

Análisis de los patrones de diversidad
genética de *Nosema ceranae*,
un patógeno emergente de
Apis mellifera

Tamara Gómez Moracho

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA
PATOLÓGICA E CIENCIAS FORENSES

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
2015

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓXICA E CIENCIAS
FORENSES



Tese doutoramento

**Análisis de los patrones de diversidad
genética de *Nosema ceranae*,
un patógeno emergente
de *Apis mellifera***

Memoria presentada para la obtención del grado de doctor

Tamara Gómez Moracho



AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES

Dr. Xulio M. Maside Rodríguez, Profesor do Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses da Universidade de Santiago de Compostela,

Dra. Carolina Bartolomé Husson, investigadora contratada da Universidade de Santiago de Compostela, e

Dr. Mariano Higes Pascual, Asesor de Investigación do Centro Apícola Regional, Centro Agrario de Marchamalo (Junta de Castilla-La Mancha),

Como Directores da Tese de Doutoramento titulada

«Análisis de los patrones de diversidad genética de *Nosema ceranae*, un patógeno emergente de *Apis mellifera*.»

Presentada por Dna. Tamara Gómez Moracho
Alumna do Programa de Doutoramento Medicina Molecular

Autorizamos a presentación do tese, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento e que non incorre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992

Asinamos en Santiago de Compostela, a 25 de Xuño de 2015

Dr. X. Maside Rodríguez

Dra. C. Bartolomé Husson

Dr. M. Higes Pascual

Tamara Gómez Moracho





El trabajo presentado en esta tesis se ha realizado en la Universidade de Santiago de Compostela y en el Centro Agrario de la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (CAR), bajo la dirección de los doctores Xulio M. Maside Rodríguez, Carolina Bartolomé Husson y Mariano Higes Pascual, como parte del proyecto INIA RTA2009-00057 y RTA2013-00042-subp 06



Fotografía de la cubierta: Juan C. Gómez Arce

Agradecimientos

Walt Disney dijo “Usted puede diseñar y crear, y construir el lugar más maravilloso del mundo, pero se necesita gente para hacer el sueño realidad”. Hoy este sueño, repleto de experiencias, de trabajo y esfuerzo, se ha hecho realidad en forma de libro, de tesis doctoral, cuya realización no hubiera sido posible sin la participación, directa o indirecta, de muchas de las personas de mí alrededor. A todos, muchísimas gracias.

A mis directores de tesis, Mariano, Carolina y Xulio, gracias por haberme hecho partícipe de este proyecto. Por hacerme pensar y por enseñarme no solo a encontrar lo que uno busca, sino a explicar lo que ha encontrado. A Mariano, por haber confiado en mí, por transmitirme todo lo que sabes, por tu apoyo, por tu cariño, por tus palabras de ánimo y sobre todo, por tu entusiasmo a la hora de hablar de las abejas y de cada proyecto en el que te embarcas. Es realmente gratificante trabajar con gente tan apasionada por su trabajo como tú, y créeme, haces que eso sea contagioso. A Carolina y Xulio, por hacer que todo fuese más fácil durante estos años, tanto a nivel profesional como personal, vuestra ayuda y apoyo han sido esenciales para llegar *al final del camino*. A Carolina, por tu ayuda infinita en todo, sobre todo en los análisis genéticos, por dedicarme tanto tiempo, por tu paciencia, por estar siempre al otro lado del ordenador resolviendo mis dudas y por el ánimo que me has transmitido en todos estos años. Y a Xulio, por tus palabras alentadoras, por todo lo que me has enseñado de genética, y porque cada una de tus cuestiones ha enriquecido mi conocimiento.

A Raquel, muchísimas gracias por todo tu tiempo, por mostrarme cómo se debe trabajar en un laboratorio, por tu dedicación y tu ayuda durante todo este tiempo, por tu cariño, por tu cercanía y por tus abrazos sinceros.

A los investigadores con los que he podido compartir experiencias y que de algún modo u otro han contribuido a mi formación durante estos años. A la Dra. Aránzazu Meana, por sus críticas, valoraciones y recomendaciones, por su profesionalidad y por su vitalidad. A la Dra. Amelia Virginia González Porto, por su cercanía y su cariño. A la Dra. Pilar de la Rúa, por su colaboración y su sonrisa inquebrantable. A la Dra. Pilar García Palencia, por darme la oportunidad de trabajar con muestras de microscópica electrónica. A Antonio Nanneti, por su simpatía en cada visita y en cada congreso.

A Sole, muchísimas gracias por tu acogerme como tú “pupila” en mis inicios, por enseñarme cómo se debe hacer una PCR y a clonar, por explicarme como montar secuencias, por tus

chuletas y referencias, por tu organización, por tus consejos y porque tus *“inunca, nunca, nunca...!”* o *“¡siempre, siempre, siempre...!”* hacen que las cosas no se olviden. A Cristina Botías, por tu acogida en el laboratorio en mi llegada, por compartir conmigo mi primera salida al campo, por tu simpatía, por tu sencillez y por tu alegría.

A mis compañeras de despacho y laboratorio con las que además he compartido las “penas y alegrías” a lo largo de este camino. A Almudena, por tu ayuda y tus consejos, por compartir conmigo tu ansiedades y escuchar las mías y porque en estos últimos meses has sido quien mejor me ha comprendido. A Cristina Rodríguez, por tu simpatía, tu organización, tu alegría y desparpajo y por hacernos ver siempre las cosas de color de rosa (y a veces en sentido literal). Y a Alejandro y Miguel, por todos los buenos ratos y porque sois el aire fresco que rompe la rutina del laboratorio.

A mis compañeras del laboratorio de patología apícola: Carmen A., Mari Carmen, Tere, Virginia, Carmen U. y María. Por vuestra ayuda desinteresada, por vuestra buena armonía, y porque conseguís que el trabajo sea sencillo y que te olvides de dónde estás. Sin vosotras el trabajo habría sido más difícil de realizar. Y por supuesto, a los *sheriffs* Javi y Jesús, por ayudarme tanto con las colmenas y cuidar de mis *abejitas* en muchísimas ocasiones.

Gracias también a todos los *visitantes* del laboratorio, Irene, Laura, María, Belén, Claudia y Riccardo, por vuestra compañía, vuestro interés, y por compartir vuestras experiencias y conocimientos conmigo.

A la gente de Edimburgo, y en especial, *thanks to Brian and Deborah Charlesworth, for opening me the doors of your laboratory and your life, for helping me with population genetics, but mainly for giving me the chance to live this experience.*

A los directores del Centro Agrario de Marchamalo, durante mi estancia en el mismo, Ángel Sanz y José Alberto Viñuelas. Y en general a toda la gente que trabaja allí y que hacéis que los madrugones sean más llevaderos.

A mis padres. Por su infinita paciencia, por su apoyo incondicional durante toda mi vida y todo aquello en lo que me he visto envuelta. Porque siempre habéis dejado que eligiera mis pasos, y ahora, aquí estoy... A mi madre, gracias por aguantar las charlas de mis PCRs, clonaciones, genes y “bichos”, por enseñarme a relativizar las cosas, por tu paciencia y por mantener la calma por mí. A mi padre, por enseñarme que lo más importante en esta vida es aprender a disfrutar de cada momento. A los dos, muchísimas gracias por estar siempre ahí.

A Luis, por tu apoyo durante todo este tiempo, y sobre todo en esta recta final, cuando más duro ha sido, por aguantar mi humor y mi “deshumor”, por hacerme ver que las cosas con calma salen mejor, aunque se alarguen en el tiempo, por ayudarme en todo lo que puedes, por conseguir que las cosas siempre sean más fácil de lo que parecen, y por quererme tantísimo.

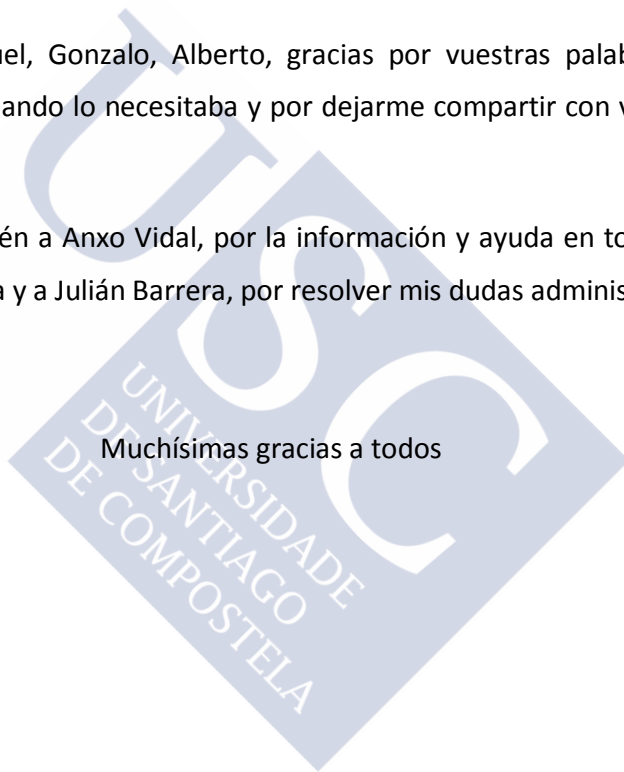
A mis tíos y primas, por vuestro interés en mi trabajo, por vuestro apoyo, vuestra compañía y por los buenos ratos conversando con un buen vinito. Y al resto de mi familia, a los que os veo cada fin de semana y me dais ánimos para continuar y llegar al final.

Por supuesto, muchas gracias a mi Pepi, por tus velitas a San Nicolás y porque como buena abuela siempre tienes bonitas palabras para mí.

A Carlos, Madi, Miguel, Gonzalo, Alberto, gracias por vuestras palabras de ánimo, por sacarme de mi clausura cuando lo necesitaba y por dejarme compartir con vosotros tan buenos ratos.

Muchas gracias también a Anxo Vidal, por la información y ayuda en todo tipo de trámites en Santiago de Compostela y a Julián Barrera, por resolver mis dudas administrativas en el INIA.

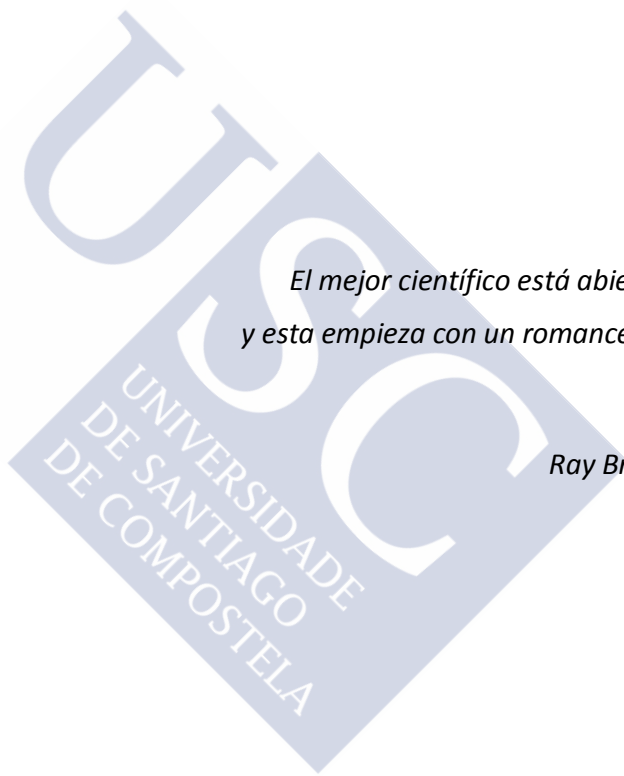
Muchísimas gracias a todos





*El mejor científico está abierto a la experiencia,
y esta empieza con un romance, es decir, la idea de
que todo es posible.*

Ray Bradbury (1920-2012)







A mis padres

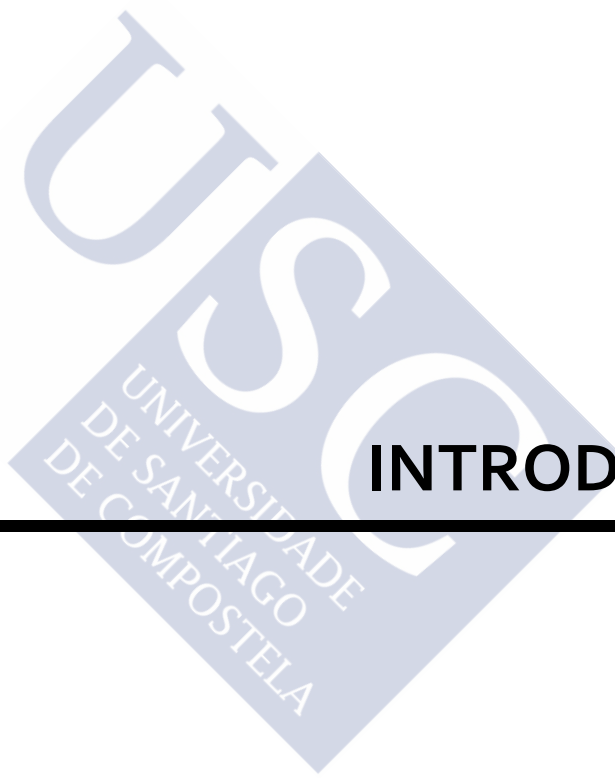
A Luis



Índice

INTRODUCCIÓN	1
1 <i>Apis mellifera</i>	3
1.1 Importancia de <i>Apis mellifera</i>	3
1.2 Origen y distribución de <i>Apis mellifera</i>	5
2 Agentes nosógenos que pueden afectar a las abejas	7
2.1 Plaguicidas	7
2.2 Patógenos	8
2.2.1 Virus	9
2.2.2 Bacterias	10
2.2.3 Protozoos	10
2.2.4 Ácaros	11
2.2.5 Hongos	12
3 El despoblamiento: un fenómeno reciente y desconocido	14
3.1 Descripción	14
3.2 Primeras evidencias	15
3.3 <i>N. ceranae</i> y el despoblamiento	15
3.4 Otros factores propuestos y sinergias	17
4 <i>Nosema</i> spp.	19
4.1 Microsporidios	19
4.1.1 Características generales	19
4.1.2 Taxonomía de los microsporidios	21
4.2 Diferencias morfológicas entre <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i>	23
4.3 Infección y desarrollo en <i>A. mellifera</i>	24
4.4 Acción patógena	27
4.4.1 Lesiones a nivel individual	29
4.4.2 Consecuencias en la colonia	31
4.5 Genética: características del genoma y diversidad genética.	32
OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
PUBLICACIONES	43
I.High levels of genetic diversity in <i>Nosema ceranae</i> within <i>Apis mellifera</i> colonies	45
II.Recent worldwide expansion of <i>Nosema ceranae</i> (Microsporidia) in <i>Apis mellifera</i> populations inferred from multilocus patterns of genetic variation	55
III.Virulence and polar tube protein genetic diversity of <i>Nosema ceranae</i> (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybee (<i>Apis mellifera iberiensis</i>)	65
IV.Evidence for weak genetic recombination at the <i>PTP2</i> locus of <i>Nosema ceranae</i>	81
V.Population genetics of <i>Nosema apis</i> and <i>Nosema ceranae</i> : one host (<i>Apis mellifera</i>) and two different histories	93
DISCUSIÓN	129
CONCLUSIONES	145
BIBLIOGRAFÍA	149
ANEXOS: Material suplementario	185





INTRODUCCIÓN



1 *Apis mellifera*

Desde la prehistoria el ser humano ha aprovechado los productos obtenidos de las abejas, que recolectaban en los nidos que esos insectos sociales formaban en los árboles o cavidades. Las primeras evidencias de esta relación aparecen en las pinturas rupestres de la Cueva de la Araña, en Bicorp (Valencia), las cuales datan de hace más de 7.000 años.

Con el paso del tiempo el ser humano desarrolló la habilidad de construir colmenas, imitando los refugios que las abejas buscaban en la naturaleza, hechos que se remontan hasta el año 2.450 a.C. en el antiguo Egipto, tal como muestran los jeroglíficos grabados en las pirámides. Esto facilitó el acceso a los productos apícolas y especialmente a la miel, el único edulcorante conocido hasta la utilización de la caña de azúcar, en el siglo IV a.C. (Crane, 1999).

1.1 IMPORTANCIA DE *APIS MELLIFERA*

La abeja melífera más abundante a nivel mundial es la abeja Europea u Occidental, *Apis mellifera* y las subespecies de la misma. Su fácil manejo, su plasticidad para adaptarse a nuevos ambientes, su capacidad de recolectar polen y néctar de una amplia variedad de plantas, unido a la gran distancia que pueden recorrer en vuelo para realizar el pecoreo (4,5 km o más de radio alrededor de la colmena; Seeley, 1985), y de almacenaje durante los meses de primavera y verano (Le Conte and Navajas, 2008) hacen que esta especie sea de gran interés para el sector apícola.

A nivel económico, los productos obtenidos en esta actividad, como la miel, el polen, el néctar o la cera, además de ser la principal fuente de ingreso para los apicultores profesionales, supone un importante valor de mercado a nivel mundial; p. ej. en España la producción de miel generó 105 millones de euros en el año 2013 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente; MAGRAMA, 2013). Sin embargo, probablemente la función como polinizadores de las abejas melíferas sea todavía más importante, tanto desde el punto de vista económico como medioambiental, como por su impacto directo en la producción agrícola. Concretamente, se estima que el 35% de la producción agrícola mundial para consumo humano depende de la acción de los polinizadores (Klein et al., 2007; Aizen and Harder, 2009), cuyo servicio se ha valorado en torno a los 153.000 millones de euros (Gallai et al., 2009). Aunque los polinizadores silvestres cooperan de forma significativa en esta tarea (Garibaldi et al., 2013), gran parte de este valor recae en la labor llevada a cabo por *A. mellifera*, que contribuye de forma directa a un aumento en la producción (Klein et al., 2007), siendo el insecto más utilizado en monocultivos (McGregor, 1976; Delaplane and Mayer, 2000), por lo que resulta frecuente que en países como EE.UU se alquilen y transporten colmenas exclusivamente para tal fin (Carreck and Williams, 1998; Morse and Calderone, 2000). En España esta práctica es menos común y se utiliza ocasionalmente para cultivos de melón y sandía.

La apicultura es una de las actividades agropecuarias con más importancia en España. Con más de 2,5 millones de colmenas censadas en 2014 (según recoge el MAGRAMA en el Programa de vigilancia piloto sobre las pérdidas de colonias de abejas 2014-2015) y con una producción de más de 30.000 toneladas de miel en 2013 (MAGRAMA, 2013), nuestro país es la principal potencia apícola de la Unión Europea, seguida de otros países como Grecia, Italia o Francia. En los últimos años el número de explotaciones registradas en España ha ascendido hasta 27.589 (REGA, 2015), superando en un 13,1% las del año 2008. En el año 2013, el 19% de estas explotaciones estaban dedicadas a la apicultura profesional (término que se aplica a aquellas explotaciones con más de 150 colmenas), representando más del 80% del total de colmenas censadas, superando el porcentaje de colmenas dedicadas a este tipo de explotaciones en años anteriores (p.ej. 67% en 1992, o 72% en 2011), lo que demuestra un gran crecimiento del sector en los últimos años (REGA, 2015).

La actividad de *A. mellifera* resulta esencial para la estabilidad de los ecosistemas ya que favorece la reproducción sexual de muchas plantas silvestres (Klein et al., 2007). De hecho, el 80% de la flora silvestre europea y el 90% de las especies de angiospermas modernas dependen directamente de la acción polinizadora de los insectos (Kearns et al., 1998; Kwak et al., 1998).

Una reducción de las poblaciones de polinizadores supondría una gran amenaza para la diversidad biológica (Biesmeijer et al., 2006).

1.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE *APIS MELLIFERA*

Aunque actualmente esta especie se encuentra extendida por todo el mundo, su área de distribución natural comprende África, Europa y Oriente Medio. Dentro de *A. mellifera* se han identificado hasta 29 subespecies de abejas (Engel, 1999; Sheppard and Meixner, 2003), que están agrupadas en cuatro linajes de acuerdo a sus características morfológicas (Ruttner et al., 1978; Ruttner, 1988) y genéticas, estas últimas determinadas por el análisis del ADN mitocondrial (Garnery et al., 1992) y los polimorfismos de un sólo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) (Whitfield et al., 2006; Wallberg et al., 2014). De esta manera se establecieron los siguientes grupos de *A. mellifera*: linaje A, que comprende a las subespecies situadas en África; linaje M, que engloba a las subespecies del norte y oeste de Europa; linaje C, que corresponde a las subespecies del este de Europa, y linaje O, que incluye las subespecies localizadas en Turquía y Oriente Medio (Ruttner, 1988; Arias and Sheppard, 1996).

Aunque durante años se ha tratado de localizar el origen geográfico de *A. mellifera*, sigue sin existir consenso (Wallberg et al., 2014). Dado que este himenóptero comparte género con otras nueve especies de abejas, todas ellas confinadas en el continente asiático (Arias and Sheppard, 2005), parece razonable asumir que la población ancestral que dio origen a esta especie estaba localizada en Asia (**Figura 1**), desde donde habría colonizado nuevas áreas y ampliado su rango de distribución natural (Ruttner et al., 1978; Garnery et al., 1992). Sin embargo también se ha especulado sobre un posible origen africano (**Figura 1.c**; Whitfield et al., 2006).

Los últimos estudios moleculares sugieren que *A. mellifera* colonizó su rango de distribución natural hace unos 300.000 años, y que durante el último período glacial los ancestros de los linajes C y M quedaron aislados en refugios separados, lo que motivó su diferenciación en dos grupos genéticamente distintos que, posteriormente, recolonizaron el continente europeo (Han et al., 2012; Wallberg et al., 2014). Las poblaciones africanas, que dieron lugar al linaje A, habían alcanzado su máxima expansión durante el período glacial (Wallberg et al., 2014).

