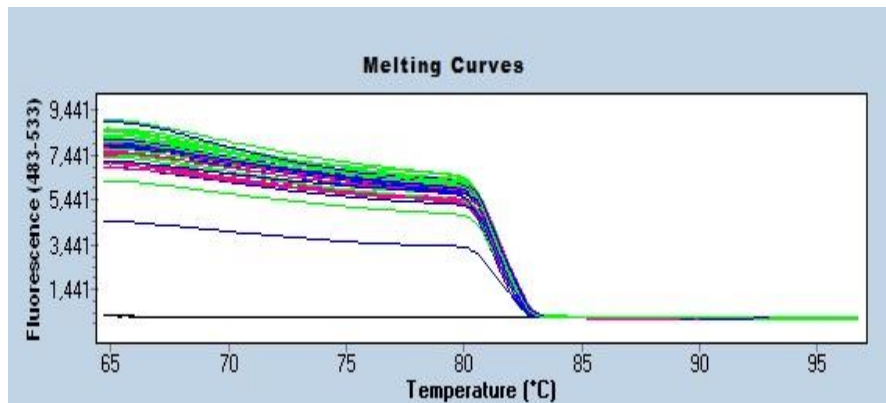
Día 0
Día 11 Uruguay
Día 11 España
Día 11 sin infectar
Control -

10.2. Curvas de amplificación con su correspondiente curva de temperatura de *melting* del ADNc de los genes de referencia β -actina y RPS5 y eficiencia de la reacción.

β - actina:

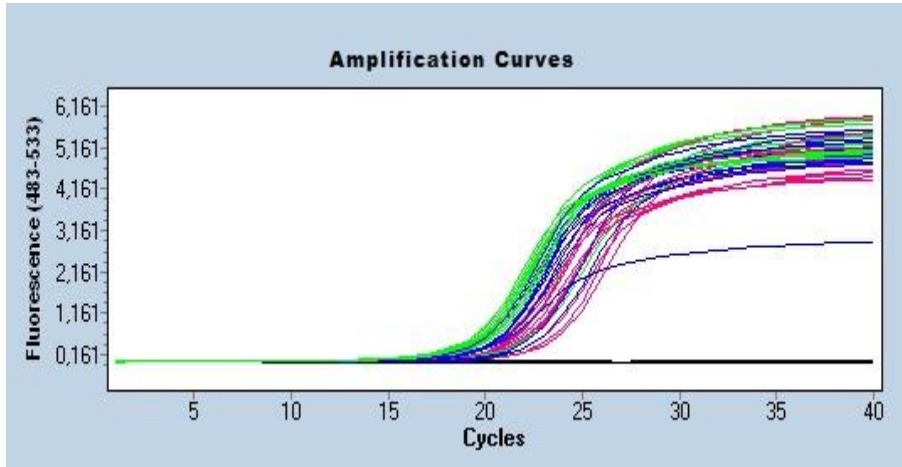


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
 Abejas sin infectar
 Control - de la reacción

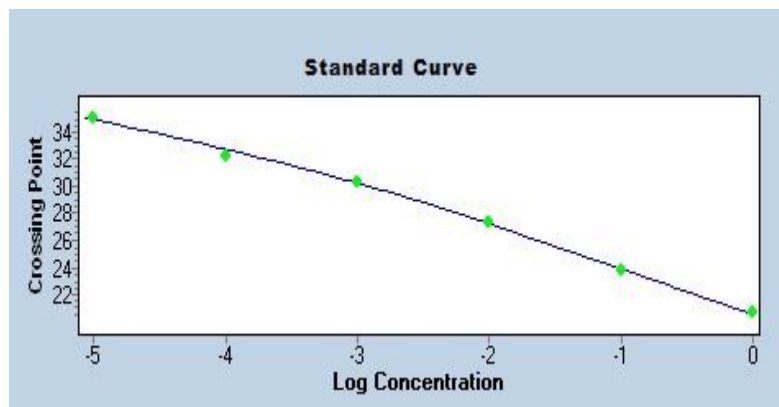
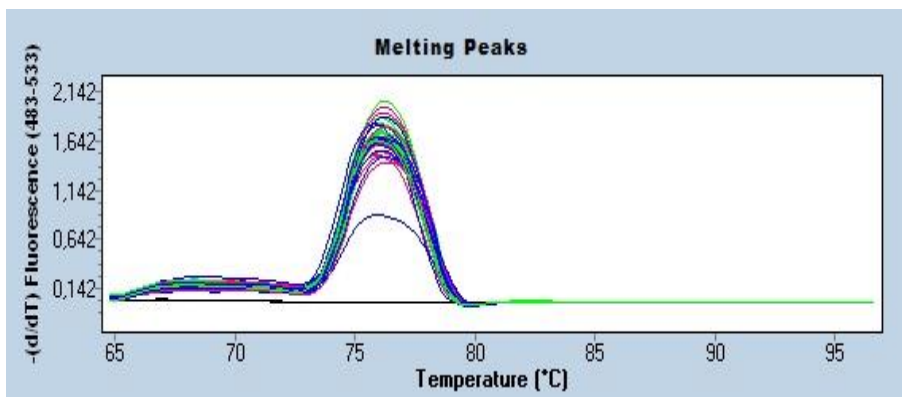
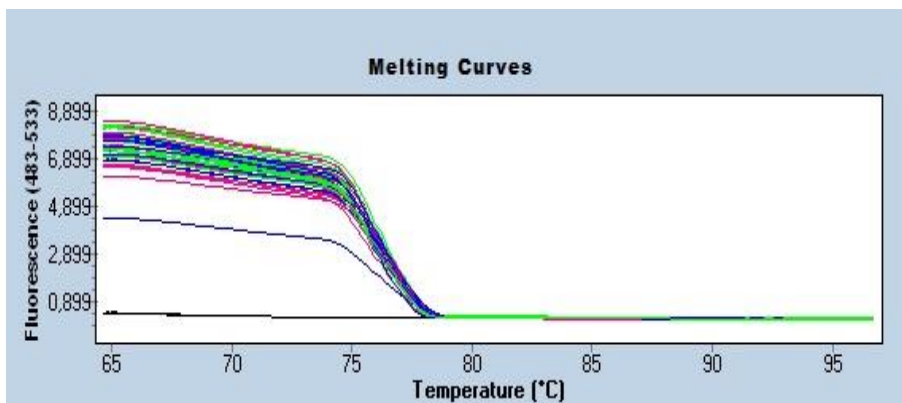