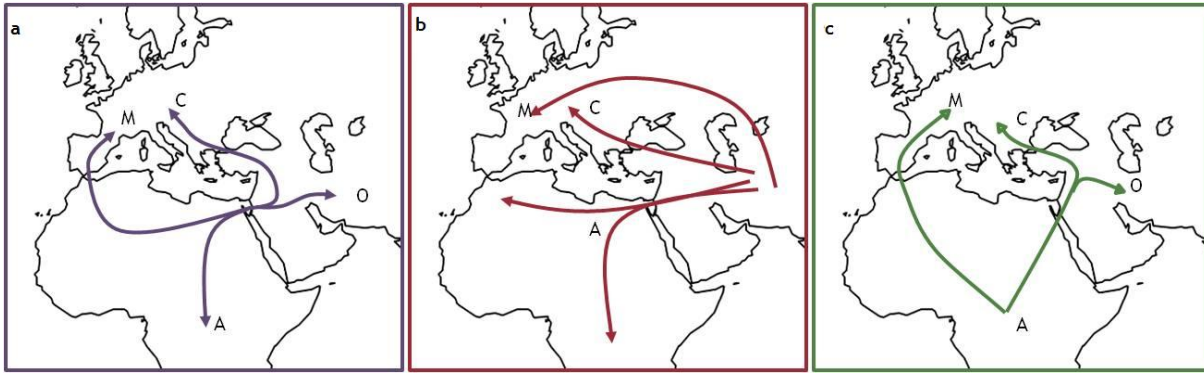


Figura 1 Hipótesis sobre el origen de *A. mellifera* y su distribución. a: hipótesis propuesta por Ruttner et al., en 1978, en la que se localiza el origen de *A. mellifera* en Oriente medio. b: Garnery et al., en 1992 plantean también un origen oriental, aunque con diferentes vías de diseminación a las propuestas por Ruttner en 1978 (a). c: Whitfield et al., (2006) sugieren la dispersión de *A. mellifera* a partir de un origen africano. Figura basada en la figura 1.b en Han et al., (2012)



2 Agentes nosógenos que pueden afectar a las abejas

Existe una gran variedad de agentes nosógenos que ponen en riesgo la viabilidad de las colonias de abejas y que pueden, en ocasiones, provocar el colapso de las mismas. Aunque estos agentes actúan de manera independiente la concurrencia simultánea de varios de ellos puede multiplicar de forma sinérgica sus efectos nocivos.

2.1 PLAGUICIDAS

Los plaguicidas han sido señalados por las autoridades sanitarias, el sector apícola y la opinión pública como los principales responsables de mortalidad de polinizadores en general y de abejas melíferas en particular (Decourtye et al., 2004a; El Hassani et al., 2005; Desneux et al., 2007; Blacquièrre et al., 2012). Sin embargo, en la comunidad científica no existe una opinión unánime al respecto (ver Blacquièrre et al., 2012; Henry et al., 2012 o Van der Sluijs et al., 2013, en contraposición a Cutler and Scott-Dupree, 2007, 2014, Sandrock et al., 2014 o Dively et al., 2015, entre otros).

Actualmente existen evidencias de que estos compuestos se acumulan en el polen, el néctar y en la gutación de las plantas (Schmuck et al., 2001; Girolami et al., 2009), por lo que constituyen posibles fuentes de exposición crónica (Faucon et al., 2005; Blacquièrre et al., 2012) desde las cuales pueden llegar a las abejas y a los diferentes productos de la colmena, como el

polen almacenado (pan de abeja; Bernal et al., 2010; Mullin et al., 2010; Pettis et al., 2013; Cutler et al., 2014) o la miel (Chauzat et al., 2006; Bernal et al., 2010; Mullin et al., 2010).

Los plaguicidas más utilizados en agricultura y por lo tanto los más prevalentes en el interior de las colmenas son herbicidas, acaricidas o fungicidas, aunque los que han sido señalados como los principales causantes de mortalidad de colonias de abejas a nivel mundial son los insecticidas de la familia de los neonicotinoides y de los fenilpirazoles. A pesar de que estos compuestos presentan una elevada toxicidad en condiciones de laboratorio (Suchail et al., 2001; Decourtye et al., 2004b; El Hassani et al., 2005; Aliouane et al., 2009), su efecto real sobre las colonias de abejas en condiciones de campo sigue siendo objeto de debate. Esto es debido a que la exposición a insecticidas de los distintos miembros de la colonia no es homogénea, por lo que muchos estudios no encuentran repercusiones negativas en las colonias de abejas cuando se exponen a cultivos tratados con diferentes plaguicidas (Nguyen et al., 2009; Bernal et al., 2011; Chauzat et al., 2011; Cresswell, 2011; Van der Zee et al., 2012; Pilling et al., 2013; Carreck and Ratnieks, 2014; Cutler and Scott-Dupree, 2014; Cutler et al., 2014; Dively et al., 2015).

No obstante, debido al riesgo que supone para los polinizadores la exposición crónica a estas sustancias, en el año 2013 la Unión Europea prohibió el uso de tres insecticidas de la familia de los neonicotinoides (imidacloprid, tiametoxan, clotianidina) y sus metabolitos derivados durante un periodo de dos años con el fin de obtener mayor información acerca de las consecuencias de estos productos en las colonias de abejas y poder establecer medidas más acordes para su empleo en los campos de cultivo (R(UE) nº 485/2013 de la Comisión, de 24 de mayo de 2013).

La estructura agraria y las características de la actividad apícola en España hacen improbable que las abejas se vean expuestas de manera crónica a este tipo de insecticidas, que no son los más prevalentes (Bernal et al., 2010, 2011; Higes et al., 2009b; Garrido-Bailón et al., 2010), por lo que no se deberían considerar una gran amenaza para la apicultura en nuestro país.

2.2 PATÓGENOS

A. mellifera puede verse afectada por una gran variedad de patógenos (Evans and Schwarz, 2011; Garrido Bailón, 2012) entre los que destacan virus, bacterias, protozoos, ácaros parásitos y

hongos, cuya identificación y control es esencial para mantener un correcto estatus sanitario en las colonias (**Figura 2**).



Figura 2. Principales patógenos de *A. mellifera*

2.2.1 Virus

Los virus afectan a la morfología, fisiología y comportamiento de las abejas, por lo que suponen un factor de riesgo para su salud (Highfield et al., 2009). Se conocen 19 especies de virus capaces de infectar a *A. mellifera*, de los cuales siete causan enfermedades severas: el virus de las alas deformadas (DWV), el virus de la cría en saco (SBV) (Iflaviridae), el virus de las realeras negras (BQCV), el virus israelí de la parálisis aguda (IAPV), el virus de la parálisis aguda (ABPV), el virus Kashmir (KBV) (Dicistroviridae) y el virus de la parálisis crónica (CBPV, virus ARN sin taxón asignado; Chevin et al., 2012) (Tentcheva et al., 2004; Cox-Foster et al., 2007; Highfield et al., 2009; de Miranda et al., 2010; de Miranda and Genersch, 2010; Dainat et al., 2012a; Francis et al., 2013). En los últimos años se están investigando otras especies potencialmente patógenas (Cornman et al., 2012) como el virus del lago Sinaí (LSV) o el virus de la parálisis letal del áfido (ALPV), ambos identificados en colonias de Bélgica (Ravoet et al., 2013) y España (Cepero et al.,

2014b), de los que todavía se desconoce su acción sobre las colonias de abejas (Cornman et al., 2012; Ravoet et al., 2013; Cepero et al., 2014b).

2.2.2 Bacterias

Paenibacillus larvae (Firmicutes, Bacilli, Paenibacillaceae) y *Melissococcus plutonis* (Firmicutes, Bacilli, Enterococcaceae) son dos especies de bacterias Gram positivas patógenas de la población de cría de la colonia. La primera es una bacteria esporulada, con forma de bacilo, que es el agente etiológico de la loque americana, una enfermedad altamente infecciosa ya que sus esporas son muy resistentes y permanecen viables durante largos periodos de tiempo (OIE, 2014). Por otro lado, *M. plutonis* son cocos no esporulados que causan la loque europea (OIE, 2008a). Aunque sólo las larvas sufren la enfermedad, las abejas adultas pueden actuar como reservorio de la bacteria facilitando su diseminación (Forsgren, 2010; Garrido-Bailón et al., 2013).

Teniendo en cuenta su baja prevalencia en las colonias de abejas en España (inferior al 5% durante última campaña en el periodo 2006-2007; Garrido-Bailón et al., 2013) estas bacterias, no constituyen un gran problema sanitario en nuestra apicultura (Garrido Bailón, 2012; Garrido-Bailón et al., 2013), y generalmente aparecen asociadas a un debilitamiento previo de la colonia ocasionado por *Varroa destructor* o *Nosema ceranae* (Martín-Hernández et al., 2012a).

2.2.3 Protozoos

Tripanosomátidos

Los tripanosomátidos (Euglenozoa, Kinetoplastida, Trypanosomatidae) son parásitos eucariotas intracelulares obligados que se caracterizan por presentar un solo flagelo. La especie *Crithidia mellifica* se describió en *A. mellifera* a finales de los años 60 (Langridge and McGhee, 1967) y más tarde se depositó como cepa de referencia en la ATCC (*American Type Culture Collection*) bajo el código 30254.

En los últimos años se ha descrito una elevada incidencia de tripanosomátidos en las colonias de *A. mellifera* (Runckel et al., 2011; Ravoet et al., 2013; Cepero et al., 2014b), fenómeno que se ha atribuido a *C. mellifica* (Runckel et al., 2011; Morimoto et al., 2013; Ravoet et al., 2013). Sin embargo, la cepa encontrada en el campo pertenece a un taxón diferente de la cepa de referencia (ATCC 30254) a juzgar por la distancia genética existente entre ambas (Cepero et al., 2014b). Recientemente este nuevo taxón fue rebautizado con el nombre de

Lotmaria passim para distinguirlo de *C. mellifica* (ATCC30254) de la cual se diferencia tanto a nivel genético como morfológico (Cepero et al., 2014b; Schwarz et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de la elevada prevalencia de los tripanosomátidos en las colonias de abejas actualmente se desconoce su acción en *A. mellifera* por lo que su patogenicidad todavía debe ser evaluada (Cepero et al., 2014b)

Neogregarinos

Apicystis bombi (Apicomplexa, Conoidasida, Lipotrophidae) es un protozoo parásito de los himenópteros del género *Bombus* (Lipa and Triggiani, 1996) que ataca el cuerpo graso y provoca una alta mortalidad de las reinas en la primavera (Schmid-Hempel, 2001). A pesar de que también se han identificado neogregarinos en *A. mellifera* (Plischuk et al., 2011; Morimoto et al., 2013; Cepero et al., 2014b), se desconoce si ambos himenópteros son infectados por la misma especie (Maharramov et al., 2013; Cepero et al., 2014b).

Aunque no existen datos publicados sobre su prevalencia en España, apenas ha sido identificado en colonias con signos de despoblamiento (Cepero et al., 2014b).

2.2.4 Ácaros

Varroa destructor

El ectoparásito *V. destructor* (Arthropoda, Arachnida, Varroidae) es una de las grandes amenazas para las poblaciones de *A. mellifera* en todo el mundo. El salto desde su hospedador original, *Apis cerana*, a *A. mellifera* favoreció su rápida dispersión y provocó grandes daños en la apicultura a partir de mediados del siglo XX (Oldroyd, 1999). La varroosis conduce al colapso de la colonia en un periodo de 2 a 3 años si no se trata adecuadamente (Rosenkranz et al., 2010). Este ácaro afecta a todos los estadios de desarrollo de una abeja, se alimenta de su hemolinfa, lo que las debilita (Rosenkranz et al., 2010), y produce deformaciones que, en parte, también están provocadas por el virus DWV para el que actúa como vector (Tentcheva et al., 2004; Dainat et al., 2012a; Nazzi et al., 2012; Francis et al., 2013; Lodesani et al., 2014). *V. destructor* puede transmitir otros virus como el ABPV (Tentcheva et al., 2004) y el IAPV (Di Prisco et al., 2011; Lodesani et al., 2014) lo que, junto con su elevada prevalencia a nivel mundial (Garrido Bailón, 2012), convierte a este ácaro en uno de los grandes enemigos de las abejas melíferas (Le Conte et al., 2010).

Acarapis woodi

A. woodi (Arthropoda, Arachnida, Tarsonemidae), agente etiológico de la acarapisosis, es un parásito obligado interno del sistema respiratorio de las abejas, que se aloja en la tráquea de estos insectos (OIE, 2008b). Su acción patógena se deriva de la obstrucción de los conductos respiratorios, el daño en la pared de la tráquea y el consumo de hemolinfa de las abejas, y está directamente asociado con la carga parasitaria (OIE, 2008b).

Durante el periodo 2006-2007 este ácaro apareció en el 15% de las colonias en nuestro país (Garrido Bailón, 2012), sin embargo actualmente su prevalencia se ha reducido considerablemente (aproximadamente a la mitad; Cepero et al., 2014a) por lo que no se considera un grave problema en nuestra apicultura.

2.2.5 Hongos

Ascosphaera apis

Este hongo (Acomycota, Eurotiomycetes, Ascospaeraceae) es responsable de la ascosferosis, una micosis que afecta a las larvas de abejas que se infectan tras ingerir las ascosporas producidas por el hongo. Una vez en el intestino, el hongo germina y el micelio crece rodeando a la larva en su totalidad, lo que le confiere el aspecto de una “momia” (nombre que se da de forma coloquial a las larvas infectadas). La muerte de las larvas conlleva una disminución de la población adulta de la colmena y un descenso de la productividad, aunque no llega a destruir totalmente las colonias (Aronstein and Murray, 2010).

En España apenas se han detectado un 5% de colonias infectadas por *A. apis* (Garrido-Bailón et al., 2013) y su asociación con la mortalidad de las colonias probablemente está relacionada con la presencia concurrente de otros patógenos en la colonia como *Nosema apis* (Aydin et al., 2006), *Nosema ceranae* o *Varroa destructor* (Hedtke et al., 2011a; Martín-Hernández et al., 2012a).

Microsporidios

Los microsporidios son un *Phylum* de parásitos unicelulares formadores de esporas que infectan todos los grandes grupos animales. En el caso de *A. mellifera*, invaden las células epiteliales del tracto digestivo de la abeja (ventrículo) y causan enfermedades conocidas como nosemosis, ya que son producidas por especies del género *Nosema* (Microsporidia, Dhaplophasea,

Nosematidae). *Nosema apis* es el agente etiológico de la nosemosis tipo A. Las abejas infectadas muestran un comportamiento anómalo caracterizado por temblores y presentan el abdomen dilatado y un aumento del número de deposiciones. De hecho, el signo clínico característico de esta enfermedad son abundantes manchas fecales tanto en la piquera como en el interior de la colmena (Bailey, 1955).

Desde hace algunos años se conoce que *Nosema ceranae*, otro microsporidio inicialmente descrito en la abeja asiática *Apis cerana* (Fries et al., 1996), produce una enfermedad en *A. mellifera* conocida como nosemosis tipo C (Higes et al., 2010c). Esta enfermedad tiene un largo periodo de incubación y mantiene a la colonia en un estado asintomático durante gran parte de la misma hasta que la colonia colapsa a causa de la muerte continuada de abejas infectadas y la incapacidad de la reina de compensar dicha pérdida (sección 4.4.2) (Higes et al., 2008a, 2009c).

En España la prevalencia de *N. apis* se mantiene alrededor del 15% en las colonias de abejas, mientras que *N. ceranae* lo hace en más del 40% (Garrido Bailón, 2012; Martín-Hernández et al., 2012a), lo que lo convierte en uno de los patógenos más prevalentes en nuestro país. En ocasiones también se observan coinfecciones con ambos patógenos, aunque la frecuencia de estas es mucho menor (Martín-Hernández et al., 2012a).



3 El despoblamiento: un fenómeno reciente y desconocido

3.1 DESCRIPCIÓN

Se conoce como despoblamiento al proceso por el cual las colmenas quedan prácticamente sin población como consecuencia de una mortalidad desmesurada de abejas adultas, que conducen a que la colonia colapse y muera.

Algunos de los síntomas asociados con este fenómeno son:

- Rápido descenso en el número de abejas adultas
- Debilitamiento general de la colonia
- Exceso de cría relativo a la población adulta
- Ausencia de abejas muertas dentro o en las inmediaciones de la colmena
- Reducción de las reservas de miel y polen
- Y, finalmente, colapso de la colonia

3.2 PRIMERAS EVIDENCIAS

En el otoño del año 2004 el sector apícola español experimentó una mortalidad masiva de abejas sin sintomatología aparente y con etiología desconocida. Múltiples apicultores denunciaron este fenómeno señalando que “las colmenas se quedan vacías, sin abejas ni miel” y que “tampoco había abejas muertas en los alrededores de la colonia” (Comunicación personal, Centro Agrario). Unos años antes en Francia también se había registrado una gran mortalidad de abejas sin causa conocida (Faucon et al., 2002), por lo que este fenómeno se denominó “síndrome de despoblamiento de las colmenas” (Higes et al., 2005, 2006).

Este proceso se extendió a otros países de la Unión Europea (Bacandritsos et al., 2010; Borneck et al., 2010; Potts et al., 2010) y a EE.UU donde, a pesar de la similitud con el escenario descrito en Europa, fue bautizado como “*Colony Collapse Disorder*” o CCD (VanEngelsdorp et al., 2008, 2009). La alarmante situación creada por la rápida pérdida de las colmenas en todo el mundo alertó sobre la necesidad de identificar los factores responsables del mismo con el fin de tomar medidas para su control.

3.3 *N. CERANAE* Y EL DESPOBLAMIENTO

En España, a partir del análisis por microscopía óptica de muestras recogidas de colonias despobladas, el grupo del Laboratorio de Patología Apícola del Centro Agrario de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Marchamalo) descubrió un aumento en la prevalencia de esporas de microsporidios. En ese momento, el único microsporidio descrito en *A. mellifera* era *N. apis*, agente causal de la nosemosis (actualmente nosemosis tipo A), por lo que *a priori* la identificación de estas esporas apuntaba hacia un aumento de las infecciones por este parásito. Sin embargo, ni el cuadro clínico de las colonias ni el momento en el que se observaban las esporas coincidían con el patrón epidemiológico de *N. apis* en climas templados (ver sección 4.4).

Esta inconsistencia junto con el reciente hallazgo de un nuevo microsporidio en la abeja asiática *A. cerana*, al que se bautizó como *N. ceranae* (Fries et al., 1996), planteaba la posibilidad de que esta nueva especie hubiera sido capaz de saltar la barrera interespecífica e infectar a *A. mellifera*, hecho que se confirmó tras el análisis de esas mismas muestras mediante técnicas de biología molecular (Higes et al., 2006).

Las evidencias de que *N. ceranae* había sido capaz de saltar la barrera interespecífica entre *A. cerana* y *A. mellifera* se obtuvieron casi simultáneamente en Europa (Higes et al., 2006, 2010c; Martín-Hernández et al., 2007) y Asia (Huang et al., 2007) y desde entonces la frecuencia de su diagnóstico en colonias de *A. mellifera* no ha hecho sino aumentar.

Al igual que ocurre con *N. apis* (Matheson, 1996), la presencia de *N. ceranae* se ha extendido a todos los continentes: Europa (Higes et al., 2006; Klee et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2007; Bacandritsos et al., 2010; Borneck et al., 2010; Gisder et al., 2010; Whitaker et al., 2011), América del Norte (Chen et al., 2008; Williams et al., 2008; Martin et al., 2013), América del Sur (Calderón et al., 2008; Martínez et al., 2012; Medici et al., 2012), Australia (Giersch et al., 2009), Asia (Huang et al., 2007; Yoshiyama and Kimura, 2011) y África (Higes et al., 2009a).

Los estudios epidemiológicos y de patogenia han demostrado que *N. ceranae* es capaz de producir lesiones irreversibles en el aparato digestivo que pueden matar abejas tanto en el laboratorio (Higes et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2007; Paxton et al., 2007; Huang and Solter, 2013; Natsopoulou et al., 2015), como en condiciones naturales (García-Palencia et al., 2010). También se demostró que *N. ceranae* presenta una clara asociación epidemiológica con el fenómeno de despoblamiento en nuestro país, ya que todas las colonias infectadas, tras un largo periodo de incubación y tratadas frente a otros patógenos, mostraron los síntomas asociados con el fenómeno de despoblamiento (ver secciones 3.1 y 4.4.2) y terminaron colapsando (Higes et al., 2008a, 2009c, 2010c; Botías, 2013). No obstante, en la actualidad se ha observado que algunas colonias parasitadas por *N. ceranae* se mantienen fuertes y sin signos de despoblamiento (comunicación personal, Centro Agrario), lo que podría sugerir el desarrollo de cierta tolerancia al patógeno.

Aunque diferentes estudios confirmaron la capacidad de este microsporidio de provocar el colapso de las colmenas (Higes et al., 2008a, 2009c, 2010b; Botías et al., 2012b; Botías, 2013; Goblirsch et al., 2013; Villa et al., 2013; Betti et al., 2014; Simeunovic et al., 2014; Wolf et al., 2014) su relación con el mismo es controvertida (Higes et al., 2013b). Efectivamente, como demuestra Martín-Hernández et al., (2012a), *N. ceranae* está más adaptado a climas mediterráneos en los que es capaz de provocar el despoblamiento de las colonias de abejas (Higes et al., 2006, 2008a, 2009c; Bacandritsos et al., 2010; Borneck et al., 2010; Hatjina et al., 2011; Soroker et al., 2011), mientras que en las áreas de climas más fríos dicha relación no es tan evidente (Gisder et al., 2010; Hedtke et al., 2011a; Stevanovic et al., 2011, 2013). Parte de esta

controversia se debe a que en muchos estudios sólo consideran agentes etiológicos aquellos cuya prevalencia es significativamente mayor en las colonias “enfermas” (aquellas que muestran la sintomatología) que en las asintomáticas. Sin embargo, debido al prolongado periodo de incubación de la nosemosis tipo C es posible detectar *N. ceranae* en colonias aparentemente asintomáticas, lo que podría explicar que en ocasiones este patógeno no haya sido considerado como agente etiológico (Cox-Foster et al., 2007; VanEngelsdorp et al., 2009; Johnson et al., 2010; Stevanovic et al., 2011). Por otro lado, este debate también surge de la discrepancia entre los resultados derivados de estudios de infecciones experimentales de *N. ceranae* en *A. mellifera*. Mientras que algunos señalan una elevada mortalidad en las abejas infectadas (Higes et al., 2007, Paxton et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2011), otros cuestionan la acción de este patógeno y apuntan que su efecto no es mayor que el de *N. apis* (Forsgren and Fries 2010). Probablemente estas diferencias surgen del empleo de una metodología no estandarizada, ya que factores como la dosis infectiva, la edad de las abejas, el mantenimiento de las esporas del parásito utilizadas en la infección, o la administración del polen durante los ensayos pueden hacer variar los resultados de unos experimentos respecto de otros (Higes et al., 2013b; Dussaubat et al., 2013b; Di Pasquale et al., 2013; Huang et al., 2015).

3.4 OTROS FACTORES PROPUESTOS Y SINERGIAS

Además de *N. ceranae* (Higes et al., 2008a, 2009c; Botías et al., 2013) han surgido hipótesis alternativas que señalan a otros factores como agentes etiológicos del despoblamiento. Entre ellos destacan el ácaro *V. destructor* (ver sección 2.2.4), los plaguicidas, principalmente los de la familia de los neonicotinoides (Decourtye et al., 2004a; El Hassani et al., 2005; Desneux et al., 2007; Blacquière et al., 2012; Cresswell and Thompson, 2012; Johnson et al., 2013), (sección 2.1), y algunos virus, como el de las alas deformadas (DWV) (Highfield et al., 2009; Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012b) y la parálisis aguda (ABPV) (Berthoud et al., 2010; Genersch et al., 2010) en Europa, o el virus Israelí de la parálisis aguda (IAPV) (Cox-Foster et al., 2007) en EE.UU., aunque el involucramiento de éste último nunca fue confirmado (Anderson and East, 2008; VanEngelsdorp et al., 2008, 2009).

Otras hipótesis propuestas para este fenómeno pasan por la interacción de diferentes agentes nosógenos para la colonia (Neumann and Carreck, 2010), como la asociación de *V. destructor* con ciertos virus como el DWV (Dainat et al., 2012a) (ver *V. destructor* en sección

2.2.4), o sinergias entre *N. ceranae* y los plaguicidas (Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011; Pettis et al., 2012) o los tripanosomátidos (Ravoet et al., 2013; Schwarz and Evans, 2013).



4 *Nosema* spp.

4.1 MICROSPORIDIOS

Los microsporidios son eucariotas unicelulares de vida parasitaria intracelular obligada, formadores de esporas, que están clasificados dentro del reino Fungi (Adl et al., 2005). Durante años estos organismos han suscitado un gran interés debido a su complejidad estructural, así como a su importancia como patógenos de un amplio rango de hospedadores entre los que se incluyen vertebrados, invertebrados e incluso protozoos (Parisot et al., 2014).

4.1.1 Características generales

Los microsporidios poseen una serie de características que los hacen únicos:

- Carecen de algunos orgánulos típicos de eucariotas como el aparato de Golgi, los peroxisomas o las mitocondrias (Méténier & Vivarès, 2001; Vavra & Larsson, 1999; Vávra & Larsson, 1976). Estas últimas parecen haber quedado reducidas a pequeños orgánulos denominados mitosomas (Williams et al., 2002; Vávra, 2005).
- Sus ribosomas recuerdan a los observados en procariotas (Curgy et al., 1980; Vossbrinck et al., 1987; Wittner and Weiss, 1999), con coeficientes de sedimentación de 70S, en lugar de 80S característico del resto de eucariotas, compuestos por una subunidad mayor de 50S y otra menor de 30S (Ishihara and Hayashi, 1968; Curgy et al., 1980; Vossbrinck and Woese, 1986).

- Presentan genomas muy reducidos y compactos (Keeling et al., 2005), lo que posiblemente obedece a que su estilo de vida parasitario les permitió prescindir de buen número de los genes implicados en la síntesis de metabolitos, en favor de aquellos encargados de codificar proteínas que facilitan la obtención de nutrientes a partir del hospedador (Katinka et al., 2001; Chen et al., 2013; Nakjang et al., 2013)

Aunque son parásitos intracelulares obligados tienen una forma de resistencia que es la espora (**Figura 3**). Ésta presenta una doble pared formada por una cubierta externa, la exospora, de naturaleza fundamentalmente proteica (Bigliardi et al., 1996) y por una cubierta interna, la endospora, cuyo componente principal es la quitina, que le confiere gran resistencia en el medio extracelular (Huger, 1960).

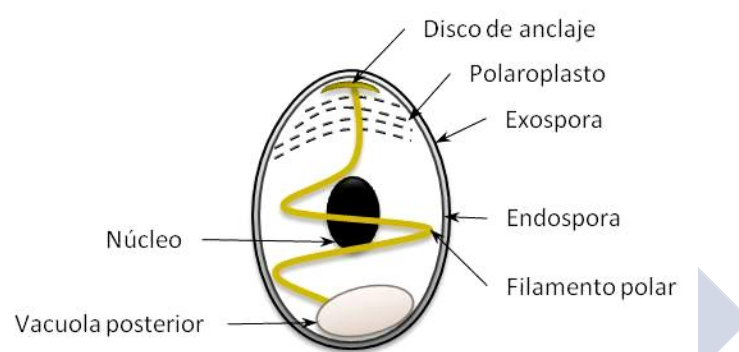


Figura 3. Esquema de la espora de un microsporidio mononucleado.

Las esporas varían en cuanto al tamaño y morfología en función del género y de la especie (Wittner and Weiss, 1999). Pueden medir desde 1 a 40 μm (Vavra y Larsson 1999) y generalmente son de forma ovalada, aunque también se han observado conformaciones más esféricas e incluso piriformes (Wittner and Weiss, 1999).

En su interior, y separado de la pared celular por una membrana plasmática, se encuentra el esporoplasma, que contiene el citoplasma y el contenido genético de la espora. Este puede estar organizado en uno o dos núcleos, según la especie, diferenciándose así organismos monocariontes (p.ej. géneros *Glugea* o *Enterocytozoon*) y diplocariontes (p.ej. géneros *Nosema* o *Encephalitozoon*).

Como elemento infectivo de los microsporidios, la espora alberga en su interior el aparato de infección, que está formado por el disco de anclaje, el filamento polar, el polaroplasto y la vacuola posterior (**Figura 3**). El filamento polar es el componente principal del aparato de infección de los microsporidios. Surge en el disco de anclaje, situado en la parte anterior de la espora, y el primer tercio del mismo es recto y está rodeado de un sistema de membranas (polaroplasto); los dos tercios restantes se disponen en espiral alrededor del núcleo de la célula hasta terminar en la vacuola posterior. Su estructura está compuesta principalmente por tres proteínas (PTP1, PTP2 y PTP3) que fueron caracterizadas inicialmente en *Encephalitozoon cuniculi* (Keohane et al., 1996; Delbac et al., 1998; Peuvel et al., 2002) y más adelante en otros microsporidios (Keohane and Weiss, 1998; Delbac et al., 2001; Polonais et al., 2005). El número de vueltas del filamento, su disposición y el ángulo de inclinación helicoidal son caracteres conservados y utilizados para la clasificación de estos organismos (Keeling and Fast, 2002).

4.1.2 Taxonomía de los microsporidios

Tradicionalmente, los microsporidios se describieron de acuerdo a sus características morfológicas (Weiser, 1977; Issi, 1986), ciclo de vida (Sprague, 1982; Sprague et al., 1992) o interacción con su hospedador (Sprague et al., 1992). Sin embargo, dado que estas características no reflejan adecuadamente la historia evolutiva de los organismos, su uso como herramienta taxonómica provocó que su clasificación fuese variando a lo largo del tiempo (**Figura 4**).

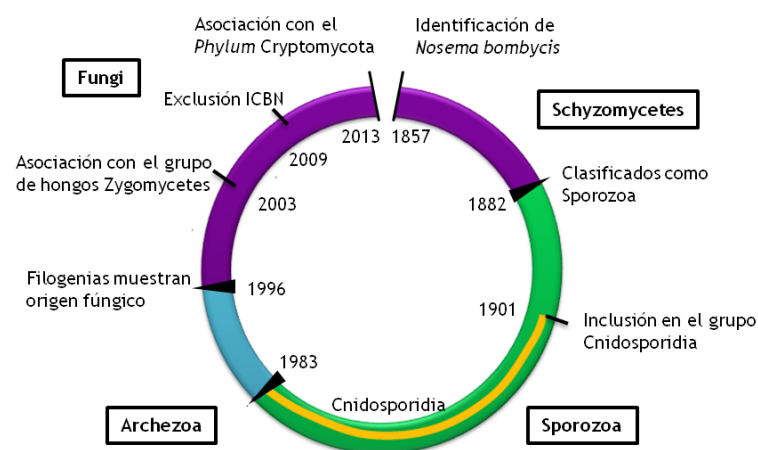


Figura 4. Clasificación de los microsporidios a lo largo del tiempo. Imagen modificada a partir de la Figura 2 en Keeling (2009).

Tras su identificación en 1857 los microsporidios fueron relacionados con hongos y levaduras y se clasificaron en el grupo Schyzomycetes, pero pocos años más tarde se reclasificaron como protozoos, dentro de la clase Sporozoa (más concretamente en la subclase Cnidosporidia) junto con otros organismos productores de esporas (revisado en Corradi and Keeling, 2009). Sin embargo, sus peculiaridades, principalmente la ausencia de mitocondrias, junto con su reducción genómica, ultraestructural y metabólica, justificaron su consideración como eucariotas primitivos. Esta clasificación, basada en la asunción de que en sus orígenes los eucariotas carecían de mitocondrias (Cavalier-Smith, 1983), hizo que los microsporidios se agruparan colectivamente junto con otros tres linajes de protistas amitochondriales como Archezoa (revisado en Keeling and Fast, 2002; Corradi and Keeling, 2009). Dicha localización taxonómica fue además apoyada por las primeras filogenias basadas en secuencias del ADN ribosómico (Vossbrinck et al., 1987) y otros loci, como la *isoleucil aminoacil-ARNt sintetasa* (Brown and Doolittle, 1995) y los *factores de elongación 1 alfa y 2* (Kamaishi et al., 1996a, 1996b).

Pero la hipótesis alternativa de que los microsporidios habrían sufrido un proceso de reducción estructural a partir de un ancestro más complejo fue ganando consistencia científica tras la identificación de genes codificantes para proteínas típicamente mitocondriales como HSP70 (Hirt et al., 1997) y el hallazgo del mitosoma (Williams et al., 2002; Vávra, 2005). Los estudios filogenéticos con genes como los de las *tubulinas α y β* los relacionaron con el reino Fungi (Edlind et al., 1996; Keeling and Doolittle, 1996), vinculación que se confirmó más tarde con el análisis de otros loci como el *Hsp70* (Germot et al., 1997; Peyretailade et al., 1998), los genes codificantes para la proteína de unión de la caja TATA (*TBP*) o la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (*RBP1*) (Fast, 1999; Hirt et al., 1999). Así, en el año 2005 los microsporidios fueron incluidos en el reino Fungi, dentro del clado Opisthokonta (Adl et al., 2005).

A pesar de que inicialmente se emparentó a los microsporidios con los hongos Zygomycetes (Keeling, 2003; Lee et al., 2008), hoy en día se cree que son un linaje primitivo del Reino Fungi (Capella-Gutiérrez et al., 2012; Cuomo et al., 2012; James et al., 2013), que comparte un antepasado común con el *Phylum* Cryptomycota (Cuomo et al., 2012; James et al., 2013) (**Figura 5**).

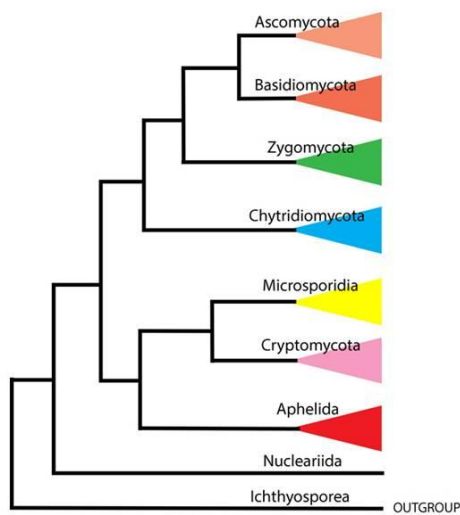


Figura 5. Taxonomía de los microsporidios y otros grupos de hongos. Figura modificada a partir de la figura 5 en Karpov et al., (2014).

Actualmente existen alrededor de 1500 especies de microsporidios agrupadas en 187 géneros. Dos de ellas, *N. apis* y *N. ceranae* (ver Microsporidios en sección 2.2.5), infectan *A. mellifera*, pero a pesar de pertenecer al mismo género causan distintos síntomas en las colonias de abejas. A continuación se detallan algunas de las diferencias y similitudes concernientes a ambas especies.

4.2 DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE *N. CERANAE* Y *N. APIS*

Mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión (*TEM*; *Transmission Electron Microscopy*) es posible distinguir a ambas especies en función de las características morfológicas de la espora y del número de vueltas de su filamento polar (**Figura 6**):

- Las esporas de *N. apis* son más grandes y miden 5-7 μm de largo por 3-4 μm de ancho (Chen et al., 2013), mientras que las de *N. ceranae* oscilan entre 3,6-5,5 μm de largo por 2,3-3,0 μm de ancho (Fries et al., 1996; Chen et al., 2009).
- El filamento polar se dispone entre 26 y 36 vueltas en *N. apis* (Fries, 1989), a diferencia de *N. ceranae*, donde presenta de 18 a 23 vueltas (Fries et al., 1996; Higes et al., 2007; Chen et al., 2009).

- A su vez, su observación mediante microscopía electrónica de barrido (*SEM*; *Scanning Electron Microscopy*) permite identificar diferencias en su cubierta externa, que en el caso de *N. ceranae*, está más ornamentada (Ptaszyńska et al., 2014a)

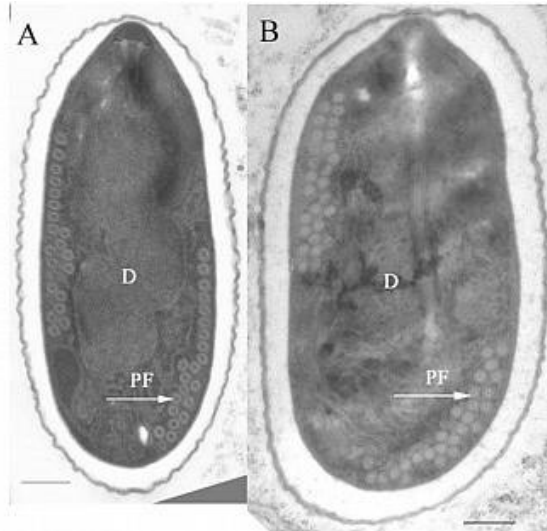


Figura 6. Esporas de *N. ceranae* y *N. apis*. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una espora de *N. ceranae* (Izquierda) y *N. apis* (derecha) PF: secciones transversales del filamento polar. D: núcleo, organizado como diplocarionte, típico del género *Nosema*. (Imagen extraída de Fries et al., 2006).

Estas diferencias en la morfología de la espora son tan sutiles que complican la identificación de la especie mediante microscopía óptica, el método que se venía utilizando tradicionalmente para la identificación rutinaria de microsporidios en el laboratorio.

4.3 INFECCIÓN Y DESARROLLO EN *A. MELLIFERA*

El ciclo biológico de ambos microsporidios en *A. mellifera* es muy similar. La infección de las abejas adultas por *Nosema* spp. comienza con la ingesta de esporas infectivas a través del alimento (Bailey 1981) o agua contaminada (L'Arrivee, 1963), o bien por las tareas de limpieza (Fries, 1989; Webster, 1993) o trofalaxia de la colonia (Webster, 1993; Higes et al., 2010c). Una vez en el intestino de la abeja, las esporas germinan (**Figura 7**) e infectan de forma específica las células epiteliales del ventrículo de la abeja (Bailey, 1981; Higes et al., 2007; Huang and Solter, 2013), de las que aprovechan su elevada actividad metabólica (Liu, 1984).

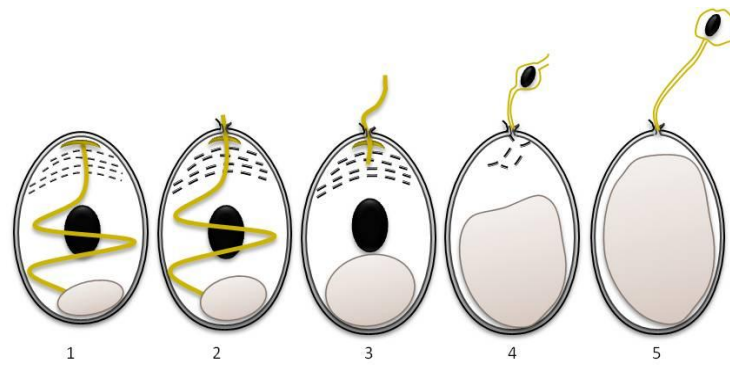


Figura 7. Germinación de la espora de un microsporidio. La germinación tiene lugar debido a un aumento en la presión osmótica en el interior de la espora (Kudo, 1918; Xu and Weiss, 2005), que conduce a la entrada de agua en su interior y termina con la extrusión del filamento polar: En la espora latente (1) el polaroplasto y la vacuola posterior se hinchan y como resultado la parte anterior de la espora se rompe (2), por donde será liberado el filamento polar (3) (Williams, 2009). Este forma un canal a través del cual el esporoplasma es forzado a salir (4). Tras su emergencia, el esporoplasma queda rodeado por una nueva membrana (5). Si la germinación tiene lugar en la proximidad de la célula hospedadora, el filamento polar se ancla a ella y actúa como puente a través del cual transfiere el esporoplasma a su interior (Xu and Weiss, 2005). Imagen modificada a partir de Keeling and Fast (2002).

En el interior de la célula hospedadora (fase intracelular) se pueden distinguir dos etapas: la merogonia (o etapa proliferativa), en la que se produce la división masiva del parásito, y la esporogonia, durante la que se generan nuevas esporas, a lo largo de las cuales se pueden distinguir los estadios celulares de meronte, esporonte, esporoblasto y espora madura (**Figura 8**).

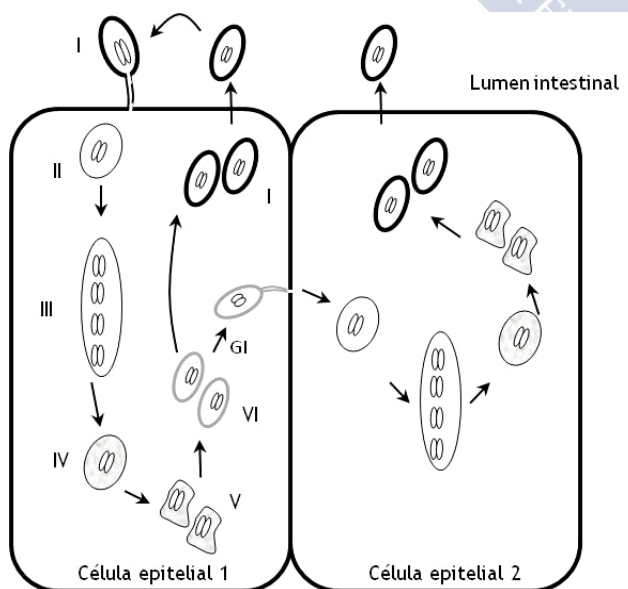


Figura 8. Esquema del ciclo biológico de *Nosema* spp. Las especies del género *Nosema* permanecen binucleadas durante todo su ciclo de vida y se desarrollan en contacto directo con el citoplasma de su hospedador. En el ciclo se suceden los estadios de meronte (II), plasmidios multinucleados (III), esporonte (IV), esporoblastos (V) y esporas, que en ocasiones se diferencian entre esporas inmaduras o primarias (VI) o esporas maduras (I). GI: Germinación intracelular de una espora primaria.

La merogonia comienza tras la inyección del material infectivo, o esporoplasma, en la célula hospedadora. El esporoplasma crece y madura para convertirse en la célula vegetativa o meronte, el cual está rodeado de una típica unidad de membrana, y presenta una gran región nuclear y orgánulos muy poco desarrollados (Wittner and Weiss, 1999; Bigliardi and Sacchi, 2001). En este estadio también se han observado depósitos de actina en el citoplasma cortical y en los filamentos asociados con la membrana plasmática (Bigliardi and Sacchi, 2001). Durante la merogonia, que implica un incremento masivo del número de parásitos, los merontes se multiplican mediante fisión binaria (Bigliardi, 2001). En *N. apis* y *N. ceranae* esta proliferación en ocasiones produce estructuras celulares multinucleadas (plasmodios), con hasta cuatro pares de núcleos (Gray et al., 1969; Higes et al., 2007) (**Figura 8 y Figura 9**), que se dividen mediante indentaciones entre los diplocarion dando lugar a una descendencia de merontes que pueden volver a entrar en merogonia y reiniciar el ciclo, el cual se puede repetir un número indeterminado de veces (Higes et al., 2010c).



Figura 9. Desarrollo intracelular de *N. ceranae*. Célula del ventrículo a los tres días de ser infectada por *N. ceranae*. Se observa un meronte con cuatro pares de núcleos (Flecha). (Figura extraída de Higes et al., 2007)

A continuación tiene lugar la esporogonia. En la transición a esta fase los merontes experimentan un aumento del retículo endoplasmático y ribosomas, pero la característica fundamental que los diferencia en esporontes (primer estadio celular de la esporogonia) es el engrosamiento del plasmalema por deposiciones de material electrodensito que formarán la futura exospora. En la esporogonia, los esporontes se dividen en dos esporoblastos (Bigliardi, 2001) cada uno de los cuales se diferencia en una espora (Bigliardi and Sacchi, 2001) (**Figura 8**).

En esta fase se forman el aparato de infección y la endospora, que se va constituyendo por la acumulación de quitina entre el plasmalema y la exospora (Bigliardi, 2001).

En las infecciones por *N. apis* y *N. ceranae* es posible observar dentro de una misma célula diferentes estadios parasitarios (**Figura 8** y **Figura 10**), incluyendo esporas tanto maduras como vacías o germinadas, lo que sugiere que ambas especies son capaces de germinar intracelularmente y transmitirse de forma horizontal a las células adyacentes (Fries et al., 1992; Higes et al., 2007).

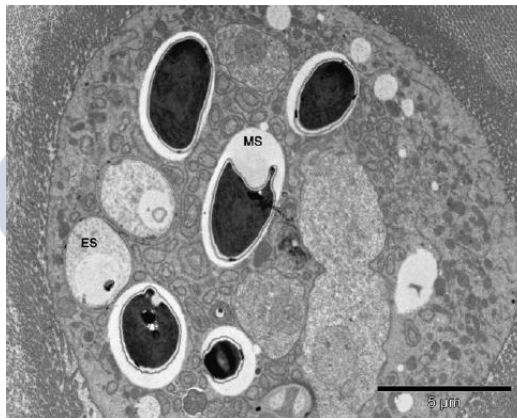


Figura 10. Célula del ventrículo parasitada por varios estadios de *N. ceranae*. MS: esporas maduras; ES: esporas vacías. (Imagen extraída de Higes et al., 2007).