Eficiencia: 2,51

RPS5:



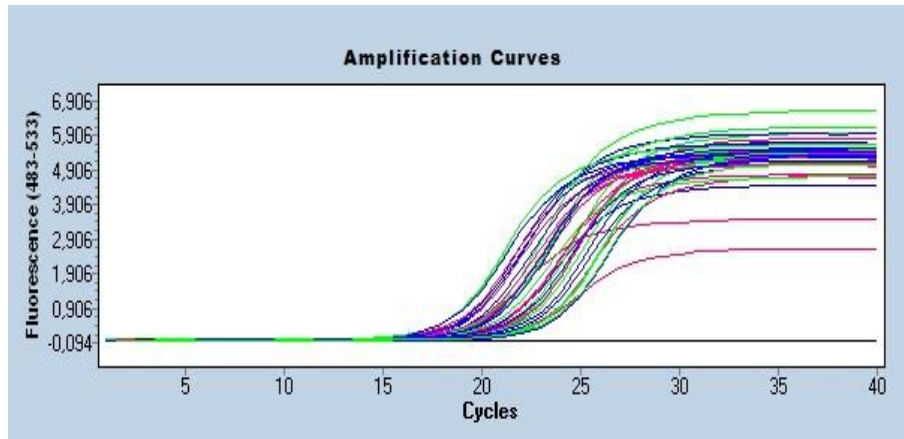
N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
Abejas sin infectar
Control - de la reacción



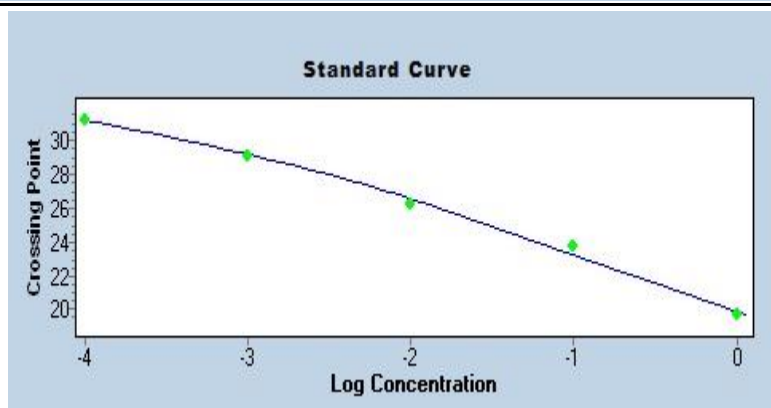
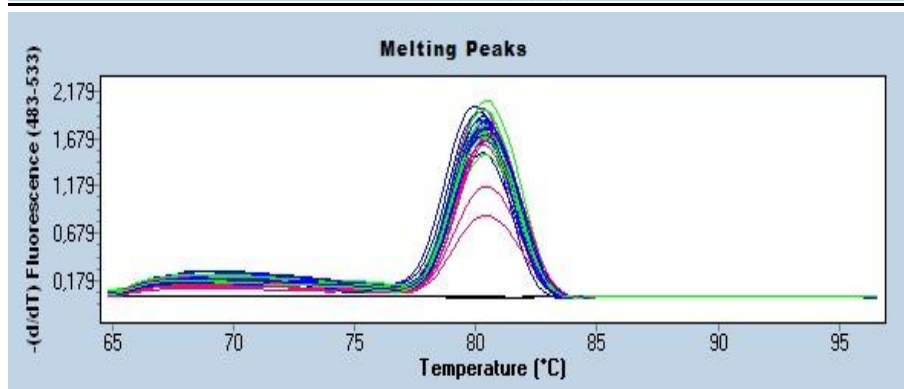
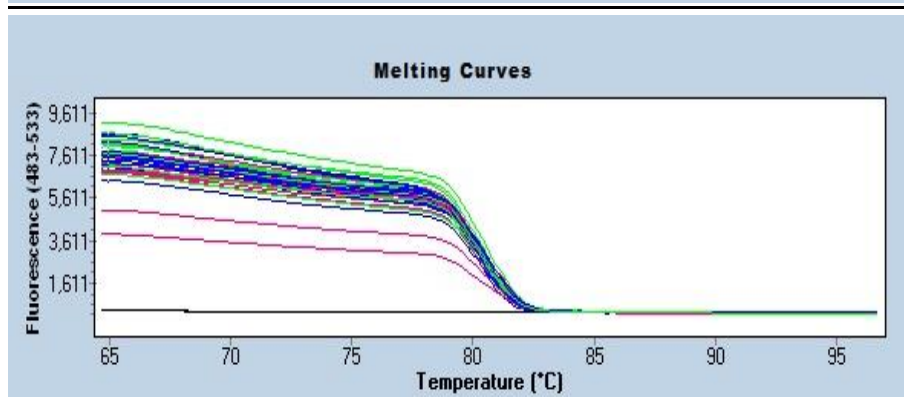
Eficiencia: 2,00

10.3. Curvas de amplificación con su correspondiente curva de temperatura de *melting* de los genes *aba*, *po*, *imd*, *lys*, *def*, *gld*, *hym* y *vg* con su correspondiente gráfico de eficiencia de la reacción.

Abaecina:

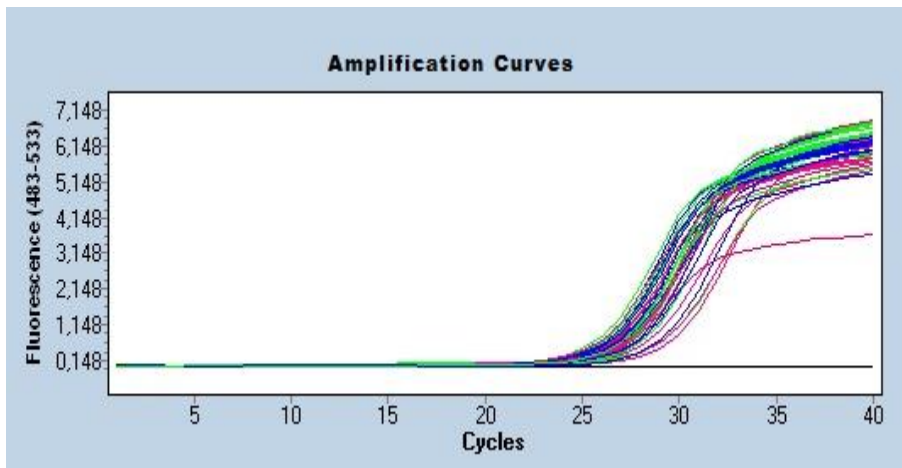


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
 Abejas sin infectar
 Control – de la reacción