Esta germinación intracelular es llevada a cabo por un tipo de esporas primarias (**Figura 8**), producto de una primera generación de esporas, que se caracterizan por presentar una endospora más fina y un filamento polar más corto que las esporas maduras, o “medioambientales” (Gisder et al., 2011), que son las que se liberan al exterior celular (Gisder et al., 2011; Solter et al., 2012; Huang and Solter, 2013).

4.4 ACCIÓN PATÓGENA

Tradicionalmente la nosemosis hacía referencia a la infección de *N. apis* en *A. mellifera*. La aparición de *N. ceranae* en este hospedador hizo que se propusiese el nombre de nosemosis tipo C (Higes et al., 2010c) para diferenciar esta infección de la nosemosis tradicional, o nosemosis

tipo A, de la cual se distingue por su cuadro sintomatológico, tanto a nivel individual como de colonia.

Uno de los rasgos epidemiológicos de estas enfermedades es su momento de aparición que se ha asociado con el diferente potencial biótico de *N. ceranae* y *N. apis*. La primera es capaz de desarrollarse a diferentes temperaturas (Fenoy et al., 2009; Martín-Hernández et al., 2009; Higes et al., 2010a), lo que le permite infectar colonias de abejas durante todo el año (Martín-Hernández et al., 2007; Giersch et al., 2009; Tapaszti et al., 2009; Botías et al., 2013), motivo por el cual no se observa un patrón estacional en esta enfermedad (Martín-Hernández et al., 2012b). Por el contrario, *N. apis* prolifera mejor a temperaturas suaves, y es más susceptible a temperaturas elevadas (Martín-Hernández et al., 2012b), lo que explica su estacionalidad ligada a los meses de primavera y otoño en áreas de climas templados (Bailey, 1955), y su baja prevalencia en áreas tropicales y subtropicales (Wilson and Nunamaker, 1983).

Estos microsporidios también difieren en su rango de hospedadores. Si bien *N. apis* es específico de *A. mellifera*, *N. ceranae* puede infectar varias especies de himenópteros polinizadores de los géneros *Apis* – *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. florea*, *A. kochevnikovi* o *A. dorsata* (Chaimanee et al., 2010, 2011; Suwannapong et al., 2010; Botías et al., 2012a) –, y *Bombus* (Plischuk et al., 2009; Li et al., 2012; Graystock et al., 2013; Gamboa et al., 2015).

Estas características diferenciales entre ambas especies probablemente sitúan a *N. ceranae* con cierta ventaja frente a su congénere lo que, sumado a la incorporación de productores asiáticos, la reciente globalización del mercado de la miel (REGA, 2015) y el crecimiento del sector apícola en los últimos años (FAOSTAT, 2015) podría explicar su rápida dispersión por todo el mundo (Klee et al., 2007).

Recientemente se ha sugerido que *N. ceranae* podría multiplicarse y madurar más rápido que *N. apis* en el intestino de la abeja (Williams et al., 2014), lo que explicaría su mayor patogenicidad sobre *A. mellifera*, en quien induce mayor mortalidad que *N. apis* (Paxton et al., 2007; Antúnez et al., 2009; Martín-Hernández et al., 2011), y el aumento gradual de su prevalencia en las colonias de abejas (OIE, 2008c; Martín-Hernández et al., 2012a), superando la de *N. apis* (Chen and Huang, 2010; Huang and Solter, 2013; Williams et al., 2014), aunque sin evidencias que sugieran el reemplazo de una especie por otra (Martín-Hernández et al., 2012a).

4.4.1 Lesiones a nivel individual

La acción patógena de *Nosema* spp. es consecuencia de su proliferación en las células epiteliales que forman el ventrículo (Bailey, 1981; Higes et al., 2007; Huang and Solter, 2013), o estómago, de las abejas, cuya función consiste en la asimilación de nutrientes y su traspaso a la hemolinfa.

Nosemosis tipo A

A nivel microscópico las células epiteliales se alargan, el núcleo se condensa y se desplaza a la zona apical (de Graaf et al., 1994), aumenta el número de ribosomas libres y de mitocondrias en su citoplasma (Williams, 2009) y se produce la lisis de las células del ventrículo (Liu, 1984), lo que coincide con algunas de las lesiones causadas por *N. ceranae* (Higes et al., 2007, 2009c; García-Palencia et al., 2010; Dussaubat et al., 2012).

Como la infección también afecta a las criptas de regeneración celular (Liu, 1984; de Graaf et al., 1994), en ocasiones aparecen zonas del ventrículo sin epitelio, lo que conlleva a la acumulación de excrementos en el intestino de las abejas. Estos síntomas se han asociado con el exceso de deposiciones y manchas fecales en la colonia (Bailey, 1981), signo característico de esta enfermedad.

A nivel fisiológico se observa una disminución del catabolismo proteico y, por tanto, del aporte de aminoácidos, lo que conduce a una reducción de las glándulas hipofaríngeas (Wang and Moeller 1970). También se produce la alteración de los niveles hormonales, lo que está relacionado con la maduración precoz de los individuos infectados (aumento de la hormona juvenil; Fisher and Sanborn, 1962) y la activación de la respuesta inmune en estos insectos (Antúnez et al., 2009). Además las reinas se tornan estériles (Hassanein, 1951; Liu, 1992), lo que junto con la mortalidad de las abejas adultas, constituye un riesgo para la sostenibilidad de la colonia.

Como consecuencia del daño epitelial y la subsiguiente reducción en la asimilación de nutrientes (proteínas, lípidos, glucosa) (Gilliam and Shimanuki, 1967), las abejas, debilitadas, son incapaces de volar y muestran un comportamiento anómalo, caracterizado por temblores y parálisis. Estas abejas presentan el ventrículo inflamado, con aspecto blanquecino y quebradizo (Shimanuki et al., 1992).

Nosemosis tipo C

Esta afección comparte buena parte de las lesiones citológicas con la nosemosis tipo A; desplazamiento del núcleo a la zona apical de la célula hospedadora (Higes et al., 2007, 2009; García-Palencia et al., 2010), aumento de mitocondrias en el citoplasma de las mismas (**Figura 11**; Higes et al., 2007) o lisis de las células del ventrículo (Dussaubat et al., 2012). Pero *N. ceranae* también parece inhibir la apoptosis (o muerte celular programada) de las células epiteliales, lo que favorecería su mantenimiento y multiplicación en los hospedadores (Higes et al., 2013a; Vidau et al., 2014).

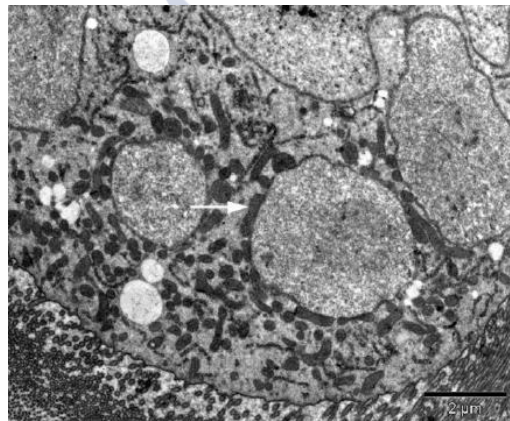


Figura 11. Ventrículo de una abeja parasitada por *N. ceranae*. La imagen de microscopía electrónica muestra un meronte de *N. ceranae* rodeado de mitocondrias de la célula hospedadora (flecha), lo que demuestra su dependencia energética del hospedador. (Imagen extraída de Higes et al., 2007).

A nivel fisiológico se han descrito cambios metabólicos, (Mayack and Naug, 2010; Alaux et al., 2011; Martín-Hernández et al., 2011), hormonales (Dussaubat et al., 2012) e inmunológicos (Antúnez et al., 2009). Por un lado, se produce una reducción del catabolismo de carbohidratos (Dussaubat et al., 2012; Vidau et al., 2014); este genera un estrés energético que se traduce en una mayor respuesta al alimento (Mayack and Naug, 2010) y una mayor producción de ATP por parte de las abejas (Vidau et al., 2014), probablemente promovido por las necesidades energéticas del parásito. Los cambios hormonales se reflejan en el aumento de la hormona juvenil (HJ) (Higes et al., 2010c; Ares et al., 2012; Dussaubat et al., 2012), la disminución de vitelogenina (Vg) y el aumento de etil oleato (Dussaubat et al., 2010, 2013a; Higes et al., 2010c), los cuales están asociados con la maduración de las abejas. La respuesta inmune está deprimida;

se reduce la producción de péptidos antibacterianos (abaecina, himenoptaecina) y disminuye la actividad de la glucosa deshidrogenasa (Antúnez et al., 2009). Sin embargo, aumenta la producción de moléculas antibacterianas implicadas en la respuesta inmune celular, como los ROS (*Reactive Oxygen Species*), generados durante los procesos de óxido-reducción (Vidau et al., 2011, 2014; Dussaubat et al., 2012), lo que acaba produciendo un estrés oxidativo en las células del ventrículo. Por otro lado, en las reinas aumenta la hormona vitelogenina (a diferencia de las abejas obreras), la capacidad antioxidante y las feromonas mandibulares (Alaux et al., 2011), lo que se traduce en un aumento en la puesta de huevos.

En conjunto, las lesiones celulares del ventrículo en ambas enfermedades, junto con el estrés energético y oxidativo impuesto por estos patógenos reduce la esperanza de vida de las abejas infectadas las cuales mueren de forma prematura.

4.4.2 Consecuencias en la colonia

El efecto principal de las nosemosis en la colonia se fundamenta en la alteración de la organización social de las abejas obreras como consecuencia del incremento de la mortalidad de abejas pecoreadoras a causa de las lesiones y alteraciones metabólicas ocasionadas por la parasitación. Entre las abejas obreras existe un reparto de tareas acorde a su edad (polietismo temporal; Seeley, 1982; Johnson, 2007), según el cual las tareas del interior de la colmena como el cuidado y mantenimiento de la cría, la limpieza o el almacenamiento de recursos, son realizadas por abejas más jóvenes, mientras que las funciones del exterior, como el pecoreo, están desempeñadas por las abejas adultas. La correcta distribución de las funciones en la colonia está regulada por el contacto entre unas abejas y otras (Huang and Robinson, 1996) y por diferentes hormonas (Robinson, 1987; Pinto et al., 2000; Leoncini et al., 2004; Corona et al., 2007; Amdam and Page, 2010). Cuando existe una alta mortalidad de abejas pecoreadoras (como en las nosemosis) un mecanismo compensatorio estimula la maduración del comportamiento de las abejas más jóvenes (Khoury et al., 2011; Betti et al., 2014; Perry et al., 2015) que comienzan a pecorear de forma más temprana (Tofilski, 2009). Esto genera un desequilibrio en el polietismo temporal de la colonia (White, 1919; Paxton et al., 2007; Higes et al., 2008a; Dussaubat et al., 2010; Vidau et al., 2011) que se refleja en alteraciones de los niveles hormonales que regulan este proceso (sección 4.4.1) y redundando en la afectación de la defensa colectiva frente a los patógenos (inmunidad social; Cremer et al., 2007, Evans and Spivak, 2010), y en la desatención de la población de cría, lo que facilita la aparición de enfermedades (Hedtke et al., 2011a).

En la nosemosis tipo C la maduración precoz de las abejas implica su transición temprana a las tareas de pecoreo (compensación) de forma continuada en el tiempo, suponiendo un estrés crónico para la colonia. Esto da lugar a colonias con abejas pecoreadoras enfermas y otras demasiado jóvenes pero inexpertas, que son menos eficientes en el vuelo (Anderson and Giacon, 1992; Naug, 2014) y por tanto, en la recolección de recursos (Naug, 2014). Esto se traduce en una menor producción de miel (Fries et al., 1984; Mayack and Naug, 2009; Martín-Hernández et al., 2011; Botías et al., 2013), y en general, en una reducción del aporte energético a la colonia que, asimismo, promueve la transición de más abejas jóvenes a pecoreadoras.

Para contrarrestar la merma de la población de abejas la reina aumenta la ovoposición lo que conduce a un periodo conocido como “falsa recuperación” en el cual la colonia crece y es aparentemente asintomática, lo que dificulta la detección temprana de la enfermedad (Higes et al., 2008a).

La persistencia de *N. ceranae* durante todo el año hace que a largo plazo la colonia sea incapaz de mantener su población, lo que desemboca en su colapso funcional y posterior despoblamiento (Higes et al., 2008a; Dussaubat et al., 2010; Khoury et al., 2011, 2013; Ares et al., 2012; Betti et al., 2014; Perry et al., 2015). Al final de este proceso en las colmenas colapsadas es común encontrar un remanente de cría y reservas de alimento (Higes et al., 2008a) que se ajustan al modelo propuesto por Khoury et al., (2013) y coinciden con los signos que caracterizan el denominado síndrome de despoblamiento (sección 3.1).

Por el contrario, en la nosemosis tipo A, la compensación por parte de la colonia es más exitosa debido al patrón estacional de este patógeno (secciones 4.4), que aparece en los meses de primavera y otoño, después de los cuales la colonia tiene oportunidad de recuperarse de la infección. Así, esta nosemosis en raras ocasiones produce la muerte y la desaparición de la colmena (White, 1919; Bailey, 1981; Gisder et al., 2010; Moritz et al., 2010), por lo cual no es considerada una enfermedad grave (Topolska and Hartwig, 2005).

4.5 GENÉTICA: CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA Y DIVERSIDAD GENÉTICA.

N. apis y *N. ceranae* presentan genomas muy reducidos. En el primero mide 8,5Mb (Chen et al., 2013) y es de mayor tamaño que el de *N. ceranae*, en el que se estimó en 7,68 Mb (Cornman et al., 2009), aunque recientemente se ha propuesto un tamaño inferior (5,70Mb; Pelin et al., 2015). Estas diferencias podrían ser parcialmente atribuidas a la metodología empleada para la

secuenciación en cada uno de los trabajos. Por ejemplo, el uso de distintas plataformas de secuenciación: 454 *pyrosequencing* vs. *Illumina* (Cornman et al., 2009; Pelin et al., 2015, respectivamente), que generan lecturas de distinto tamaño, podría repercutir en el ensamblaje de secuencias repetitivas, que es mejor resuelto en el caso de lecturas de mayor tamaño (Metzker, 2010). En cualquier caso, los genomas de ambos microsporidios comparten una estructura y contenido muy similares (**Tabla 1**), como un alto contenido de adeninas y timinas, que habitualmente aparecen formando dímeros repetidos en tándem (Cornman et al., 2009; Chen et al., 2013) y la presencia de pocos intrones, que son más abundantes en *N. apis* (612 genes interrumpidos por intrones, Chen et al., 2013; seis intrones en *N. ceranae*, Cornman et al., 2009). Aunque estas propiedades compartidas son congruentes con la hipótesis de que ambos patógenos comparten la misma historia evolutiva, la gran divergencia entre sus secuencias genómicas sugiere que su ancestro común más reciente existió hace mucho tiempo, aunque su antigüedad aún no ha sido estimada (Chen et al., 2013).

Tabla 1. Principales características del genoma de *N. apis* y *N. ceranae* (Chen et al., 2013)

	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>
Tamaño (Mb)	8,5	7,86*
GC (%) en todo el genoma	18,78	26
GC (%) en la región codificante	25	27
GC (%) en la tercera posición	13	18
Genes ARNt	62	65
Genes codificantes (CDSs)	2.771	2.614**
Densidad genética (genes/kb)	0,326	0,33
Porcentaje codificante (%)	26,8	24,2

* 5,70Mb (Pelin et al., 2015)

** 3.209 ORFs (*Open reading frames*; Pelin et al., 2015)

N. apis y *N. ceranae* expresan alrededor de 2.600 genes cada una, lo que resulta en una densidad génica algo inferior a la descrita en otros microsporidios (Slamovits et al., 2004). Ambas especies comparten 1.356 genes ortólogos, entre los que destacan aquellos involucrados en el metabolismo de carbohidratos, como generador principal de fuente de energía, o los genes para

la captación de ATP de su hospedador (Chen et al., 2013). Sin embargo, aunque también existen diferencias en la presencia o expresión de genes como los relacionados con la respuesta al estrés o el transporte de proteínas, entre otros (Chen et al., 2013), todavía no se conoce exactamente qué loci están implicados en las distintas propiedades patogénicas de ambos parásitos.

Los primeros estudios de diversidad en *Nosema* spp. se basaban en los diversos genes del ADN ribosómico (*ADNr*) (Huang et al., 2008; Chen et al., 2009; Sagastume et al., 2011), que normalmente se encuentran presentes en múltiples copias organizadas como unidades ribosómicas (Eickbush and Eickbush, 2007). En *N. ceranae* estas copias se encuentran dispersas por el genoma (Cornman et al., 2009) mientras que en *N. apis* están repetidas en tándem (Gatehouse and Malone, 1998; Chen et al., 2013). Las subunidades ribosómicas en estas especies incluyen una subunidad menor (*SSU*; *small subunit*), un segmento transcrito interno (*ITS*; *internal transcribed spacer*), una subunidad mayor (*LSU*; *large subunit*) y una subunidad 5S cuya posición varía según la especie (**Figura 12**). En *N. ceranae* ésta precede a la región *SSU*, de la que está separada por el espaciador intergénico (*IGS*; *intergenic spacer*), y que se transcribe en sentido contrario al resto de las subunidades (Huang et al., 2008; **Figura 12**). Por el contrario, en *N. apis* la subunidad 5S se localiza a continuación del extremo 3' de la *LSU*, separado de ésta por un *ITS* (Chen et al., 2013; **Figura 12**). Además, en esta especie se ha descrito una región análoga a la subunidad de 5,8S de otros eucariotas fusionada al extremo 5' de la región *LSU* (Gatehouse and Malone, 1998; De Rijk et al., 1998), al igual que en otros microsporidios como *Vairimorpha necatrix* (Vossbrinck and Woese, 1986) o *Nosema bombycis* (Huang et al., 2004).

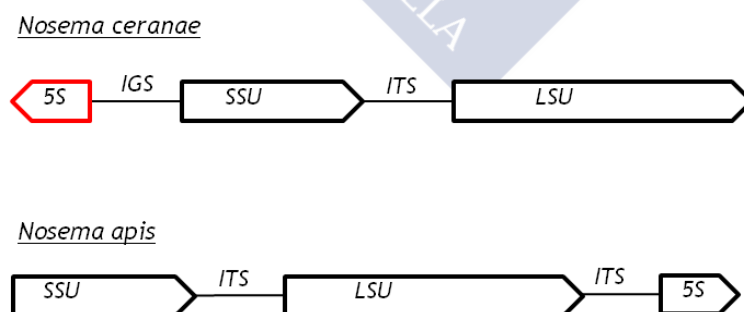


Figura 12. Estructura de las subunidades ribosómicas en *N. ceranae* y *N. apis* (5' - 3'). En *N. ceranae* la subunidad 5S se transcribe en sentido inverso al resto de las subunidades (rojo). La dirección de la flecha indica el sentido de la transcripción. Figura basada en las descripciones de Huang et al., (2008) y Chen et al., (2013).

Pero la naturaleza multicopia del *ADNr* convierte a las unidades ribosómicas en marcadores poco adecuados para describir la variabilidad intraespecífica de los microsporidios (Canning et al., 1999; Tsai et al., 2003; Fries, 2010; Sagastume et al., 2011). Por ello, y teniendo en cuenta que cada locus está sometido a diferentes fuerzas evolutivas y/o presenta diferentes tasas de mutación, lo más conveniente es analizar varios marcadores de copia única.

El análisis genético de estos marcadores generalmente se realizaba a partir de las secuencias obtenidas directamente de los productos de PCR (Gatehouse and Malone, 1998; Huang et al., 2004; Chen et al., 2009; Chen and Huang, 2010; Medici et al., 2012; Michalczyk et al., 2013), asumiendo homogeneidad entre las diferentes unidades presentes en los genomas (Nei and Rooney, 2005). Sin embargo esta técnica resulta inapropiada por dos motivos: en primer lugar, por la diversidad intragenómica de las unidades del *ADNr*. La clonación de los productos de PCR demostró que las unidades ribosómicas no son idénticas e incorporan tanto mutaciones puntuales como inserciones y deleciones que las diferencian entre sí (Huang et al., 2007; Sagastume et al., 2011). En segundo lugar, por la naturaleza heterogénea de la muestra de ADN de partida, la cual contiene material genético de las diferentes esporas de *Nosema* de una o de varias abejas (las muestras de cada colonia consisten en extractos de entre 15-20 abejas adultas). La secuenciación directa a partir de muestras mixtas, como las referidas anteriormente, suele mostrar electroferogramas con picos superpuestos en posiciones nucleotídicas concretas (que reflejan mutaciones presentes a una frecuencia intermedia-alta en la población), pero no es un método adecuado para detectar variantes a baja frecuencia, como los singletons (cambios nucleotídicos que aparecen una sola vez en la muestra). Esto puede causar una subestima de la tasa de polimorfismo, lo que dificulta la caracterización genética de las poblaciones (Sagastume et al., 2011).

Mediante la clonación de los productos de PCR, Sagastume et al., (2011) aportaron las primeras estimas fiables de diversidad genética en las regiones *SSU* e *IGS* del *ADNr* de *N. ceranae*, y confirmaron la presencia de copias heterogéneas de estos marcadores coexistiendo en un mismo individuo (lo que ya se había anticipado al secuenciar su genoma; Cornman et al., 2009). Este hallazgo coincide con otras observaciones en *N. apis* (Gatehouse and Malone, 1998), *N. bombi*, (O'Mahony et al., 2007) y en *N. bombycis* (Liu et al., 2013), haciendo de la variabilidad intragenómica del *ADNr* una característica común al género *Nosema* (Sagastume et al., 2011).

Además de revelar el grado de diversidad genética del *ADNr* de *N. ceranae*, se detectaron indicios de recombinación genética, tanto entre secuencias procedentes de un mismo aislado

como entre aquellas de aislados distintos (Sagastume et al., 2011). Pero nuevamente la presencia de múltiples copias de este gen en un mismo genoma impidió discernir si la evidencia de recombinación observada es producto de artefactos generados durante la PCR (Lahr and Katz, 2009) o representa intercambio real de información genética entre moléculas de ADN.





**OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**



El estudio de la variación genética permite reconstruir la historia evolutiva de los organismos, conocer cómo se estructuran sus poblaciones e identificar la base molecular de determinados fenotipos. En el caso de *N. ceranae*, estos conocimientos son esenciales para explicar aspectos fundamentales de su biología, como su evolución demográfica reciente e incluso la gran virulencia que demuestra en *A. mellifera*. Sin embargo la escasez de datos genéticos adecuados de esta especie limita de forma muy significativa nuestra capacidad de encontrar respuestas a estas preguntas.

Ante las deficiencias técnicas que presentan los primeros estudios centrados en la variabilidad intraespecífica de *N. ceranae* y *N. apis*, y la ausencia de datos sobre la estructura poblacional de ambas especies, en la presente tesis doctoral planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Describir la estructura genética de las poblaciones de *N. ceranae* en diferentes regiones geográficas y en distintos hospedadores.

Este objetivo se planteó para conocer la variabilidad genética en *N. ceranae*, del que, hasta entonces, sólo existían datos en el *ADNr* (Huang et al., 2008; Chen et al., 2009; Sagastume et al., 2011).

- Hipótesis: *N. ceranae* ha colonizado recientemente las poblaciones de *A. mellifera* en todo el mundo, a partir de la abeja asiática *A. cerana* (Fries et al., 1996; Klee et al., 2007; Botías et al., 2012a)
- Estrategia experimental: Se estimará el polimorfismo genético en varios genes de copia única en aislados de *N. ceranae* obtenidos en aislados de *A. mellifera* representativos de su área de distribución mundial, que permitan proporcionar una mejor estima de la variabilidad genética de este patógeno. Adicionalmente, se evaluará el polimorfismo genético de *N. ceranae* en aislados de *A. cerana* y *A. florea*, especies de abejas confinadas al continente asiático, para estimar la variabilidad genética y compararla con la observada en *A. mellifera*.

Para el genotipado, se aplicarán técnicas de PCR y clonación para poder detectar la mayor parte de las mutaciones de estos loci y no solo aquellas presentes a frecuencias intermedias.

Dado que la frecuencia de las mutaciones en la población proporciona información acerca de los eventos estocásticos (mutación y deriva) y deterministas (selección

purificadora y selección natural) que actúan sobre el genoma, en el análisis genético se diferenciarán entre aquellas mutaciones que ocurren en los sitios sinónimos de los no sinónimos. Los primeros son aquéllos en los que la mutación no altera la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, lo que hace que se comporten de forma neutra (o “invisibles”) de cara a la selección. Las mutaciones que se producen en sitios no sinónimos sí provocan cambios de aminoácidos, y por ello es más probable que tengan consecuencias funcionales y sean objeto de selección. Esta aproximación genético-poblacional es inédita en el estudio de este parásito.

Objetivo 2. Analizar la relación entre la patogenicidad y la constitución genética de dos aislados de *N. ceranae* de diferente origen geográfico en *A. mellifera iberiensis*.

Diferentes estudios mostraron que *N. ceranae* presenta diferentes niveles de patogenicidad sobre las colonias de *A. mellifera* en distintas zonas geográficas de diferentes latitudes (Higes et al., 2008a, 2009c; Gisder et al., 2010; Hatjina et al., 2011; Hedtke et al., 2011b; Botías et al., 2013; Stevanovic et al., 2013), que podrían corresponder a cepas del patógeno con diversos grados de virulencia (Williams et al., 2008; Whitaker et al., 2011; Yoshiyama and Kimura, 2011; Medici et al., 2012). Sin embargo esta hipótesis se hizo sin ningún fundamento científico ya que, cuando se planteó, apenas existían datos sobre el polimorfismo genético de esta especie.

- Hipótesis: La diferente patogenicidad de *N. ceranae* observada en distintas áreas climáticas refleja una estructuración de la población del parásito
- Estrategia experimental: Se seleccionarán dos aislados de campo de *N. ceranae* de áreas geográficas de diferente climatología en las que este patógeno presenta diferente patogenicidad en las colonias de *A. mellifera*; se comparará la respuesta de abejas obreras *Apis mellifera iberiensis* a la infección experimental con estos aislados y se evaluará el polimorfismo genético de ambas cepas utilizando un marcador de copia única potencial relacionado con la virulencia del parásito.

Objetivo 3. Indagar la existencia de procesos de recombinación genética en *N. ceranae*

Los primeros estudios de diversidad genética en *N. ceranae* encontraron evidencias de recombinación en el *ADNr*, que sugerían que este microsporidio pudiera llevar a cabo un modo de reproducción sexual en algún momento de su ciclo vital (Sagastume et al., 2011); sin embargo dado que el *ADNr* puede experimentar procesos de recombinación homóloga entre sus diversas

copias (Eickbush and Eickbush, 2007), y teniendo en cuenta la heterogeneidad de las muestras de ADN de partida nos propusimos estudiar más a fondo este proceso en *N. ceranae*.

- Hipótesis: Existe recombinación genética en *N. ceranae*
- Estrategia experimental: Se investigará la existencia de recombinación genética en las secuencias obtenidas por clonación en seis genes de copia única, en sustitución del *ADNr*. Se comprobará si la recombinación que se podría inferir a partir de muestras heterogéneas de ADN es el reflejo de un proceso natural o, por el contrario, de procesos de recombinación *in vitro*, mediante el análisis de un gen de copia única por la técnica de amplificación de genomas individuales (SGA; *Single Genome Amplification*; Palmer et al., 2005; Salazar-Gonzalez et al., 2007, 2008; Liu et al., 2010)

Objetivo 4. Investigar las propiedades genético-poblacionales de *N. apis* y compararlas con las de su congénere *N. ceranae*.

Apenas existen datos sobre la variabilidad genética o la estructura poblacional de *N. apis*, ya que los estudios genéticos hasta el momento se basan en el *ADNr* bien como herramienta de diagnóstico (Webster et al., 2004; Martín-Hernández et al., 2007; Botías et al., 2013; Ptaszyńska et al., 2014b) o para describir sus subunidades ribosómicas (De Rijk et al., 1998; Gatehouse and Malone, 1998). Por ello nos propusimos conocer la diversidad genética de las poblaciones de este patógeno en *A. mellifera*.

- Hipótesis: *N. apis* tiene un origen más antiguo en las poblaciones de *A. mellifera*, por lo que los patrones de diversidad genética de este parásito son distintos a los de *N. ceranae*.
- Estrategia experimental: Se estudiará el polimorfismo genético en tres genes nucleares de copia única a partir de aislados de *N. apis* distribuidos por todo el mundo, que permitan conocer su estructura poblacional y compararla con la de *N. ceranae*. Se aplicarán las mismas herramientas moleculares y el mismo análisis que en la estrategia experimental descrita en el objetivo 1; es decir, el genotipado se hará mediante PCR y clonación, y en el análisis genético se diferenciarán entre posiciones sinónimas y no sinónimas.



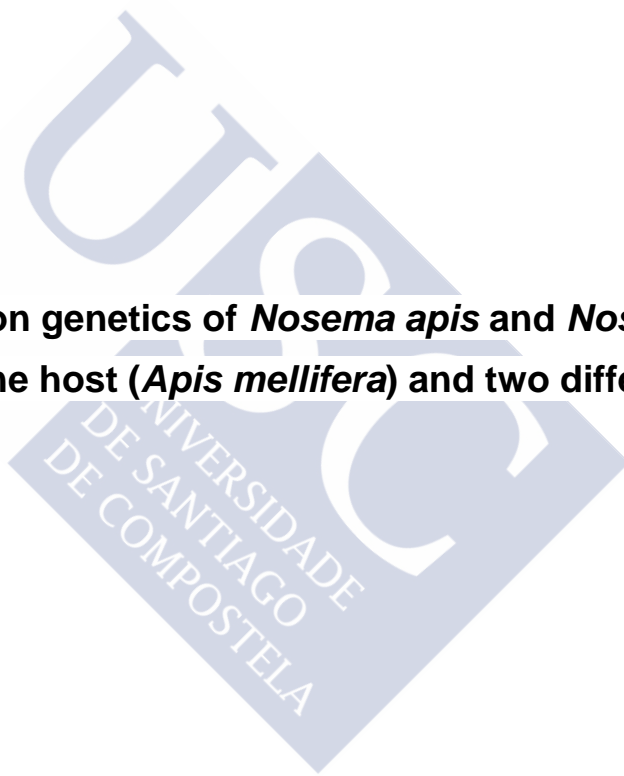


PUBLICACIONES

- I. High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies
- II. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation
- III. Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybee (*Apis mellifera iberiensis*)
- IV. Evidence for weak genetic recombination at the *PTP2* locus of *Nosema ceranae*
- V. Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: one host (*Apis mellifera*) and two different histories

(Nota: Por razones de derechos de autor, para consultar los artículos I a IV se deben seguir los vínculos a las URL insertadas en cada uno de los títulos.)

**V. Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*:
one host (*Apis mellifera*) and two different histories**





Population Genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: One Host (*Apis mellifera*) and Two Different Histories

Xulio Maside^{1,2,3}, Tamara Gómez-Moracho^{1,2,4}, Laura Jara⁵, Raquel Martín-Hernández^{4,6}, Pilar De la Rúa⁵, Mariano Higes⁴, Carolina Bartolomé^{1,2*}

¹ Medicina Xenómica, CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Galicia, Spain

² Xenómica Comparada de Parásitos Humanos, IDIS, Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

³ Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Galicia, Spain

⁴ Laboratorio de Patología Apícola. Centro Apícola, Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Marchamalo, Guadalajara, Spain

⁵ Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia, Spain

⁶ Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT-FEDER), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Albacete, Spain

* Corresponding author E-mail: carolina.bartolome@usc.es (CB)

Abstract

Two microsporidians are known to infect honey bees: *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Whereas population genetics data for the latter have been released in the last few years, this information is still missing for *N. apis*. Here we analyse the patterns of nucleotide polymorphism at three single-copy loci (*PTP2*, *PTP3* and *RPB1*) in a collection of *Apis mellifera* isolates from all over the world, naturally infected either with *N. apis* ($N = 22$) or *N. ceranae* ($N = 23$), to provide new insights into the genetic diversity, demography and evolution of *N. apis*, as well as to compare them with evidence from *N. ceranae*. Neutral variation in *N. apis* and *N. ceranae* is of the order of 1%. This amount of diversity suggests that there is no substantial differentiation between the genetic content of the two nuclei present in these parasites, and evidence for genetic recombination provides a putative mechanism for the

flow of genetic information between chromosomes. The analysis of the frequency spectrum of neutral variants reveals a significant surplus of low frequency variants, particularly in *N. ceranae*, and suggests that the populations of the two pathogens are not in mutation-drift equilibrium and that they have experienced a population expansion. Most of the variation in both species occurs within honey bee colonies (between 62% - 90% of the total genetic variance), although in *N. apis* there is evidence for differentiation between parasites retrieved from distinct *A. mellifera* lineages (20% - 34% of the total variance), specifically between those collected from lineages A and C or M. This scenario is consistent with a long-term host-parasite relationship and contrasts with the lack of differentiation observed among host-lineages in *N. ceranae* (< 4% of the variance), which suggests that the spread of this pathogen throughout the *A. mellifera* worldwide population is a recent event.

Introduction

The genus *Nosema* (Fungi, Microsporidia, Diahaplophasea, Dissociodiahaplophasida, Nosematidae; Nägeli, 1857) contains over eighty species [1,2] typically found in arthropods.

Two species, *N. apis* and *N. ceranae*, parasitize the Western honey bee, *Apis mellifera*. *N. apis* Zander, 1909 is a globally distributed pathogen that was identified in this host more than a hundred years ago [3], whereas *N. ceranae* was described at the end of the twentieth century [4]. This parasite, although initially discovered in the Asian honey bee *Apis cerana* [4], was later proved to infect *A. mellifera* [5,6], and since then it has been found worldwide in this new host [7,8,9,10,11], as well as in several other *Apis* [12,13] and *Bombus* species [14,15]. Both pathogens are transmitted through the ingestion of spores during feeding, grooming and trophallaxis [16,17]. Once in the gut, they invade the ventricular cells causing disease, but the clinical and epidemiological characteristics of the parasitization by either species are different; the infection by *N. apis* (type A nosemosis) does not usually cause the death of the colonies and is characterized by dysentery, general weakening of the adults, locomotion impairment and crawling [18]. These symptoms are not present in *N. ceranae* infections (type C nosemosis) [19],

which produce alterations in the temporal polyethism, foraging activity and life span of infected bees [20,21,22]. Although the same could also be true for *N. apis* [23], the higher prevalence of *N. ceranae* throughout the year in temperate climates [24,25] – in contrast with that of *N. apis*, which usually displays seasonal peaks [26] –, induces a chronic stress on the colony that may eventually lead it to the collapse [20,27,28]. This effect, whose potential relationship with the large scale depopulation phenomenon is still matter of debate ([24,28] or [29,30], for a different point of view), is much more dramatic in Mediterranean countries, especially in Spain, where climatic conditions and/or beekeeping practices seem to increase the impact of *N. ceranae* on honey bee colonies [reviewed in 31].

Genetic data revealed that *N. apis* and *N. ceranae* are highly divergent at the nucleotide level (average nonsynonymous divergence of 0.10%; [32]) and that there has been considerable gene shuffling since the split from their common ancestor [33], evidencing that they are not close relatives within the genus *Nosema* [34,35].

The genetic characterization of *N. ceranae* populations in *A. mellifera* has been achieved in the last few years by analyzing different components of the ribosomal DNA (*rDNA*) [36,37], single-copy genes [32,38,39,40,41] and whole genomes [42]. The most relevant conclusions of these studies are that i) *N. ceranae* isolates obtained from individual honey bees exhibit multiple alleles at single copy loci [38,39], ii) most of the variation resides within honey bee colonies [39,42], iii) there is no differentiation among geographically distant isolates [36,38,39,42], iv) this pathogen has experienced a recent demographic expansion in *A. mellifera* [38,39,42], and v) there is evidence for low, but significant, levels of recombination [36,38,40,41,42].

In contrast, there is little information about the population genetics of *N. apis*. Although a few sequence data have been released in public databases, most of them remain unpublished (e.g. PopSets 723438493, 698364701, 225055863 from GenBank) and/ or involve the analysis of *rDNA* [43,44,45] that harbors heterogeneous multiple copies in the *N. apis* genome [33]. These are organized as tandemly repeated units, each of them consisting of a small (*SSU*)

and large (*LSU*) subunits separated by an internal transcribed spacer (*ITS*), and an intergenic spacer (*IGS*) [45,46] (see [33] for a slightly different organization). The presence of these repetitive arrays can cause their sequences to evolve differently than those of other genes [47], making them unsuitable to evaluate the patterns of diversity and evolution of a species [44,48].

Here we report a population genetic analysis conducted to understand the population genetics of *N. apis* that would help address important questions such as: What are the levels of genetic variation of this parasite? Is there any genetic evidence for a long-term association between *N. apis* and *A. mellifera*? Is the *N. apis* population panmictic or is there any sign of geographical structure? The sequences of three single copy genes were studied in a collection of *N. apis* and *N. ceranae* isolates obtained from *A. mellifera* colonies from all over the world. These loci had been previously studied in *N. ceranae* [32,39,40] and their patterns of polymorphism were used to provide new insights into the *N. ceranae* populations infecting *A. mellifera*: *PTP2* and *PTP3*, which encode polar tube proteins (reviewed in [49]), and the largest subunit of the RNA polymerase II (*RPB1*), which has been frequently used as phylogenetic marker in microsporidian species [50,51]. Our results, along with these previous data, provide the first comparative analysis of the patterns of genetic variation of both parasites, allowing us to discuss relevant questions about their recent evolutionary histories.

Material and Methods

Samples

N. apis was isolated from twenty two naturally infected *A. mellifera* colonies from eleven countries worldwide: Algeria, Argentina, Canada, China, Germany, Hungary, the Netherlands, Poland, Slovenia, Spain, and Turkey (S1 Table). A similar number of *N. ceranae* isolates (N= 23) were collected from *A. mellifera* colonies from 17 countries: Algeria, Argentina, Australia, Brazil, Canada, Chile, Croatia, Greece, Hawaii (USA), Hungary, Japan, Netherlands, Slovenia,

Solomon Islands, Spain, Taiwan, and continental United States of America (S2 Table).

Ethics statement

No specific permits were required for the described studies, which did not involve endangered or protected species.

DNA extraction, PCR amplification, cloning and sequencing

DNA was extracted from homogenized pools of 15-20 honey bees from each colony. This was carried out as in Botías et al. [52], using the BioSprint™ 96 DNA Blood Kit (QIAgen, Izasa, Barcelona, Spain). The reagents used in this process were tested by PCR to check for the presence of potential contamination with *N. apis*, *N. ceranae* or honey bee DNA in each round of extractions. The identity of *Nosema* species was determined by specific PCR amplification of the *16S rDNA*, as in Martín-Hernández et al. [53]. No co-infections were detected.

Specific primers were designed with Primer Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) using sequences of each species as query (KE647054.1: 13328-14116 - locus tag NAPIS_ORF00435 - for *PTP2*, KE647278.1: 2294-4285 - locus tag NAPIS_ORF01922 - for *PTP3* and DQ996230.1 for *RPB1* in *N. apis*, and XM_002995356.1 for *RPB1* in *N. ceranae*, respectively). Primer pairs for amplification of *PTP2*, *PTP3* and *RPB1* in *N. apis* were: *PTP2* Na-F (CTGCTACAGCACCGCCATTA) and *PTP2* Na-R (TGGGGTTTAATCTTGCTTTTCCA), *PTP3* Na-F (AGACAAGGTGTTTCTCCAAAAGA) and *PTP3* Na-R (GCAAGGTTTTCTTCTGTTGCC) and *RPB1* Na-F (GTAAAGAGCAGAAGATGATCTAAC) and *RPB1* Na-R (CTGATAATTTGTTTTCTGTCCAATA), respectively. Primer pairs to amplify *RPB1* in *N. ceranae* were those published in Gómez-Moracho et al. [32].

PCR amplification, cloning and sequencing procedures were performed as in Gómez-Moracho et al. [39]. PCR annealing temperatures were adjusted for

each of the primer pairs. These were 59.0 °C, 58.0 °C and 56.5 °C for *PTP2*, *PTP3* and *RPB1* in *N. apis* and 55 °C for *RPB1* in *N. ceranae*, respectively. Each round of PCR amplification included negative and positive controls (PCR components with no template DNA, and PCR components + DNA extracted from *N. ceranae*- or *N. apis*-positive isolates, respectively).

A minimum of five clones per isolate were sequenced, providing, at least, a 76% likelihood of identifying any variant segregating at a frequency of 25% or higher in each isolate. This was calculated using the expression $P = 1 - (1 - p)^n$, where P is the probability of finding a variant at frequency p in a sample of size n . Sequences were checked for accurate base calling using CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA) and aligned with MUSCLE [54] with their reference sequences to determine the nucleotide positions at each locus. The alignments were manually corrected with BioEdit [55] and the sequences submitted to GenBank (S1 and S2 Table).

Apis mellifera: lineage assignment

Determination of the *A. mellifera* evolutionary lineage was performed by sequence analysis of the intergenic region between the tRNA^{leu} and the cytochrome oxidase II (cox2) gene as described previously [56]. DNA was extracted from a pair of legs using the Chelex® method [57]. The intergenic tRNA^{leu}-cox2 region was PCR-amplified in a thermocycler PTC 100 (MJ Research) in a total volume of 12.5 µL with KapaTaq DNA Polymerase (KAPA BIOSYSTEMS), containing 2 µL of DNA template, 200 µM total dNTP, 1 X Reaction Buffer, 0.5 U/rxn KapaTaq DNA Polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 µM of each primer (E2 and H2, [58]). The thermocycler program used was: 94 °C (5 min); 35 cycles of a 45 s denaturation at 94 °C, a 45 s elongation at 48 °C, a 60 s extension at 62 °C; and a final extension step at 65 °C for 20 min. Amplicons were sequenced with the primer E2 (Secugen S.L., Madrid, Spain). Each sequence was manually checked for base calling and a multiple sequence alignment was performed with the MEGA program, version 6 [59]. Evolutionary lineages were determined by comparison with sequences deposited in GenBank (lineage C: JQ977699, JF723946; lineage M: HQ337441, KF274627; lineage A: EF033650, JQ746693).

Sequence analyses

Nucleotide diversity in *N. apis* and *N. ceranae* was estimated at synonymous and non-synonymous sites with DnaSP v5.10.02 [60]. Sites with alignment gaps were excluded from the analyses. π [61] and θ_w [62] were calculated applying the Jukes-Cantor correction [63]. π , the average number of pairwise differences between sequences, is sensitive to the frequency of polymorphisms and complementary to the estimate of θ_w , which measures the levels of variability by counting the number of segregating sites, independently of their frequency, and thus giving more weight to rare variants. The Tajima's D test [64] compares the two statistics. If the population is in mutation-drift equilibrium, π and θ_w are expected to have same value, and D equals zero. Negative D values reflect an excess of low frequency variants (greater θ_w), which under neutrality can be interpreted as evidence for a recent population expansion. According to Tajima's considerations on the different distributions followed by D at individual or pooled loci [64], the statistical significance of the deviation from neutral expectations for individual genes was determined using DnaSP (which assumes a beta distribution). When several unlinked regions of DNA were combined to describe the patterns of polymorphism of a species (pooled loci) this significance was calculated by applying Tajima's formulae and assuming a normal distribution [64]. The possibility of a population expansion was further investigated by applying two tests implemented in DnaSP v5.10.02: the Fu's F_S [65] and the R_2 test [66]. Their significance was assessed by comparing the observed values with a null distribution generated by 1,000 coalescent simulations. The number of net nucleotide substitutions per site between populations, Da [61], was estimated with DnaSP.

Lower bounds of the recombination rate were estimated using two different statistics under the assumption of the infinite sites model (i.e. each segregating site has mutated only once): Rm , the minimum number of recombination events, is based on the four-gamete test [67], which infers a recombination event if all four possible two-locus haplotypes occur in the sample, and Rh [68], which bounds the number of recombination events by calculating the difference between the number of haplotypes in the sample

and the number of segregating sites. Both statistics were calculated with RecMin [68; <http://www.stats.ox.ac.uk/~myers/RecMin.html>]. The population scaled recombination rate ($\rho = 4N_e r$) at the three loci was estimated applying the composite-likelihood method of Hudson [69], adapted to finite-sites model (to account for sites that might have experienced more than one mutation), as implemented in LDhat v2.0 [70]. Since the likelihood of observing recombination is dependent on the order of sites, the statistical significance of a non-zero rate of recombination was evaluated with a permutation test, in which the maximum composite likelihood was calculated under random permutation of the physical position of the variants (1000 permutations) [70].

Haplotype diversity was estimated with DnaSP v5.10.02, the statistics K_{ST}^* [71] and S_{nn} [72], were used to investigate the population structure. Their significance was assessed using permutation tests (1000 replicates).

An analysis of molecular variance (AMOVA) was performed with Arlequin 3.5 [73] and the significance of covariance components was checked by applying non-parametric permutation procedures (3000 permutations).

Haplotype networks were generated with Network 4.6.1.0 (Fluxus Technology, <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) using the Median-Joining algorithm, which allows for more than one different nucleotide per site. The epsilon parameter was set to 0, 10 and 20 in successive runs in order for the resulting network to include all possible shortest trees in the resulting network. Since no significant differences were observed, only those networks generated with epsilon = 0 are presented. The Connection Host criterion was used as distance calculation method. The Reduced Median algorithm (with $r = 2$) was applied to obtain a simplified network containing all shortest trees. All networks were redrawn manually.

Results

Genetic diversity

The genetic variability of *N. apis* samples was initially assessed at *PTP2*, *PTP3* and *RPB1* in seven naturally infected *A. mellifera* colonies from Algeria, Argentina, Canada, Slovenia, Spain ($N=2$) and Turkey (dataset ^A in Table 1 and S1 Table). To increase the resolution of the analysis, and given that the levels of diversity were similar for the three genes (see below), the *RPB1* locus was randomly selected to enlarge the former dataset with sequences of 15 additional samples from Canada ($N=2$), Chile ($N=2$), Germany ($N=3$), Hungary, Netherlands ($N=2$), Poland ($N=3$), Slovenia ($N=2$), (dataset ^{A+B} in Table 1 and S1 Table).



Table 1. Nucleotide diversity at three loci from *N. apis*: PTP2, PTP3 and PRB1.

Isolate	PTP2						PTP3						RPB1									
	Origin	N	π_S	θ_{WS}	D_S	π_A	θ_{WA}	D_A	N	π_S	θ_{WS}	D_S	π_A	θ_{WA}	D_A	N	π_S	θ_{WS}	D_S	π_A	θ_{WA}	D_A
^A 52	SLO	9	0.31	0.51	-1.36	0.00	0.00	NA	5	0.00	0.00	NA	0.00	0.00	NA	9	1.78	1.42	1.03	0.15	0.25	-1.68
174	TUR	10	0.28	0.49	-1.40	0.15	0.26	-1.67	5	1.05	1.25	-1.05	0.34	0.41	-1.09	10	0.71	1.02	-1.28	0.11	0.19	-1.67
204	ARG	8	0.00	0.00	NA	0.09	0.14	-1.31	5	1.42	1.68	-1.09	0.13	0.10	-1.22	11	0.72	0.65	0.34	0.20	0.23	-0.49
381	CAN	9	0.31	0.51	-1.36	0.12	0.20	-1.51	10	0.53	0.93	-1.56	0.24	0.30	-0.76	11	1.22	2.13	-1.90	0.32	0.51	-1.59
399	SPA	7	1.60	1.69	-0.34	0.16	0.23	-1.36	7	1.02	1.42	-1.43	0.12	0.09	1.34	7	0.14	0.20	-1.01	0.12	0.17	-1.36
410	SPA	10	1.79	1.46	0.85	0.15	0.26	-1.67	13	1.22	0.84	1.37	0.13	0.20	-1.23	12	1.06	0.63	2.28	0.07	0.14	-1.63
854	ALG	10	1.30	0.98	1.23	0.04	0.07	-1.11	5	0.70	0.83	-0.97	0.17	0.20	-0.97	8	0.12	0.18	-1.05	0.03	0.05	-1.05
Pooled ^A		63	1.17	1.91	-1.53	0.10	0.58	-2.51	50	1.27	2.14	-1.20	0.20	0.57	-1.91	68	1.50	1.81	-0.55	0.25	0.74	-2.08
^B 59	SLO															8	1.97	1.30	2.29	0.29	0.32	-0.34
264	POL															10	1.94	1.36	1.78	0.18	0.14	0.85
266	POL															10	1.96	1.70	0.58	0.21	0.29	-1.19
268	POL															10	1.93	1.89	1.03	0.17	0.14	0.70
363	CHI															8	2.09	1.66	1.10	0.18	0.16	0.58
380	CAN															8	1.80	1.48	0.93	0.19	0.21	-0.52
382	CAN															10	1.83	1.19	-2.16	0.23	0.24	-0.23
411	CHI															10	0.86	1.36	-1.64	0.16	0.29	-1.80
529	SLO															9	1.66	1.77	-0.37	0.09	0.15	-1.51
569	HUN															10	1.93	1.36	1.69	0.20	0.19	0.14
1074	GER															8	2.07	1.48	1.77	0.17	0.26	-1.60
1098	GER															10	1.32	1.36	-0.21	0.18	0.24	-1.04
1099	GER															10	0.79	0.85	-0.33	0.15	0.19	-0.94
1511	NED															10	2.03	1.53	1.31	0.10	0.10	0.02
1735	NED															9	0.11	0.18	-1.09	0.06	0.10	-1.36
Pooled ^{A+B}																208	1.68	2.78	-1.16	0.22	1.37	-2.53

^A, Seven isolates used to estimate *N. apis* diversity; ^B, 15 additional isolates used for further analysis of RPB1; ALG: Algeria, ARG: Argentina, CAN: Canada, CHI: Chile, GER: Germany, HUN: Hungary, NED: Netherlands, POL: Poland, SLO: Slovenia, SPA: Spain, TUR: Turkey; N: number of cloned sequences; π_S and π_A , pairwise nucleotide diversity at synonymous and nonsynonymous sites expressed as percentage, respectively [61]; θ_{WS} and θ_{WA} , nucleotide site variability based on the number of synonymous and nonsynonymous segregating sites expressed as percentage, respectively [62]; the average number of synonymous and nonsynonymous sites analysed across loci were 155.6 and 582.4, respectively; D_S and D_A , Tajima's *D* [64] at synonymous and nonsynonymous sites, respectively; NA: not available; statistical significance of Tajima's *D*: *, **, ***, *P* <0.05; ***, *P* <0.001.

The three genes displayed similar levels of synonymous variation in *N. apis* (pooled π_s values of 1.17, 1.27 and 1.50%, for *PTP2*, *PTP3* and *RPB1*^A, respectively; these values were estimated by pooling all the sequences of each locus). The enlarged *RPB1* dataset (*RPB1*^{A+B}) produced comparable results (π_s = 1.68%) and was used hereafter. It is interesting to note that these pooled values are twice the observed average diversity in the seven samples (0.80%, 0.85% and 0.82% for *PTP2*, *PTP3* and *RPB1*^A, respectively). This discrepancy could reflect some level of differentiation among isolates and is further investigated in the population structure section below.

Genetic variation at nonsynonymous sites was much lower than that estimated at synonymous sites. Pooled π_A and θ_{WA} across loci were 0.15% and 0.47%, respectively. θ_w estimates were usually higher than those of π , which resulted in pooled negative Tajima's *D* values (Table 1).

The patterns of variation at these loci (*PTP2*, *PTP3* and *RPB1*) were also studied in *N. ceranae* (Table 2 and S2 Table). The pooled π_s values for *PTP2*, *PTP3* and *RPB1* were 1.00%, 0.85% and 1.58%, respectively and, in contrast to what was observed for *N. apis*, these estimates were very similar to the average diversities observed across samples (0.95%, 0.82% and 1.42%, for the same loci, respectively).

Table 2. Nucleotide diversity at three loci from *N. ceranae*: PTP2, PTP3 and PRB1.

Isolate	PTP2 ^a						PTP3 ^a						RPB1 ^b						
	Origin	N	π_S	θ_{WS}	D_S	D_A	N	π_S	θ_{WS}	D_S	D_A	N	π_S	θ_{WS}	D_S	π_A	θ_{WA}	D_A	
3	AUS																		
4	AUS																		
57	SPA	9	1.16	1.02	0.54	0.12	0.14	-0.58	8	1.10	1.08	-0.92	0.07	0.06	0.33	0.07	0.06	0.33	
169	BRA	7	0.66	0.56	0.69	0.15	0.16	-0.27	9	1.14	1.07	0.24	0.22	0.28	-0.91	0.22	0.28	-0.91	
253	SPA	10	1.53	1.47	0.11	0.12	0.21	-1.56	12	0.76	0.77	-0.06	0.29	0.46	-1.52	0.29	0.46	-1.52	
376	CAN	8	0.60	0.53	0.41	0.08	0.07	0.33	6	0.70	0.76	-0.45	0.08	0.07	0.85	0.08	0.07	0.85	
377	CAN	6	1.11	1.21	-0.47	0.13	0.17	-1.13	8	0.88	1.34	-1.64	0.16	0.18	-0.30	0.16	0.18	-0.30	
440	HUN	8	0.70	0.53	1.10	0.08	0.07	0.33	9	0.39	0.64	-1.51	0.13	0.17	-0.94	0.13	0.17	-0.94	
526	NED	8	0.97	0.80	0.84	0.16	0.15	0.24	10	0.99	0.82	0.75	0.24	0.27	-0.38	0.24	0.27	-0.38	
531	SLO	13	0.93	0.67	1.20	0.13	0.12	0.10	5	0.94	1.11	-1.09	0.21	0.22	-0.17	0.21	0.22	-0.17	
839	ALG	7	0.40	0.56	-1.24	0.11	0.16	-1.24	10	0.35	0.62	-1.56	0.09	0.16	-1.56	0.09	0.16	-1.56	
911	TWN	6	0.74	0.60	1.03	0.30	0.34	-0.68	10	0.53	0.62	-0.51	0.14	0.16	-0.76	0.14	0.16	-0.76	
912	SPA	8	0.87	1.33	-1.60	0.14	0.22	-1.45	12	0.70	0.96	-1.02	0.21	0.30	-1.17	0.21	0.30	-1.17	
1175	CRO	9	0.66	0.51	0.98	0.12	0.14	-0.58	11	0.57	0.79	-1.03	0.13	0.16	-0.51	0.13	0.16	-0.51	
1244	ARG	7	1.06	0.85	1.11	0.09	0.08	0.56	11	0.40	0.59	-1.11	0.12	0.16	-0.75	0.12	0.16	-0.75	
1251	HI	10	0.76	0.49	1.74	0.15	0.14	0.22	10	1.08	1.07	-0.54	0.30	0.43	-1.36	0.30	0.43	-1.36	
1299	GRE	10	1.18	0.98	0.75	0.33	0.41	-0.84	12	1.06	0.96	0.33	0.11	0.10	0.22	0.11	0.10	0.22	
1319	HI	7	1.06	0.85	1.11	0.09	0.08	0.56	5	1.17	1.39	-1.12	0.18	0.22	-1.05	0.18	0.22	-1.05	
1324	HI	8	1.45	1.07	1.50	0.10	0.07	1.17	12	0.91	0.77	0.59	0.13	0.15	-0.38	0.13	0.15	-0.38	
1610	USA	5	0.84	0.66	1.46	0.12	0.09	1.22	11	0.81	0.79	0.04	0.11	0.10	0.20	0.11	0.10	0.20	
1994	CHI	11	1.09	1.41	-0.94	0.25	0.46	-1.90	12	0.86	0.77	0.39	0.10	0.15	-1.38	0.10	0.15	-1.38	
2032	SOL	12	1.20	0.92	1.03	0.14	0.13	0.15	11	1.11	1.78	-1.62	0.22	0.31	-1.22	0.22	0.31	-1.22	
KI	JAP																		
Pooled		169	1.00	2.19	-1.46	0.15	0.88	-2.34	194	0.82	3.50	-2.21	0.17	1.35	-2.49	0.17	1.35	-2.49	

^a, Sequence data from [39]; ^b, sequence data for isolates 440, 1251 and 1324 from [32]; ALG: Algeria, ARG: Argentina, AUS: Australia, BRA: Brazil, CAN: Canada, CHI: Chile, CRO: Croatia, GRE: Greece, HI: Hawaii (USA), HUN: Hungary, JAP: Japan, NED: Netherlands, SLO: Slovenia, SOL: Solomon Islands, SPA: Spain, TWN: Taiwan, USA: United States of America; N: number of cloned sequences; π_S and π_A , pairwise nucleotide diversity at synonymous and nonsynonymous sites expressed as percentage, respectively [61]; θ_{WS} and θ_{WA} , nucleotide site variability based on the number of synonymous and nonsynonymous sites segregating sites expressed as percentage, respectively [62]; the average number of synonymous and nonsynonymous sites analysed across loci were 178.3 and 650.7, respectively; D_S and D_A , Tajima's D [64] at synonymous and nonsynonymous sites, respectively; NA: not available; statistical significance of Tajima's D: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Given the evidence for a recent population expansion in *N. ceranae* [32,38,39,42], we examined this possibility in *N. apis* by applying three alternative tests: Tajima's *D* [64], Fu's *F_s* [65] and the *R2* test [66]. The former test can be used to compare the frequency spectrum of variants with neutral expectations, and revealed an excess of low frequency synonymous variants in *N. apis*. Although this deviation was not significant at individual loci (Table 1), it was significant when data from *PTP2*, *PTP3* and *RPB1* were combined ($D_S = -1.82$, $P = 0.034$). Similar results were obtained in *N. ceranae* for *PTP2* and *RPB1* (Table 2); where, the combined data of the three genes revealed a significant excess of low frequency synonymous variants in this species ($D_S = -2.93$, $P < 0.002$). Additional tests (*F_s* and *R2*) performed here provided evidence for a significant deviation of the variants' frequency spectra from neutral expectations in *N. apis*; *F_s* produced highly negative values (Table 3), for *PTP2* and *RPB1*, which indicate the presence of more haplotypes than those expected under neutrality, and *R2* yielded significant negative values for the three loci, denoting a surplus of recent mutations (singletons). *N. ceranae* sequences obtained from *A. mellifera* displayed a similar pattern (Table 3).

Table 3. Statistical tests for detecting population expansion.

Dataset	<i>F_s</i>			<i>R2</i>		
	<i>PTP2</i>	<i>PTP3</i>	<i>RPB1</i>	<i>PTP2</i>	<i>PTP3</i>	<i>RPB1</i>
<i>N. apis</i>	-18.66 ***	-8.17 ns	-87.22 ***	0.03 ***	0.05 **	0.02 **
<i>N. ceranae</i> ^{a, b}	-34.35 ***	-120.89 ***	-77.55 ***	0.02 **	0.01 ***	0.02 **

F_s: Fu's *F_s* [65]; *R2*: Ramos-Onsins and Rozas' *R2* [66]. The significance was evaluated by comparing the values of the statistics, and the observed levels of recombination per gene, with a null distribution generated by 1,000 coalescent simulations (ns, non significant, **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$); ^a, sequence data for *PTP2* and *PTP3* from [39]; ^b, sequence data for isolates 440, 1251 and 1324 (*RPB1*) from [32]; the remaining ones are from this work.

Recombination

The estimate of the population scaled recombination rate ($4N_e r$) was significant at *PTP2* and *RPB1* in *N. apis* (Table 4) and several recombination events were detected at these two loci ($Rm= 2$ and 6 , $Rh= 2$ and 14 , respectively).

Table 4. Statistics used to detect recombination in *N. apis*.

Dataset	Locus	<i>N</i>	<i>Rm</i>	<i>Rh</i>	$4N_e r$	<i>P</i>
<i>N. apis</i>	<i>PTP2</i>	63	2	2	36	*
	<i>PTP3</i>	50	0	0	2	ns
	<i>RPB1</i>	208	6	14	11	***
<i>N. ceranae</i>	<i>PTP2</i> ^a	169	5	10	68	ns
	<i>PTP3</i> ^a	194	3	6	61	*
	<i>RPB1</i> ^b	196	6	12	14	*

N, number of cloned sequences; *Rm*, minimum number of recombination events [67]; *Rh*: lower bound on the number of recombination events [68; <http://www.stats.ox.ac.uk/~myers/RecMin.html>]; *P*, probability of $L_{kmax} \leq$ estimated in a likelihood permutation-based test as implemented in LDhat [70]; ns, non-significant, *, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.001$; ^a, sequence data from [39]; ^b, sequence data for isolates 440, 1251 and 1324 from [32]; the remaining ones are from this work.

The outcome of these tests did not change after removing singleton mutations, which usually contain little information and could cause interferences in the assessment of recombination. In addition, the four-allele combinations expected after a recombination event were found both in individual samples (e.g. AT, TT, AC and TC at positions 276 and 453 of *PTP2* in sample 854 –haplotypes 1, 15, 23 and 24, respectively –; S3 Table) and in samples from different populations (e.g. CC, CT, TC and TT at positions 771 and 963 of *RPB1*^{A+B}; S6 Table), further supporting the existence of low, although statistically significant, levels of recombination in *N. apis*.

Likewise, evidence for recombination was found in *N. ceranae*, although in this case it only reached significance for *PTP3* and *RPB1* (Table 4).

Population structure

N. apis exhibited high levels of haplotype diversity at the three loci under study ($Hd = 0.79 - 0.91$). To explore the distribution of the haplotypes among samples these were plotted into networks (Fig. 1), revealing the following patterns: (i) all loci presented a reduced number of common haplotypes (e.g. h1 in *PTP2* and in *PTP3*, and h2 and h5 in *RPB1*); (ii) most other haplotypes differed from these by a reduced number of substitutions (usually one or two); and (iii), there was a hinted association among haplotypes obtained from Spanish and Algerian samples. For example, *PTP2* haplotypes h15, h16, h17 were shared by the three samples from these two countries (Fig. 1A), and most other closely linked haplotypes (e.g. h14, h18, h19, h21, h22 and h24) were found in either of these countries. A similar effect was observed for *PTP3* haplotypes h3 and h13 (Fig. 1B), and h2 of *RPB1* (Fig. 1C). This raised the possibility of a structuring of the parasite and host populations that was further explored by determining the evolutionary lineage of all sampled honey bee colonies and by quantifying the relative contribution of three covariance components to the observed parasite haplotype diversity: (i) covariance within isolates (i.e., within honey bee colonies), (ii) among isolates obtained from honey bees of the same evolutionary lineage, and (iii) among host evolutionary lineages. Most *N. apis* isolates were collected from *A. mellifera* colonies of lineage C, except isolates 399 and 854 (from Spain and Algeria)

which were of lineage A, and isolates 382 (Canada) and 411 (Chile) which belonged to lineage M (S1 Table). A third isolate from Spain, 410, displayed mixed results, with evidence for the presence of honey bees of both lineages A and M, probably due to drifting workers and the existence of colonies of both evolutionary lineages in the same apiary (S2 Table).

The analysis of molecular variance revealed a structured *N. apis* population, where between 20 and 34% of the total variance at the three loci corresponded to differences among host-lineages ($p < 0.05$, in permutation tests; Table 5). These results held irrespective of whether sample 410 was considered as belonging to lineage A or M. Differences among haplotypes of the same isolate accounted for the best part of the variance (between 62 and 70%), and differences among isolates of the same lineage represented $\leq 11\%$ of the variance. In *N. ceranae* the differentiation of haplotypes within isolates was even greater (between 91 and 99%) but, contrastingly, the differences among host-lineages were not significant as they represented just a tiny fraction of the observed variance ($< 4\%$, Table 5).



Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) in *N. apis* haplotypes according to *A. mellifera* lineages.

Dataset	Locus	Source of variation	d.f.	SS	VC	% var	<i>p</i>
<i>N. apis</i>	<i>PTP2</i>	Among lineages	1	17.2	0.51	32.6	*
		Among isolates within lineages	5	6.1	0.02	1.3	ns
		Within isolates	56	58.7	1.05	66.1	***
	<i>PTP3</i>	Among lineages	1	13.9	0.50	33.8	*
		Among isolates within lineages	5	6.8	0.07	4.6	*
		Within isolates	43	38.9	0.90	61.6	***
	<i>RPB1</i>	Among lineages	2	54.3	0.56	19.6	**
		Among isolates within lineages	19	94.1	0.32	10.8	***
		Within isolates	186	374.3	2.01	69.6	***
<i>N. ceranae</i>	<i>PTP2</i> a	Among lineages	2	6.0	0.04	3.5	*
		Among isolates within lineages	17	20.5	0.01	0.9	ns
		Within isolates	149	166.3	1.12	95.6	ns
	<i>PTP3</i> a	Among lineages	2	242.1	-13.96	-2.2	ns
		Among isolates within lineages	17	14014.6	20.29	3.2	ns
		Within isolates	174	109558.1	629.64	99.0	ns
	<i>RPB1</i> b	Among lineages	2	10.0	0.04	1.9	ns
		Among isolates within lineages	20	63.9	0.14	6.7	*
		Within isolates	173	339.7	1.96	91.4	**

^a, Sequence data from [39]; ^b, sequence data for isolates 440, 1251 and 1324 from [32]; the remaining ones are from this work; isolate 410 was considered as if sampled from a lineage A honey bee colony (see text); d.f., degrees of freedom; SS, sum of squares; VC, variance components; % var, percentage of variation; *p*, probability of a random variance component value ≤ observed value, in 3024 permutations; *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01 and ***, *p* < 0.001; ns, non-significant.

A pairwise analysis of *N. apis* differentiation between host lineages uncovered that most variation occurred between lineage A and the other two lineages, which were otherwise indistinguishable (Table 6). K_{ST}^* , which measures the average pairwise differences within populations with respect to the total, exhibited significant differentiation between *N. apis* sequences obtained from *A. mellifera* colonies of lineages A and C (K_{ST}^* between 0.09 and 0.25, $p < 0.001$, Table 6) or between A and M ($K_{ST}^* = 0.30$, $p < 0.001$). Similarly, S_{nn} , which estimates how often related sequences are found in the same population, reached significant values between group A and C ($S_{nn} = 0.82-0.93$, $p < 0.001$) and between A and M ($S_{nn} = 1.00$, $p < 0.001$). Both tests failed to detect significant differences between sequences obtained from lineages C and M.

The net divergence between *N. apis* from lineage A and C/M colonies is 0.002. Considering that observed divergence between two populations is a direct function of the mutation rate times twice the time elapsed since their split, and assuming that the mutation rate in these microsporidia is similar to that observed in other fungi (e.g. 7.2×10^{-11} mutations per replicaton for *Neurospora crassa* or 1.2×10^{-10} for *Saccharomyces cerevisiae*; [74]), and that the number of spores can double as fast as every 24 hours (e.g. [75,76]), the split between the two parasite populations can be dated between 12500 and 38000 years ago.