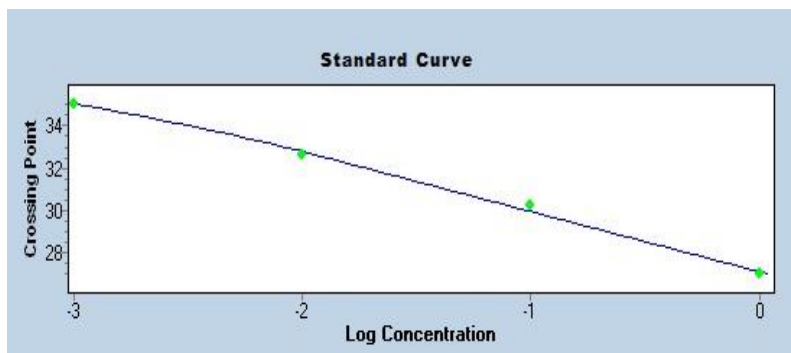
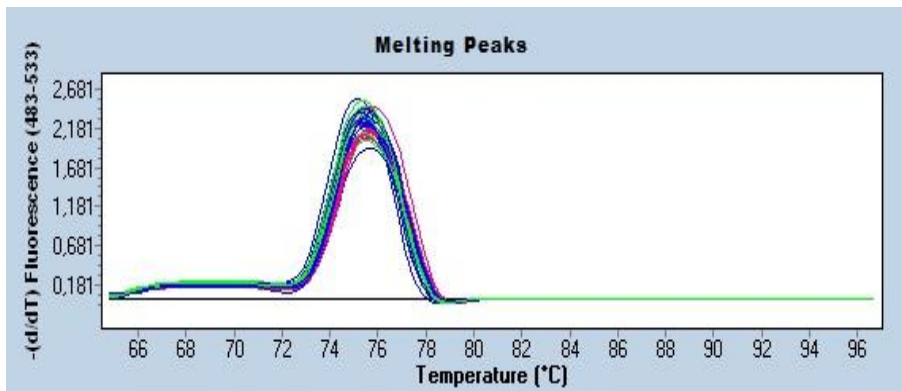
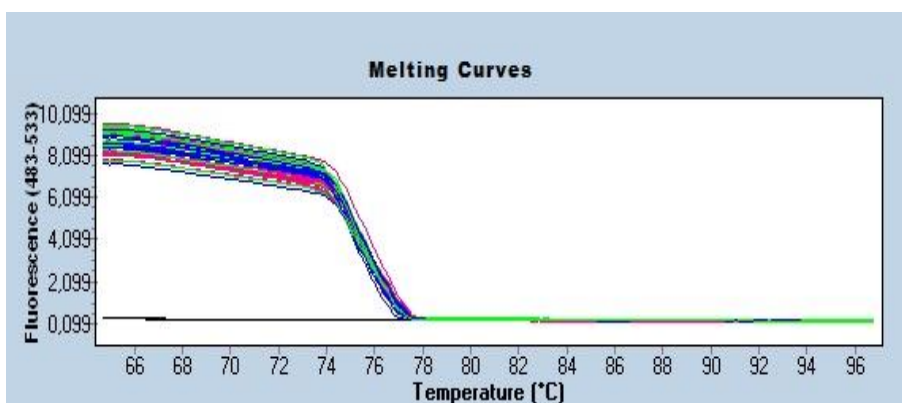


Eficiencia: 1,99

Profenol oxidasa:

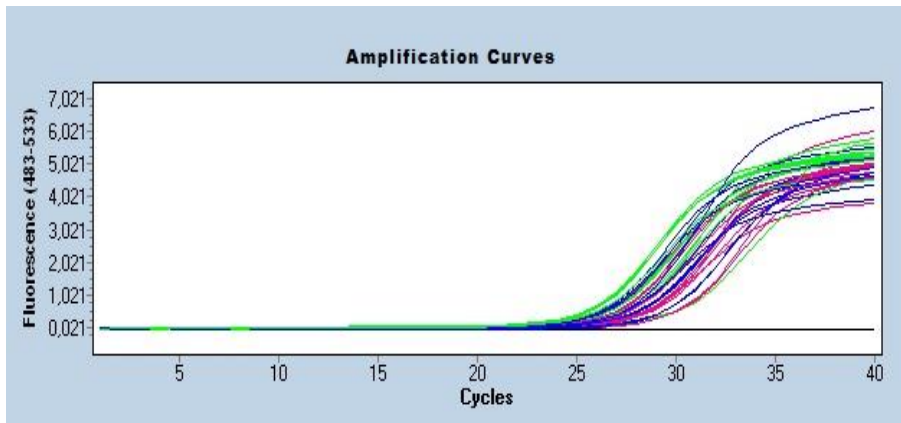


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
Abejas sin infectar
Control - de la reacción

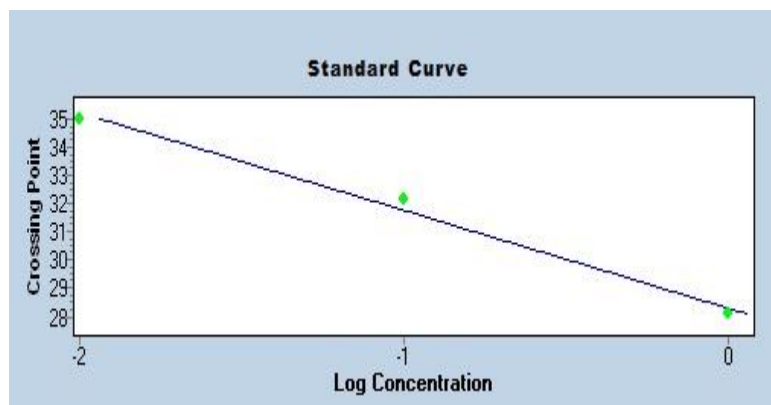
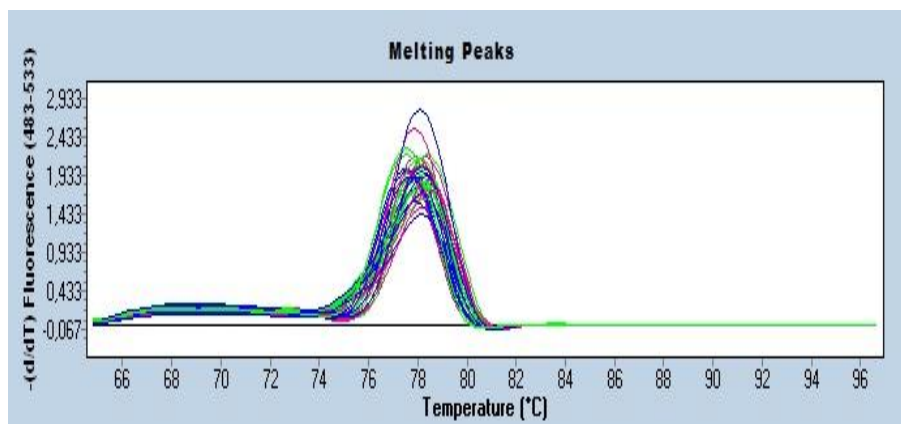
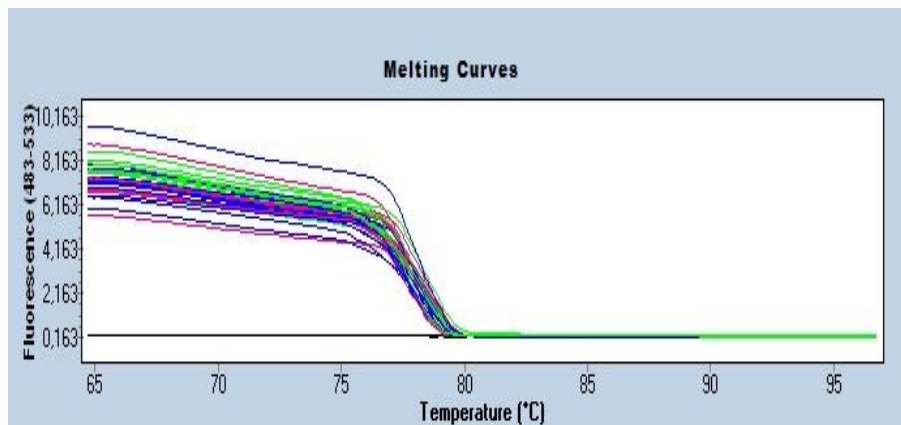


Eficiencia: 2,06

Imd:

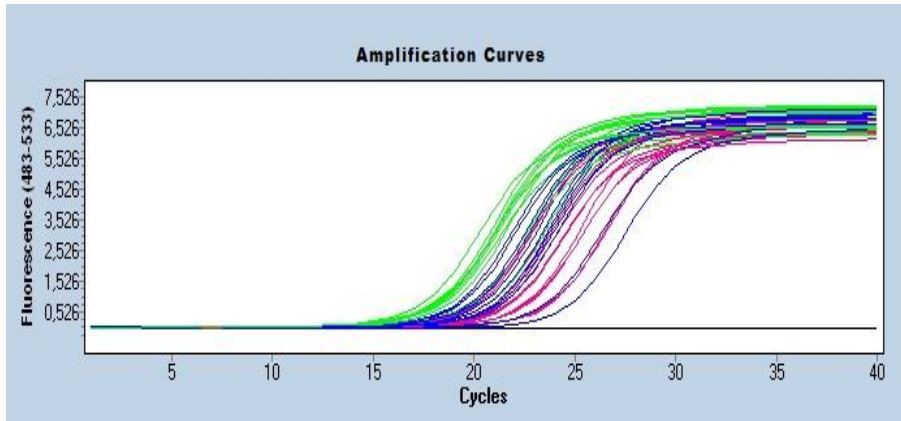


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
Abejas sin infectar
Control - de la reacción

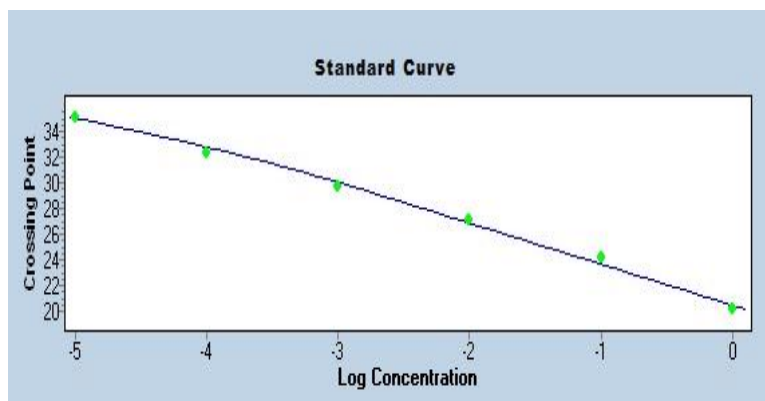
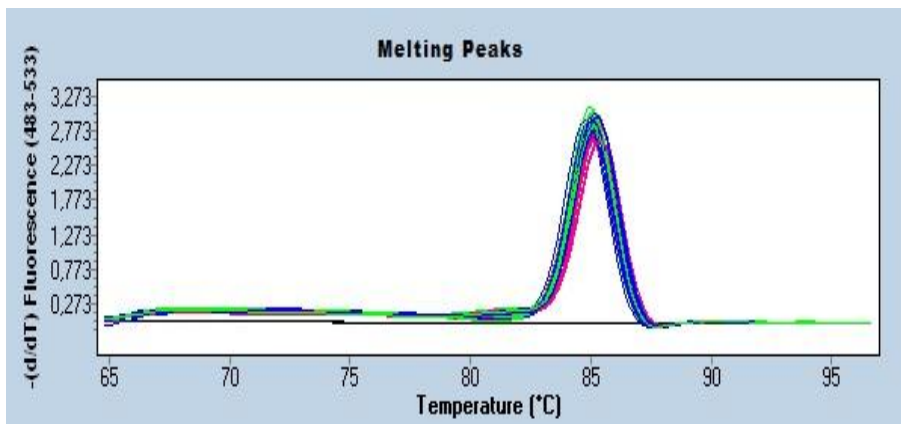
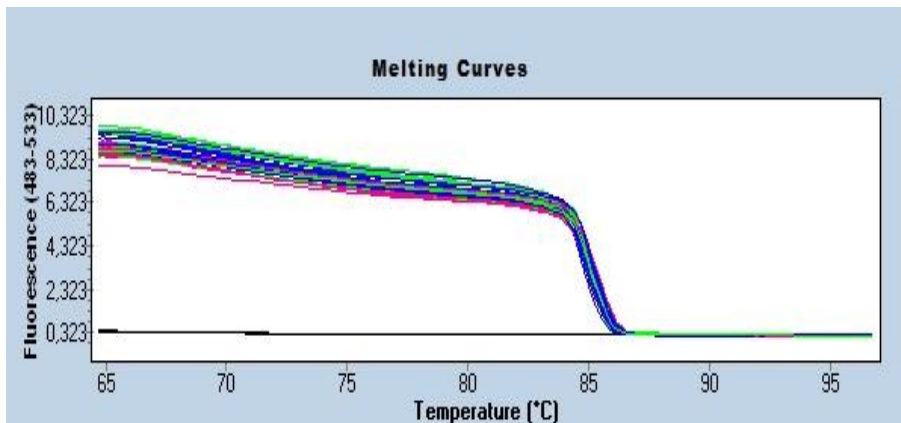