Table 6. Analysis of population differentiation in *N. apis* according to *A. mellifera* lineages.

Dataset	Locus	Host Lineages	K_{ST}^*	P	S_{nn}	P
<i>N. apis</i>	PTP2	A & C	0.16	***	0.82	***
		A & M	0.30	***	1.00	***
		C & M	0.00	ns	0.81	ns
	PTP3	A & C	0.25	***	0.95	***
		A & M	0.01	*	0.61	**
		C & M	0.00	ns	0.73	**
RPB1	A & C	0.09	***	0.93	***	
	A & M	0.00	ns	0.54	ns	
	C & M	0.00	ns	0.76	ns	
<i>N. ceranae</i>	PTP2 ^a	A & C	0.02	**	0.69	*
		A & M	0.02	*	0.55	ns
		C & M	0.00	ns	0.69	ns
	PTP3 ^a	A & C	0.00	ns	0.67	*
		A & M	0.01	*	0.61	**
		C & M	0.00	ns	0.73	**
	RPB1 ^b	A & C	0.02	*	0.68	ns
		A & M	0.00	ns	0.54	ns
		C & M	0.00	ns	0.76	ns

^a, sequence data from [39]; ^b, sequence data for isolates 440, 1251 and 1324 from [32]; the remaining ones are from this work; isolate 410 was excluded; K_{ST}^* [71], estimates the amount of within-deme nucleotide diversity relative to the overall diversity; S_{nn} [72], measures how often related sequences are found in the same deme; P , significance in permutation tests: ns, non-significant, ***, $P < 0.001$; ns, non-significant.

Discussion

This is the first population genetic analysis of *N. apis* that involves just single copy genes, which, as mentioned above, are better suited than multicopy loci to describe the evolutionary and demographic patterns of a species. In fact, to our knowledge, only Ironside [44] has published diversity data for a locus (*RPB1*) other than the ones included in the rDNA unit [45].

The genes studied here displayed similar levels of synonymous diversity (π_s), about 1% (Table 1), analogous to what was found for these and other loci in *N. ceranae* [32,38,39,41], and somewhat higher than those previously reported for *RPB1* in *N. apis* [44]; the discrepancy with Ironside's results likely derives from the fact that he only considers a polymorphism in a cloned sequence when it is also observed in the electropherograms obtained by direct sequencing of PCR products. Such criterion is very stringent and prevents any realistic comparison with our data since it overlooks the existence of any variant present at low frequencies that, unlike mutations appearing at intermediate frequencies, cannot be distinguished as double peaks in the electropherograms.

On the other hand, the detection of substantially lower π_A and significantly negative Tajima's D_A values in both species indicate that amino acid replacement variants are readily removed from the populations, which reflects that these three loci are functional and subject to purifying selection, as previously suggested in *N. apis* [44] and *N. ceranae* [32,36,38,39,44] for these and other genes. The finding of just 29 pseudogenes in the genome of *N. ceranae* [42] also seems to indicate that the majority of coding sequences retained in these reduced genomes [33,77] are essential for the survival of these parasites and, thus, are evolutionary constrained by purifying selection.

The results of the Tajima's D at silent sites revealed an overall excess of low frequency variants in the two parasite species (Tables 1 - 2); although some of these could correspond to nucleotide misincorporations introduced during the PCR process (despite the use of a high-fidelity enzyme blend), previous assays using either invariant DNA templates [38,39] or single DNA molecules [40],

confirmed that the vast majority of the mutations present in *N. ceranae* were true and that no error-prone bias was brought throughout the procedure. The same pattern was also observed at the genomic level [42], so there are no reasons to think that this would be different in *N. apis*.

The significant excess of haplotypes observed in the F_S test for both species raises the question about the nature of this high intra-isolate diversity. Given that all the studied loci are present as single copy in the genome of both parasites, the only alternatives to explain the allelic variability detected within isolates are the polyploidy of the two nuclei that conform the diplokaryon of these organisms, which has been recently addressed in *N. ceranae* [42], and/or the infection with multiple *Nosema* haplotypes [32,39,41]. Both options are not mutually exclusive.

At any rate, the accumulation of alleles at low frequencies observed in these two species is compatible with a demographic growth, in which most mutations present in the newly expanded population are of recent origin and, therefore, rare [78]. The greater D_S value obtained for *N. ceranae* in the combined sample ($D_S = -2.93$), suggest that this expansion probably took place more recently than that of *N. apis* ($D_S = -1.82$), such that the variants had less time to increase in frequency as compared with those from the latter species. This would agree with its recent jump to *A. mellifera* and spread throughout the worldwide distribution range of its new host [32,38,39,41,42]. It should also be noted that the sampling scheme might also influence the observed frequency spectra of variants, as the retrieval of a few alleles from various highly differentiated demes is expected to cause an excess of low frequency mutations, which would be the opposite outcome if the sampled population resulted from the admixture of two independent demes in equilibrium (an excess of intermediate frequency variants would be likely in this case). The reduced between-sample variation in *N. ceranae* means that this effect is unlikely in this species. But for *N. apis* our results draw a more complex scenario, as these patterns are coupled with evidence for genetic differentiation of the parasite populations across the host population. Under these circumstances, the null hypothesis of a panmictic *N. apis* population

might not be met and the interpretation of deviations from null expectations must be taken with caution.

A. mellifera originated between 6 and 8 million years ago somewhere in Asia, where all other species of the genus are confined, and from where it expanded to its actual geographic distribution range across sub-Saharan Africa, Europe and Western Asia [79,80]. The species now comprises several locally adapted and anatomically distinct subspecies, all of whom can be clustered into four major groups, which split between 0.3 to one million years ago: lineage A, that includes subspecies from Africa; lineage M, that is distributed along Western and Northern Europe; lineage C, that is found in South Eastern Europe, and lineage O, that is localised across the Middle East and Western Asia [79,80]. The European lineages C and M displayed the highest level of differentiation,. Our results suggest that between 20% and 34% of the genetic variance of the parasite population corresponds to differences between samples collected from honey bee colonies of different lineages (Table 5). Remarkably, the genetic structure of the parasite does not match that of the host, as differences in *N. apis* isolates are greater between those collected from of honey bees of lineages A and C (or M), and no evidence for differentiation between those from lineages C and M was found.

This lack of a full correspondence between the structures of parasite and host populations suggests that they do not share a common demographic history. In fact, although the split between the parasite in European and African honey bees could be dated to the last glacial period (between 12500 and 38000 years ago), the lack of genetic differentiation between those in C and M suggests that *N. apis* has only recently spread throughout the European lineages of *A. mellifera*. In this scenario, the recent expansion of *N. apis* could be linked to that experienced by its host, *A. mellifera*, during the re-colonization of Europe since the Last Glacial Maximum, about 20,000 years ago [79], and its worldwide expansion to the New World, East Asia and Oceania in the last few centuries [80,81].

Evidence for low levels of recombination from nucleotide variation data had been reported [32,36,38,39,41,42], and further supported by Single Genome

Amplification (SGA) analysis in *N. ceranae* [40], , another allegedly asexual species, suggesting that this could be a common feature of the genus. This goes in line with the detection of a sex-related locus in *N. ceranae* [82], that are also present in the genome of *N. apis* (data verified by Blast with the *E. cuniculi* *TPT*, *HMG*, and *RNA helicase* genes). In any case this process is crucial in the evolution of organisms, and its detection has important consequences since it can generate new genetic combinations that result in individuals better adapted to confront novel environments or hosts.

If clonal reproduction is assumed, high levels of genetic differentiation would be expected between homologous sequences in the two nuclei of each individual (an adaptation of the Meselson effect for a diplokaryon). The absence a strong genetic structure of the haplotypes retrieved from each colony, with neutral diversity within samples of the order of 1%, coupled with recombination, suggest that there might exist mechanisms for genetic flow between the nuclei, in contrast to previous findings [38,42,44]. Whether the exchange takes place between nuclei of the same cell, between those of different cells during the multinucleated stages of the merogonia [83], or by means of cryptic stages of sexual reproduction is still to be determined.

Acknowledgments

We thank beekeepers for providing the samples analyzed and V. Albendea, T. Corrales, M. Gajero, C. Uceta, J. García and J. Almagro for technical support. We are also grateful to J. Chen, who provided the *Nosema apis* sequences for *PTP2* and *PTP3* prior to their publication.

Funding

This study was supported by Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria - Fondo Europeo de Desarrollo Regional grant numbers RTA2013-00042-C10-05 and 06 (INIA-FEDER; <http://www.inia.es/inia/>), and Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente - Fondo Español de Garantía Agraria funds (MAGRAMA-FEAGA; Plan Apícola Nacional 2014; <http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/funciones->

[estructura/organizacion-organismos/organismos-publicos/fega/](#)). PDR is presently member and receive support from COST Action FA1307 (Sustainable pollination in Europe: joint research on bees and other pollinators (SUPER-B; http://www.cost.eu/COST_Actions/fa/Actions/FA1307).

References

1. Keeling P. Five questions about microsporidia. PLoS Pathog. 2009; 5: e1000489.
2. James TY, Pelin A, Bonen L, Ahrendt S, Sain D, Corradi N, et al. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and microsporidia. Curr Biol. 2013; 23: 1548-1553.
3. Kudo R. Notes on *Nosema apis* Zander. J Parasitol. 1920; 7: 85-90.
4. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ. *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur J Protistol. 1996; 32: 356-365.
5. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J Invertebr Pathol. 2006; 92: 93-95.
6. Huang WF, Jiang JH, Chen YW, Wang CH. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. Apidologie. 2007; 38: 30-37.
7. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, et al. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J Invertebr Pathol. 2007; 96: 1-10.
8. Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J Invertebr Pathol. 2008; 97: 186-188.

9. Medici SK, Sarlo EG, Porrini MP, Braunstein M, Eguaras MJ. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitol Res.* 2012; 110: 859-864.
10. Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie.* 2009; 40: 117-123.
11. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botías C, Meana A. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *J Apicult Res.* 2009; 48: 217-219.
12. Botías C, Anderson DL, Meana A, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Higes M. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *J Invertebr Pathol.* 2012; 110: 108-113.
13. Chaimanee V, Chen Y, Pettis JS, Scott Cornman R, Chantawannakul P. Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *J Invertebr Pathol.* 2011; 107: 229-233.
14. Graystock P, Yates K, Darvill B, Goulson D, Hughes WO. Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *J Invertebr Pathol.* 2013; 114: 114-119.
15. Plischuk S, Martín-Hernández R, Prieto L, Lucía M, Botías C, Meana A, et al. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Rep.* 2009; 1: 131-135.
16. Webster TC. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am Bee J.* 1993; 133: 869-870.
17. Smith ML. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS One.* 2012; 7: e43319.
18. OIE. Nosemosis of honey bees (NB: Version adopted in May 2013). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014.* Available:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf.

19. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 2010; 41: 375-392.
20. Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS One*. 2013; 8: e58165.
21. Dussaubat C, Maisonnasse A, Crauser D, Beslay D, Costagliola G, Soubeyrand S, et al. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J Invertebr Pathol*. 2013; 113: 42-51.
22. Alaux C, Crauser D, Pioz M, Saulnier C, Le Conte Y. Parasitic and immune modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. *J Exp Biol*. 2014; 217: 3416-3424.
23. Schmid-Hempel R. Parasites in social insects. Chichester, West Sussex, UK: Princeton University Press; 1998.
24. Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol*. 2008; 10: 2659-2669.
25. Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, et al. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One*. 2011; 6: e20656.
26. Bailey L. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. *Ann Appl Biol*. 1955; 43: 379-389.
27. Perry CJ, Sovik E, Myerscough MR, Barron AB. Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112: 3427-3432.

28. Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet Res.* 2013; 44: 25.
29. Gisder S, Hedtke K, Mockel N, Frielitz MC, Linde A, Genersch E. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 3032-3038.
30. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One.* 2012; 7: e32151.
31. Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ Microbiol Rep.* 2013; 5: 17-29.
32. Gómez-Moracho T, Maside X, Martín-Hernández R, Higes M, Bartolomé C. High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. *Parasitology.* 2014; 141: 475-481.
33. Chen Y, Pettis JS, Zhao Y, Liu X, Tallon LJ, Sadzewicz LD, et al. Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics.* 2013; 14: 451.
34. Fries I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol.* 2010; 103 Suppl 1: S73-79.
35. Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundensen-Rindal D, et al. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J Eukaryot Microbiol.* 2009; 56: 142-147.
36. Sagastume S, del Aguila C, Martín-Hernández R, Higes M, Henriques-Gil N. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environ Microbiol.* 2011; 13: 84-95.

37. Sagastume S, Martín-Hernández R, Higes M, Henriques-Gil N. Ribosomal gene polymorphism in small genomes: analysis of different *16S rRNA* sequences expressed in the honeybee parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Eukariot Microbiol.* 2014; 61: 42-50.
38. Roudel M, Aufauvre J, Corbara B, Delbac F, Blot N. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology.* 2013; 140: 1346-1356.
39. Gómez-Moracho T, Bartolomé C, Bello X, Martín-Hernández R, Higes M, Maside X. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infect Genet Evol.* 2015; 31: 87-94.
40. Gómez-Moracho T, Bartolomé C, Martín-Hernández R, Higes M, Maside X. Evidence for weak genetic recombination at the *PTP2* locus of *Nosema ceranae*. *Environ Microbiol.* 2014.
41. Van der Zee R, Gómez-Moracho T, Pisa L, Sagastume S, García-Palencia P, Maside X, et al. Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberiensis*). *Environ Microbiol Rep.* 2014; 6: 401-413.
42. Pelin A, Selman M, Aris-Brosou S, Farinelli L, Corradi N. Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen *Nosema ceranae*. *Environ Microbiol.* 2015.
43. Burgher-MacLellan KL, Williams GR, Shutler D, MacKenzie K, Rogers REL. Optimization of duplex real-time PCR with melting-curve analysis for detecting the microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*. *Can Entomol.* 2010; 142: 271-283.
44. Ironside JE. Diversity and recombination of dispersed ribosomal DNA and protein coding genes in microsporidia. *PLoS One.* 2013; 8: e55878.
45. Gatehouse HS, Malone LA. Genetic variability among *Nosema apis* isolates. *J Apicult Res.* 1999; 38: 79-85.

46. Gatehouse HS, Malone LA. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J Invertebr Pathol.* 1998; 71: 97-105.
47. Eickbush TH, Eickbush DG. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics.* 2007; 175: 477-485.
48. Gong J, Dong J, Liu X, Massana R. Extremely high copy numbers and polymorphisms of the rDNA operon estimated from single cell analysis of oligotrich and peritrich ciliates. *Protist.* 2013; 164: 369-379.
49. Xu Y, Weiss LM. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int J Parasitol.* 2005; 35: 941-953.
50. Hirt RP, Logsdon JM, Jr., Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM. Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 580-585.
51. Ironside JE. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evol Biol.* 2007; 7: 48.
52. Botías C, Martín-Hernández R, Dias J, García-Palencia P, Matabuena M, Juarranz A, et al. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ Microbiol.* 2012; 14: 845-859.
53. Martín-Hernandez R, Botías C, Bailón EG, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, et al. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol.* 2012; 14: 2127-2138.
54. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 1792-1797.
55. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41: 95-98.

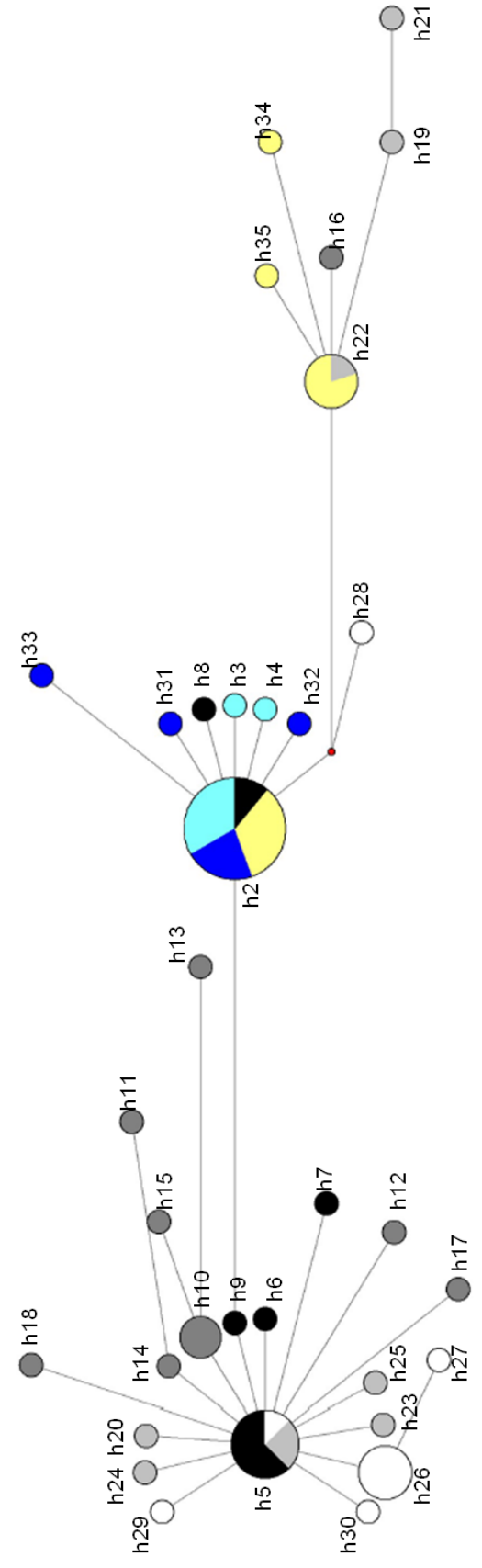
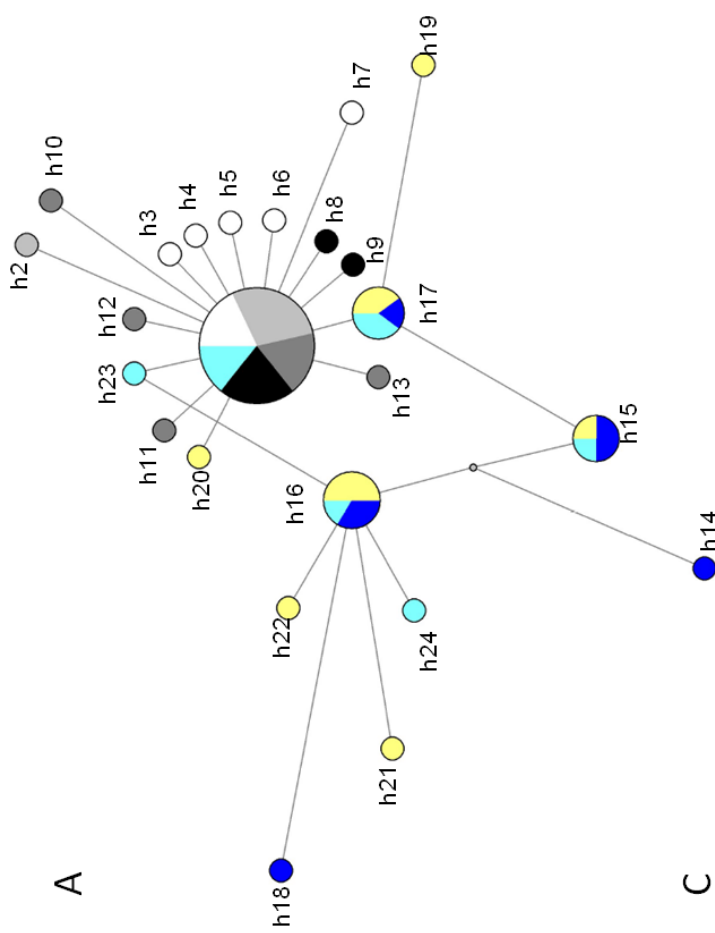
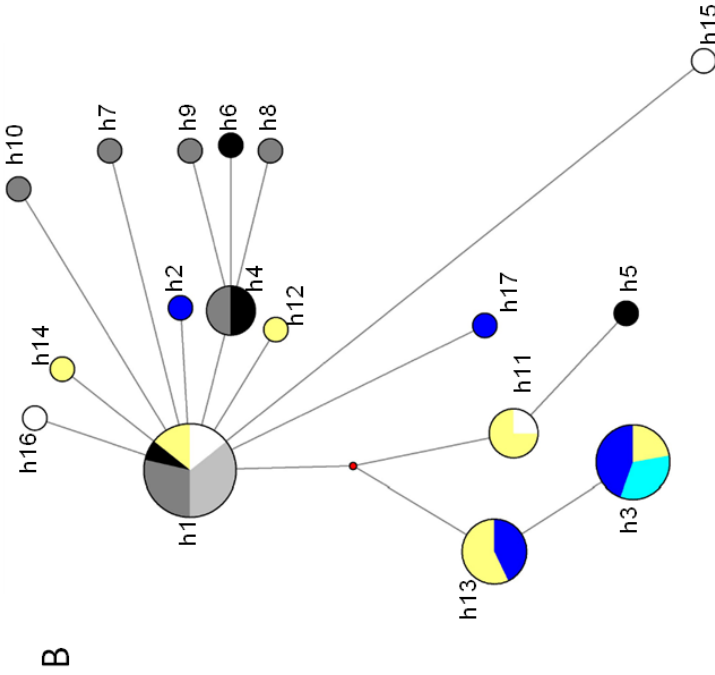
56. Evans JD, Schwarz RS, Chen YP, Budge G, Cornman RS, De la Rúa P, et al. Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera*. In: Dietemann V, Ellis JD, Neumann P, editors. The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research: J Apic Res 52(4). 2013.
57. Walsh PS, Metzger DA, Higushi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10(4): 506-13 (April 1991). *Biotechniques*. 2013; 54: 134-139.
58. Garnery L, Solignac M, Celebrano G, Cornuet JM. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. . *Experientia*. 1993; 49: 1016-1021.
59. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30: 2725-2729.
60. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009; 25: 1451-1452.
61. Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press; 1987.
62. Watterson GA. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor Popul Biol*. 1975; 7: 256-276.
63. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor. *Mammalian protein metabolism*. New York: Academic Press. pp. 21-132. 1969.
64. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989; 123: 585-595.
65. Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997; 147: 915-925.
66. Ramos-Onsins SE, Rozas J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol*. 2002; 19: 2092-2100.