Eficiencia: 1,95

Lisozima:

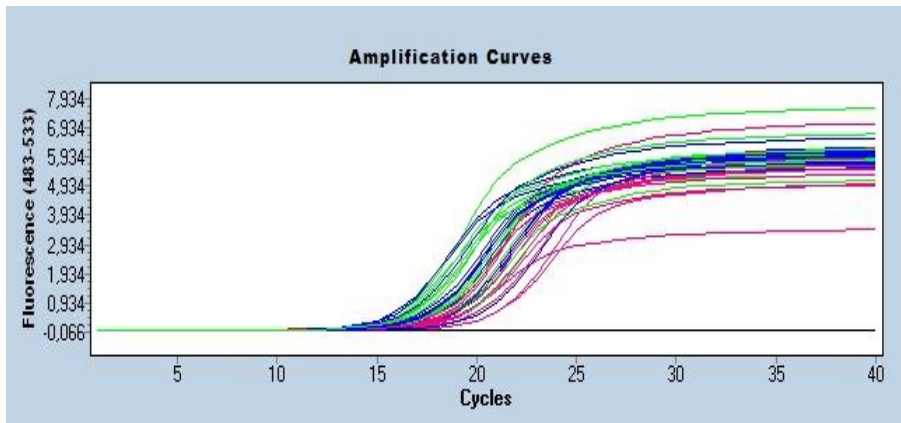


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
Abejas sin infectar
Control - de la reacción

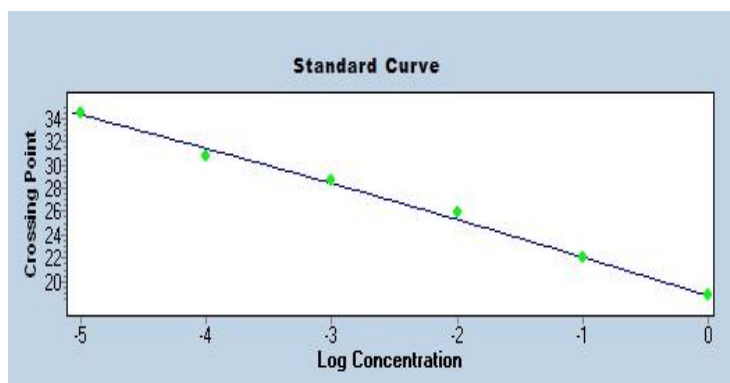
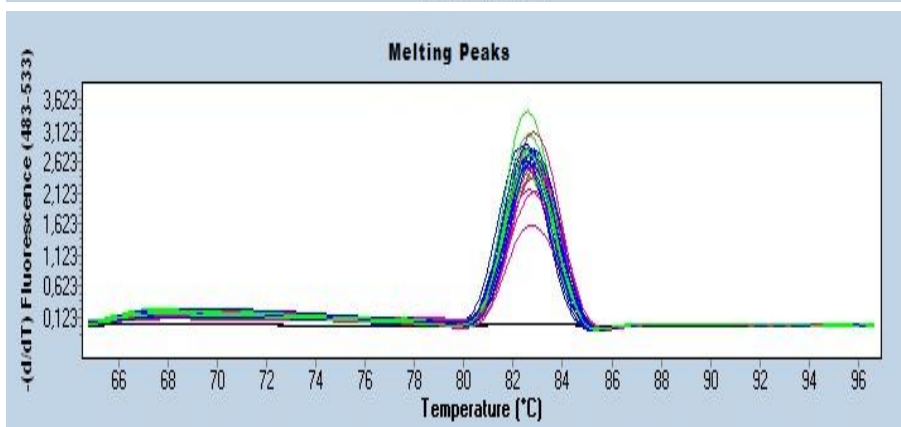
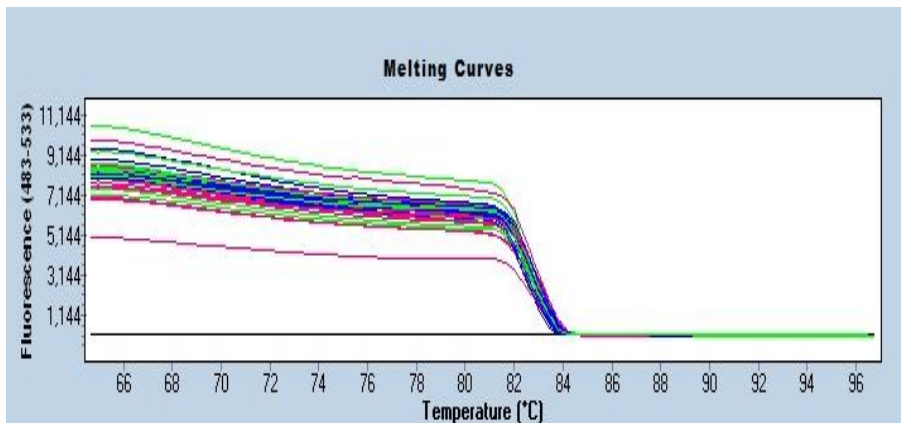


Eficiencia: 2,07

Defensina:

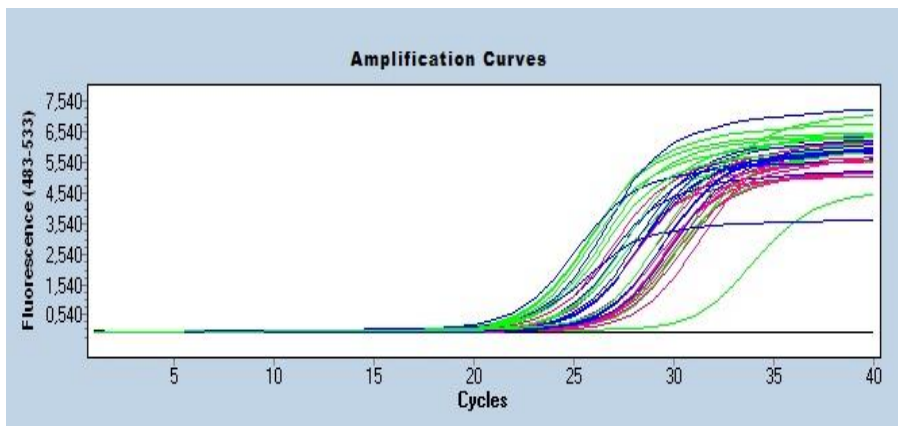


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
Abejas sin infectar
Control – de la reacción

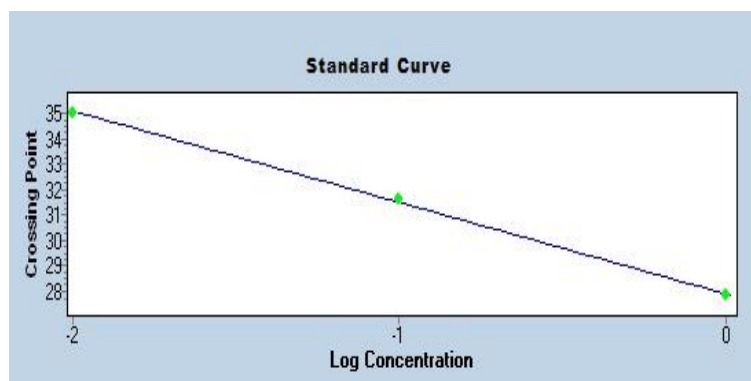
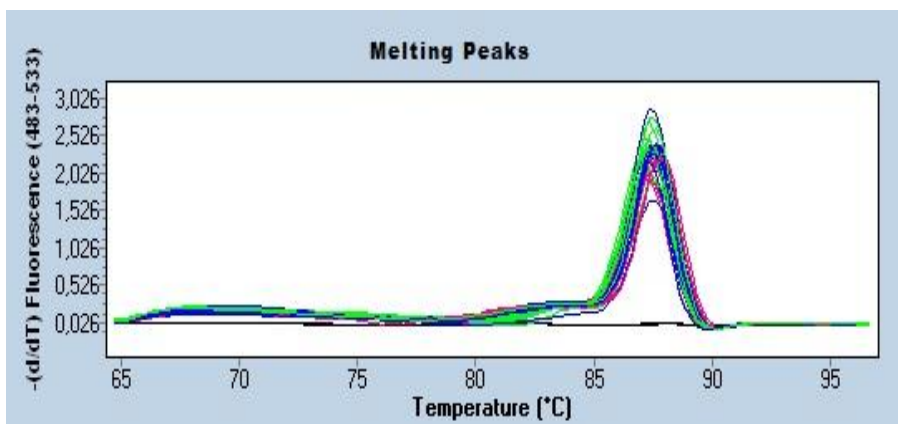
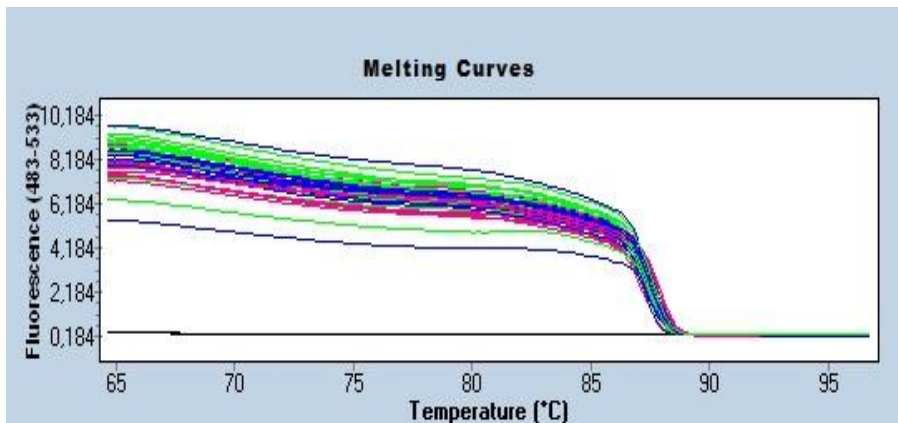


Eficiencia: 2,01

Glucosa deshidrogenasa:

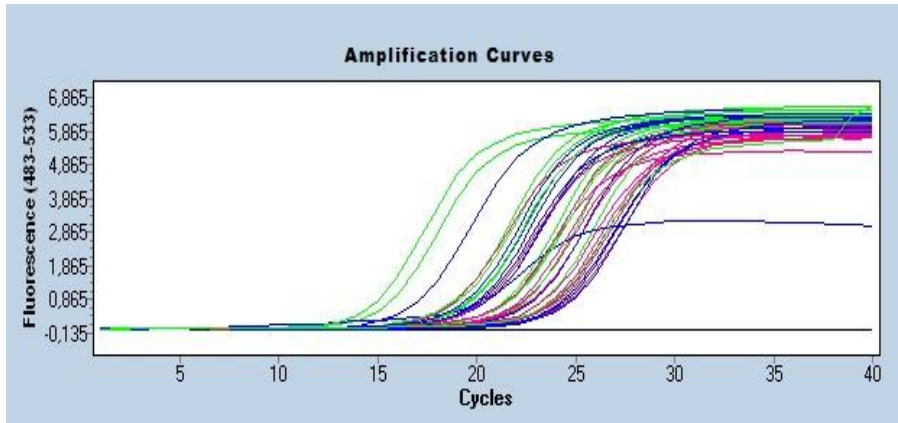


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
Abejas sin infectar
Control - de la reacción

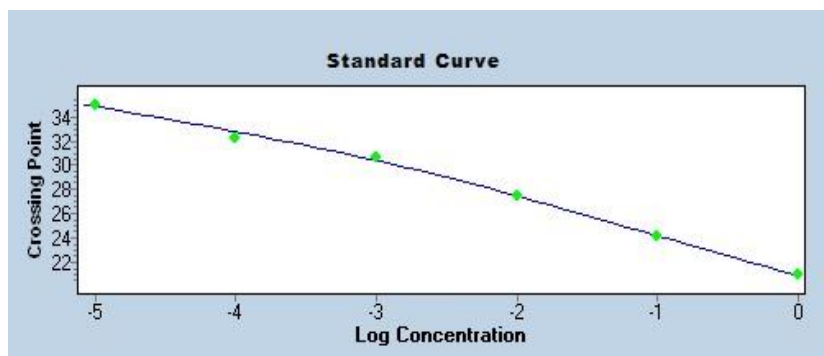
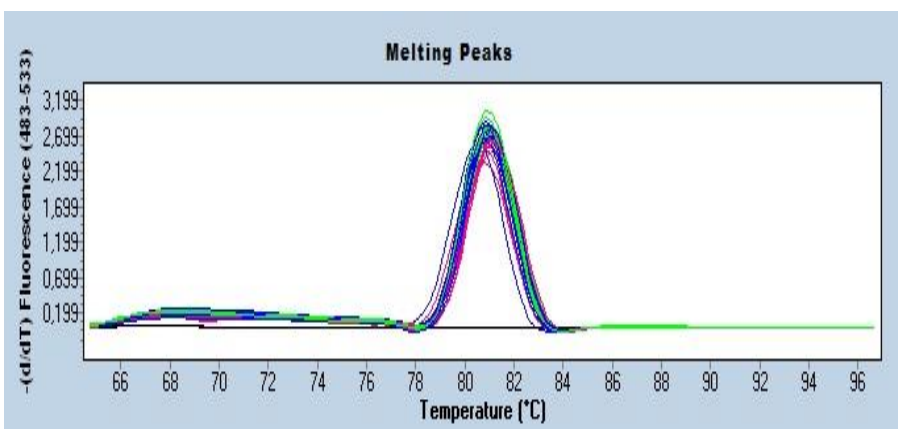
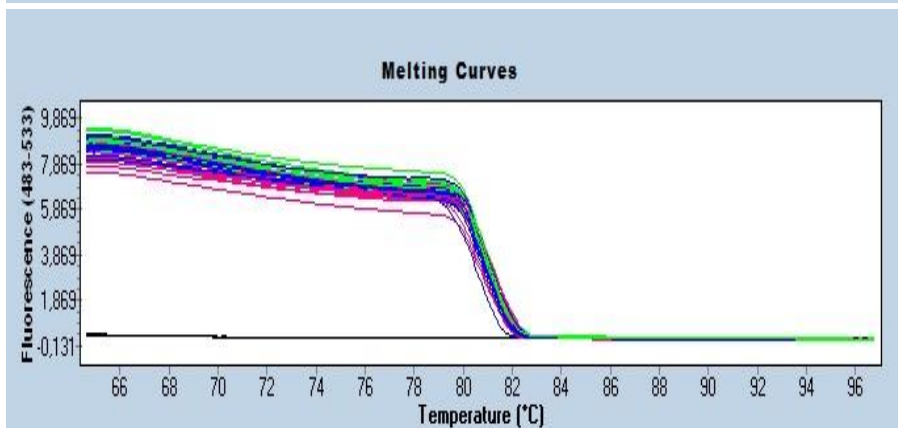


Eficiencia: 1,9

Himenoptecina:

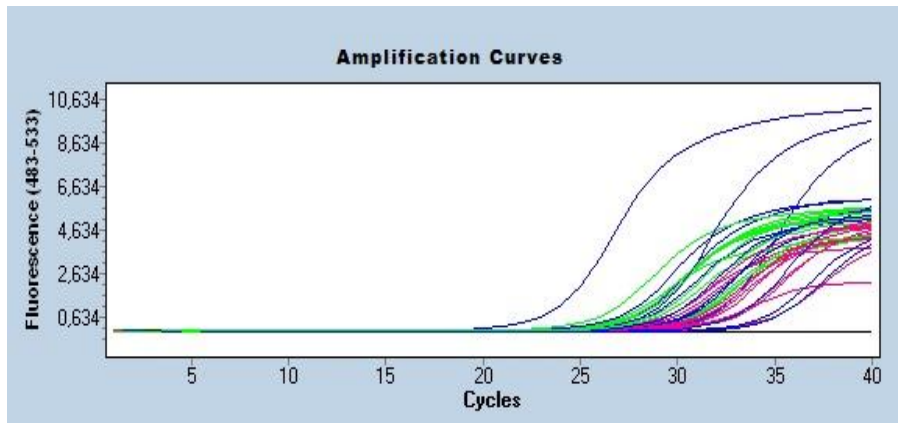


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
 Abejas sin infectar
 Control – de la reacción

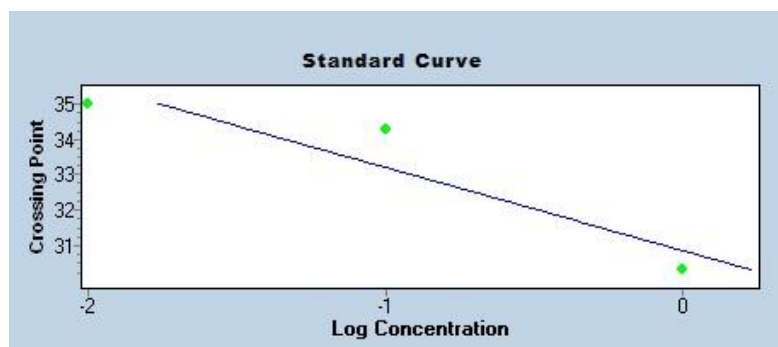
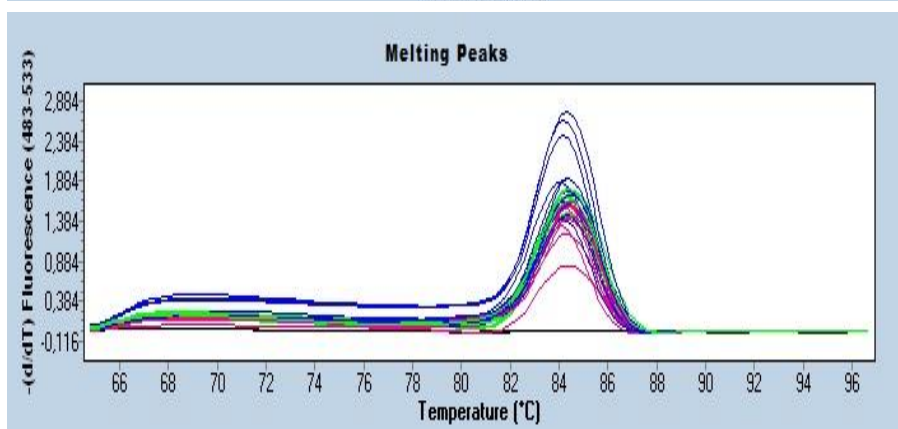
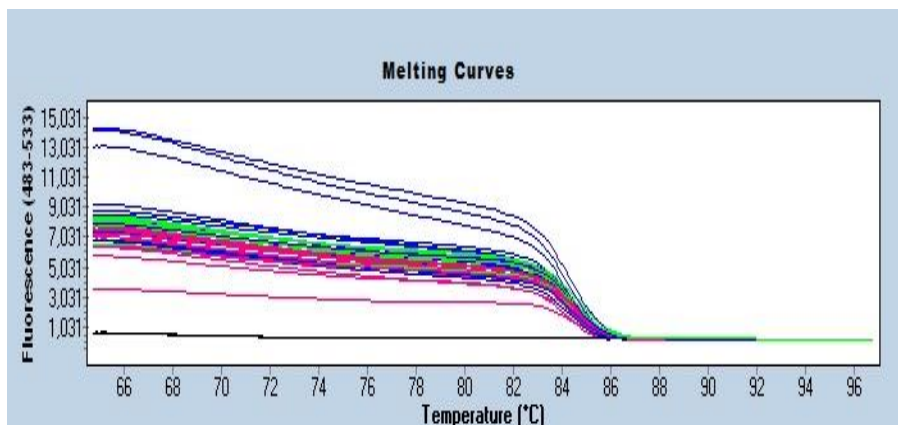


Eficiencia: 2,01

Vitelogenina:



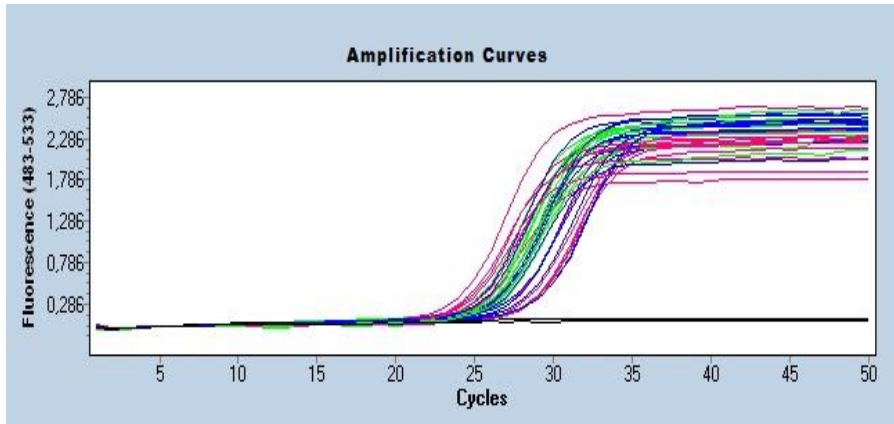
N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
Abejas sin infectar
Control – de la reacción



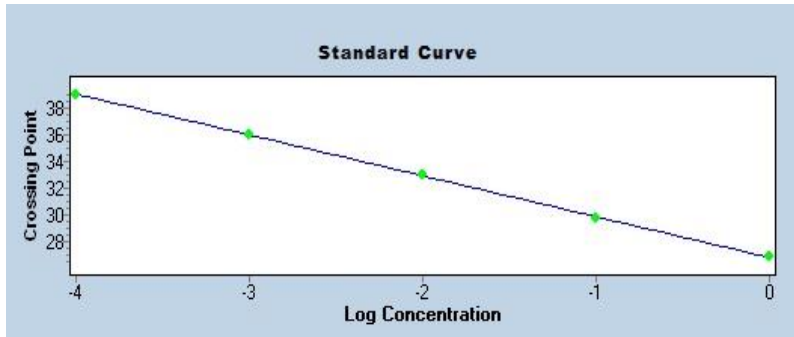
Eficiencia: 2,66

10.4. Curvas de amplificación del ADNc de los genes *birc5* y *ptp* con su correspondiente gráfico de eficiencia de la reacción.

Birc5:

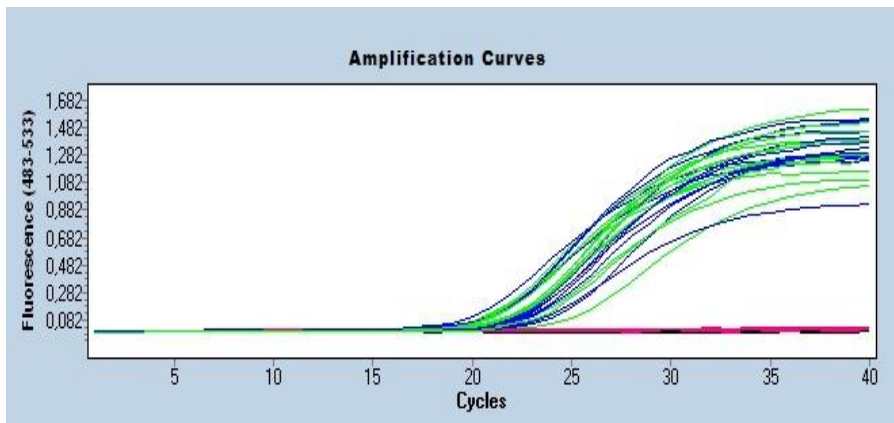


N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
 Abejas sin infectar
 Control – de la reacción

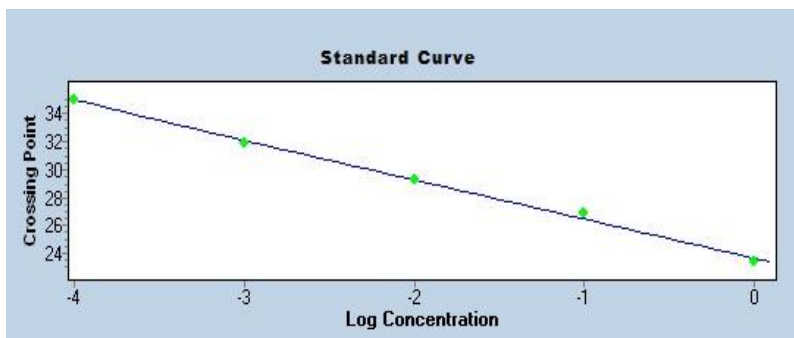


Eficiencia: 2,12

Ptp:



N. ceranae de Uruguay
N. ceranae de España
 Abejas sin infectar
 Control – de la reacción



Eficiencia: 2,26