67. Hudson RR, Kaplan NL. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics*. 1985; 111: 147-164.
68. Myers SR, Griffiths RC. Bounds on the minimum number of recombination events in a sample history. *Genetics*. 2003; 163: 375-394.
69. Hudson RR. Two-locus sampling distributions and their application. *Genetics*. 2001; 159: 1805-1817.
70. McVean G, Awadalla P, Fearnhead P. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics*. 2002; 160: 1231-1241.
71. Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL. A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol Biol Evol*. 1992; 9: 138-151.
72. Hudson RR. A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics*. 2000; 155: 2011-2014.
73. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010; 10: 564-567.
74. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*. 1998; 148: 1667-1686.
75. Fries I, Granados RR, Morse RA. Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie*. 1992; 23: 61-70.
76. Singh RN, Sasidharan TO, Santha PC, Daniel AGK, Kamble CK. Role of temperature on multiplication and sporulation of *Nosema bombycis* in silk moth, *Bombyx mori* L. . *J Agric Sci*. 2005; 18: 398-400.
77. Cornman RS, Chen YP, Schatz MC, Street C, Zhao Y, Desany B, et al. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens*. 2009; 5: e1000466.

78. Tajima F. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*. 1989; 123: 597-601.
79. Wallberg A, Han F, Wellhagen G, Dahle B, Kawata M, Haddad N, et al. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nat Gen*. 2014; 46: 1081-1088.
80. Han F, Wallberg A, Webster MT. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecol Evol*. 2012; 2: 1949-1957.
81. Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, et al. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*. 2006; 314: 642-645.
82. Lee SC, Corradi N, Doan S, Dietrich FS, Keeling PJ, Heitman J. Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi. *PLoS One*. 2010; 5: e10539.
83. Gray FH, Cali A, Briggs JD. Intracellular stages in the life cycle of the microsporidian *Nosema apis*. *J Invertebr Pathol*. 1969; 14: 391-394.

Figure legends

Fig. 1. Median-joining haplotype network for three *N. apis* loci according to their origin: *PTP2* (A), *PTP3* (B) and *RPB1* (C). Haplotypes are depicted by circles, the width being proportional to their frequencies; mv: median vector (hypothesised haplotype required to connect existing sequences within the network with maximum parsimony). Isolates are shown in different colours: 854 (Algeria, lineage A)-light blue; 399 (Spain, lineage A)-dark blue; 410 (Spain, lineage A/M)-yellow; 204 (Argentina, lineage C)-black; 381 (Canada, lineage C)-dark grey; 52 (Slovenia, lineage C)-light grey; 174 (Turkey, lineage C)-white.







DISCUSIÓN



Polimorfismo genético de *N. ceranae*

La población de *N. ceranae* en *A. mellifera* presenta niveles significativos de polimorfismo, independientemente de si se analizan aislados procedentes de una sola abeja (p.ej. aislados SOL y 252) o de varias (15-20 individuos) (Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015; Maside et al., en revisión). Esta observación contrasta con descripciones de una reducida, o inexistente, variación genética en la región *SSU* del *ADNr* (Medici et al., 2012; Bolland et al., 2013; Bekele et al., 2015), o del gen de copia única, *PTP1* (Chaimanee et al., 2011). Sin embargo, en estos trabajos se secuenciaron directamente los productos de PCR, una práctica que no es apropiada para estos fines, como se describió en la sección 4.5 de la Introducción y en Gómez-Moracho et al., (2014b). Nuestra observación de variación en todas las colmenas coincide con otros ensayos recientes en los que se clonaron los productos de amplificación previamente a su secuenciación (Hatjina et al., 2011; Roudel et al., 2013).

El grado de diversidad observado varía dependiendo de los aislados de *N. ceranae* y los genes analizados (Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015; Maside et al., en revisión). Esto coincide con otros estudios llevados a cabo tanto en el *ADNr* (Sagastume et al., 2011) como en otros genes de copia única (Roudel et al., 2013). La mayor tasa de variabilidad genética se detectó en la región *IGS* del *ADNr* (2,59%; Sagastume et al., 2011), mientras la *SSU* del mismo (0,14%; Sagastume et al., 2011) se situó dentro del rango observado para diferentes genes de copia única (0,10 – 1,78 %; Roudel et al., 2013).

El estudio de la diversidad genética distinguiendo entre las posiciones sinónimas y no sinónimas de los genes nos permitió analizar por separado el efecto de fuerzas deterministas, como la selección natural y la selección purificadora sobre los genes, y de procesos estocásticos, como la demografía de las poblaciones. La diversidad genética promedio de *N. ceranae* en los sitios sinónimos (π_s) es aproximadamente del 1% (Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015; Maside et al., en revisión), aunque se observó variación entre los distintos loci. Los genes de la *actina* y *Hsp70* resultaron ser los menos variables ($\pi_s = 0,36\%$ y $0,27\%$, respectivamente; Gómez-Moracho et al., 2014b) en comparación con los otros marcadores analizados ($\pi_s = 1,03\%$; $0,80\%$; $1,02\%$ y $1,50\%$ en *PTP2*, *PTP3*, *PTP1* y *RPB1*, respectivamente; Gómez-moracho et al., 2015; Maside et al., en revisión). Esta observación está probablemente relacionada con los elevados coeficientes de selección purificadora a la que están sometidos estos genes, que se encuentran entre los más conservados de los genomas eucariotas. De hecho, las proteínas codificadas por ambos están implicadas en funciones vitales para el organismo, como el mantenimiento celular,

por parte de la actina (Bigliardi et al., 1999), o el plegamiento y estabilización de las proteínas, por la proteína HSP70 (Gupta and Singh, 1994). La eliminación de haplotipos con mutaciones deletéreas en estos genes acarrea también una pérdida de variación neutra en posiciones ligadas, que se aprecia a modo de una reducción de la diversidad sinónima (π_s). Este proceso, es conocido como selección de fondo (*background selection*; Charlesworth et al., 1993; Charlesworth and Charlesworth, 2010; Stephan, 2010) y aplica especialmente a genomas o regiones genómicas con bajas tasas de recombinación. Alternativamente, una menor tasa de mutación en estos dos genes, o un efecto fundador en el origen de las poblaciones del parásito podrían haber contribuido a esta observación, aunque su ocurrencia debería haber dejado una huella semejante en todo el genoma, efecto que no es apreciable en igual medida en el resto de loci analizados.

Evidencia de la acción de la selección purificadora en *Nosema*

N. ceranae muestra niveles muy reducidos de variación no sinónima (π_A) en los seis genes analizados, lo que podría indicar que están sujetos a la acción de la selección purificadora. Esto sería indicativo de que los genes analizados son funcionales, ya que, de lo contrario, tenderían a acumular mutaciones a lo largo del tiempo. Una razón d_N/d_S promedio de 0,16 (estimada a partir de secuencias de 10 loci de Roudel et al., 2013 y nuestros propios datos, usando el método de Yang and Nielsen, 2000; con la ayuda del programa PAML v4.6; Yang, 2007), reafirma esta observación, al poner de manifiesto una menor tasa de evolución en lugares no sinónimos de las regiones codificadoras. Otra evidencia de esta selección también se encuentra en los valores negativos y estadísticamente significativos del estadístico D de Tajima (D_A) (Tajima, 1989), que denotan la presencia de un exceso de variantes a baja frecuencia en sitios no sinónimos ($\pi_A < \theta_A$). Este estadístico (D_A) es negativo en todos los genes en *N. ceranae* y, aunque solo es significativo en cuatro de ellos (*Hsp70*, *PTP2*, *PTP3* y *RPB1*) (Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015; Maside et al., en revisión), también lo es en el conjunto global de la muestra ($D_A = -5,09$; $p < 0,001$), coincidiendo con Roudel et al. (2013). Esta observación concuerda con la hipótesis de que la reducción genómica sufrida por estos organismos es resultado de su adaptación a un modo de vida parasitario que, aunque les permitió prescindir de buena parte de sus genes, se fundamenta en un acervo genético altamente especializado.

Variación genética de *N. ceranae* dentro de las colonias parasitadas

La mayor parte de la variabilidad genética observada en *N. ceranae* corresponde a cambios de un solo nucleótido (*single nucleotide variants*, *SNVs*). En su mayoría aparecen una sola vez en la muestra (*singletons*) y su combinación da lugar a un elevado número de haplotipos (Hatjina et al., 2011; Sagastume et al., 2011; Roudel et al., 2013; Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015), tal como se ha podido observar tanto en el *ADNr* (79 haplotipos de un total de 105 clones; Sagastume et al., 2011) como en genes de copia única (p. ej. 13 haplotipos en 23 clones para *Hsp70*, Gómez-Moracho et al., 2014b; o 5 haplotipos en 5 clones de *PTP3*; Hatjina et al., 2011, entre otros). Esto redundaría en la considerable diversidad haplotípica observada en todos los aislados –incluso en aquellos obtenidos a partir de una sola abeja (Roudel et al., 2013; Gómez-Moracho et al., 2015)–. Esta heterogeneidad haplotípica sugiere la posibilidad de que los genes analizados pudieran existir en varias copias en el genoma de *N. ceranae*, lo que resultaría contradictorio con su reducido tamaño genómico (Cornman et al., 2009; Chen et al., 2013; Pelin et al., 2015). Sin embargo, la secuencia del genoma de este organismo (Cornman et al., 2009) reveló que sólo existía una copia de cada uno de ellos.

Teniendo en cuenta la naturaleza diplocarionte del género *Nosema*, otra posibilidad es que cada núcleo albergue un alelo diferente (O'Mahony et al., 2007). De ser así, asumiendo que los dos núcleos de *N. ceranae* fuesen haploides, una espora podría tener como mucho dos alelos distintos de un gen de copia única, o cuatro en el caso de que cada núcleo fuera diploide, como han sugerido recientemente Pelin et al. (2015). Sin embargo, esta última hipótesis se propuso con el fin de explicar la diversidad observada en aislados del parásito y no está sostenida por ninguna evidencia directa, como podrían ser un estudio citométrico o el análisis genético de individuos aislados (= análisis de una única célula). Además, no es suficiente para explicar la presencia de más de cinco haplotipos de *N. ceranae* en una sola abeja (p. ej. *PTP2*: 6 haplotipos en el aislado 252; Gómez-Moracho et al., 2015), observación que sugiere la existencia de parasitaciones mixtas, por diferentes “linajes” del patógeno. Esta posibilidad facilitaría el mantenimiento de la diversidad de las poblaciones del parásito, ya que un único hospedador infectado por distintas variantes, podría transmitir las fácilmente a otras colmenas mediante contacto directo o indirecto (ver artículo Gómez-Moracho et al., 2015).

Estructura genética y origen geográfico de la población de *N. ceranae* que infecta *A. mellifera*

La estructura haplotípica de *N. ceranae* aporta información interesante sobre su historia demográfica reciente. La mayor parte de la variación observada en *N. ceranae* en esta abeja corresponde a diferencias dentro de cada aislado (hasta un 88% de variación) y sólo una fracción menor (< 4%) corresponde a diferencias entre aislados (Gómez-Moracho et al., 2015). Esto sugiere que *N. ceranae* no ha tenido tiempo de diferenciarse en este hospedador y que, aunque en ocasiones aparecen variantes genéticas que podrían sugerir una diferenciación incipiente en determinadas áreas geográficas (p. ej. como las variantes G748A de *PTP2* en España o C1712A de *PTP3* en Holanda; Van der Zee et al., 2014; Gómez-Moracho et al., 2015), éstas no son suficientes como para considerarlas subpoblaciones distintas (Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015; Van der Zee et al., 2014). Sin embargo existe una notable diferenciación poblacional entre muestras procedentes de distintos hospedadores (16,45% y 8,17% de la variación total en *PTP2* y *PTP3*, respectivamente; Gómez-Moracho et al., 2015) de acuerdo con lo descrito por Chaimanee et al., (2011), aunque al contrario que en el trabajo aquí presentado, ellos no observan diferencias entre los aislados de *A. mellifera* y *A. cerana*. En su estudio, basado en el gen *PTP1*, señalan que este microsporidio se puede diferenciar en tres poblaciones: una que agrupa las secuencias obtenidas de *A. florea*, otra a las de *A. dorsata* y una tercera que engloba conjuntamente a las procedentes de *A. cerana* y *A. mellifera*. Sin embargo, hay que señalar que estos autores analizan secuencias obtenidas directamente de productos de PCR, con los riesgos técnicos que ello conlleva (Sección 4.5; Hatjina et al., 2011; Gómez-Moracho et al., 2014b), lo que cuestiona seriamente los resultados que presentan y por lo tanto su interpretación.

La reducida diferenciación entre aislados y la existencia de un número reducido de haplotipos muy comunes (como ocurre con h3 y h6 de *PTP2* y en otros genes de copia única; Gómez-Moracho et al., 2015; Roudel et al., 2013) sugiere que la propagación de *N. ceranae* a las colonias de *A. mellifera* en todo el mundo probablemente tuvo lugar desde un origen común. Es plausible que estos haplotipos estuvieran presentes en la población fundadora de *N. ceranae*, y que de ellos surgieran el resto, de los que se diferencian en unos pocos cambios nucleotídicos.

N. ceranae fue descrita inicialmente en la abeja *A. cerana*, natural del sudeste asiático (Fries et al., 1996). Este hospedador fue considerado como reservorio original desde el que migró la población que ahora infecta *A. mellifera* en todo el mundo (Klee et al., 2007; Botías et al., 2012a). Pero estudios recientes demostraron que *N. ceranae* es capaz de infectar muchos otros

hospedadores como *A. florea* (Chaimanee et al., 2010; Suwannapong et al., 2011), *A. dorsata* (Chaimanee et al., 2010, 2011), *A. kochevnikovi* (Botías et al., 2012a), y distintas especies del género *Bombus*: *Bombus morio*, *Bombus bellicosus* (Plischuck et al., 2010), *Bombus attratus* (Plischuck et al., 2010; Gamboa et al., 2015), *Bombus waltoni*, *Bombus remotus*, *Bombus impetuusus*, *Bombus sibiricus* (Li et al., 2012) o *Bombus terrestris* (Graystock et al., 2013). Aunque el polimorfismo genético en los aislados de *N. ceranae* en *A. cerana* es ligeramente mayor que en *A. mellifera* y *A. florea*, la diferencia no es estadísticamente significativa (Gómez-Moracho et al., 2015). Ante la expectativa de que las poblaciones originales tengan un mayor tamaño efectivo que las que derivan de ella y por ello sean más diversas (Mayr, 1942), esta observación sugiere la posibilidad de que la población de *N. ceranae* a partir de la cual se produjo la colonización resida en otros himenópteros del SE Asiático.

Por otro lado, *N. ceranae* presenta un exceso de mutaciones a baja frecuencia en sitios sinónimos ($D_s < 0$), lo que es consistente con una situación de expansión poblacional. A su vez, esto se corrobora por los valores negativos de los estadísticos F_s y R_2 (Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015; Maside et al., en revisión) que evidencian un exceso de haplotipos y de singletons, respectivamente, en la población del parásito. Estas observaciones sugieren que *N. ceranae* se ha expandido recientemente en este hospedador, tal como indican los estudios epidemiológicos (Klee et al., 2007; Chen et al., 2008; Teixeira et al., 2013; Traver and Fell, 2014). Es interesante señalar que la distribución de frecuencias de estas variantes en los aislados de *A. cerana* y *A. florea* demuestran un patrón cercano al equilibrio (D_s , F_s y R_2 no significativos; Gómez-Moracho et al., 2015), lo que se podría interpretar como indicativo de que las poblaciones de *N. ceranae* en estas abejas asiáticas tienen un origen más antiguo. Teniendo en cuenta que en Asia conviven hasta nueve especies de abejas (Arias and Sheppard, 2005), cuatro de ellas reconocidas como hospedadoras de *N. ceranae* (*A. dorsata*, *A. florea*, *A. cerana* y *A. kochevnikovi*; Chaimanee et al., 2010, 2011; Suwannapong et al., 2011; Botías et al., 2012a), y considerando la capacidad de este microsporidio para infectar a diversas especies del género *Bombus* (Plischuk et al., 2009; Li et al., 2012; Graystock et al., 2013; Gamboa et al., 2015), la identificación del reservorio original de la población de *N. ceranae* que ahora parasita *A. mellifera* requiere un análisis genético más amplio, que incluya nuevas poblaciones de este microsporidio en *A. cerana* y otros himenópteros del SE asiático.

Diversidad genética y virulencia en *N. ceranae*

La homogeneidad genética de la población de *N. ceranae* es difícil de conciliar con los distintos niveles de patogenicidad observados en las colonias de *A. mellifera* en condiciones naturales (Bacandritsos et al., 2010; Bromenshenk et al., 2010; Higes et al., 2008a; Nabian et al., 2011; Soroker et al., 2011; Villa et al., 2013; frente a Cox-Foster et al., 2007; vanEngelsdorp et al., 2009; Genersch, 2010; Gisder et al., 2010; Dainat et al., 2012a). Para investigar la causa de estas diferencias, realizamos un análisis comparado de dos aislados de *N. ceranae* – uno de Holanda y otro de España, supuestamente más virulento –, a nivel genético y en términos de infectividad y mortalidad (Van der Zee et al., 2014). Los patrones de diversidad del locus *PTP3* sugieren que los dos aislados son una población panmíctica, ya que no existen diferencias genéticas significativas, si bien aparece alguna mutación puntual característica de Holanda, que podría insinuar una diferenciación incipiente del patógeno. Dussaubat et al. (2013b) tampoco encontraron diferenciación genética en otros dos aislados de *N. ceranae* (Francia y España) tras el análisis de una región del *ADNr* (*IGS + SSU*). Cabe señalar que tanto en nuestro estudio como en el de Dussaubat et al. (2013b) solo analizamos una pequeña porción del genoma, por lo que no se puede descartar que existan otros marcadores cuya variabilidad pueda determinar distintos niveles de patogenicidad. Sin embargo, también demostramos que, a diferencia de lo observado en condiciones naturales, las dos cepas utilizadas no difieren entre sí en su efecto patogénico sobre *A. mellifera*, lo que también coincide con el estudio desarrollado por Dussaubat et al. (2013b). La explicación de la diferente patogenicidad del parásito en condiciones naturales requiere por tanto de otra explicación. Una posibilidad es el diferente manejo de las colonias entre el norte y el sur de Europa, como p. ej. el reemplazo de la reina de la colmena, que es poco practicado en España y frecuente en el norte de Europa. De hecho, un estudio reciente sugiere que esta práctica ralentiza el colapso de las colonias parasitadas por *N. ceranae* ya que al proveer una reina joven y por tanto con mayor potencial reproductivo, la población adulta de la colonia se compensa con nueva cría y se reduce la proporción de abejas infectadas hasta un nivel que permite a la colonia sobreponerse a la infección (Botías et al., 2012b). En segundo lugar, el hecho de que en Holanda las colmenas suelen enjambrar dos veces al año, al contrario que España, también podría reducir los efectos negativos de la nosemosis tipo C. Y otra posibilidad es que las subespecies de *A. mellifera* puedan presentar diferente susceptibilidad frente a *N. ceranae*. Esto podría explicar por qué en España y Holanda, donde se manejan diferentes subespecies de abejas – *A. mellifera iberiensis* y *A. mellifera mellifera*, respectivamente – *N. ceranae* tenga un efecto más o menos agresivo sobre las colonias. En

España, donde conviven los linajes A y M de *A. mellifera iberiensis* (Cánovas et al., 2008), *N. ceranae* se encuentra en una prevalencia similar en ambos, lo que indica que no presenta una “preferencia” por infectar a una especie u otra (Jara et al., 2012). Si bien Fontbonne et al., (2013) señalaron que las colonias de abejas pertenecientes a un mismo linaje pueden responder de forma muy diferente a la infección por *N. ceranae*, y que esta diferencia está ligada a la variabilidad genética de cada colonia, en lugar de a su linaje. Esto es consistente con la hipótesis de que colonias con mayor variabilidad genética son más eficaces a la hora de contrarrestar las infecciones por parásitos, estando favorecidas aquellas cuya abeja reina se aparea con un mayor número de machos y da lugar a una descendencia genéticamente más variable (Bourgeois et al., 2012).

En este sentido, es importante destacar la posibilidad de aparición cada vez más frecuente de colonias de *A. mellifera* más tolerantes a *N. ceranae* y por lo tanto más competitivas (Huang et al., 2012). Por ejemplo, en Dinamarca, donde durante años los apicultores han seleccionado colonias con bajos niveles de parasitación por *N. ceranae*, comprobaron que los zánganos que descienden de estas colonias muestran una menor tasa de mortalidad frente a la infección por este patógeno que aquellos que descienden de colonias sin seleccionar (Huang et al., 2012), lo que indicaría cierta ventaja adaptativa de los primeros. Igualmente, este tipo de selección puede estar ocurriendo de manera natural, ya que con el paso de los años cabría esperar una adaptación de las poblaciones de *A. mellifera* al parásito.

Recombinación genética en *N. ceranae*

La mutación es la principal fuente de variación genética en *N. ceranae*. Sin embargo, otros procesos como la recombinación genética contribuyen significativamente a la generación de nuevos haplotipos mediante elbarajado de las variantes nucleotídicas. Nuestros datos de polimorfismo en *PTP2*, *PTP3* o *RPB1* (Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015; Maside et al., en revisión) sugieren la concurrencia de este tipo de sucesos en varios genes de copia única, en coincidencia con las primeras evidencias de intercambio genético obtenidas en este microsporidio por Sagastume et al., (2011) en la región *IGS+SSU* del *ADNr*. Sin embargo, dada la heterogeneidad de las muestras de ADN de partida en estos ensayos, cabe la posibilidad de que estas secuencias recombinantes fuesen artefactos experimentales generadas *in vitro* durante la amplificación y posterior clonación de las moléculas de ADN (Meyerhans et al., 1990; Lahr and Katz, 2009). La técnica de amplificación de genomas individuales (SGA) se basa en la amplificación a partir de una única molécula molde, limitando así la posibilidad de formación de

haplotipos recombinantes de origen artefactual (Palmer et al., 2005; Salazar-Gonzalez et al., 2007, 2008; Liu et al., 2010). Su aplicación en aislados de *N. ceranae* produjo evidencias estadísticamente significativas de reducidas tasas de recombinación en el gen *PTP2*. Nuestros resultados suponen la primera evidencia de que aunque sea un suceso excepcional, es probable que exista recombinación en *N. ceranae* (Gómez-Moracho et al., 2014a).

Ante estas evidencias cabe preguntarse cómo y cuándo tiene lugar la recombinación en *Nosema*. El intercambio de material genético se puede producir mediante distintos mecanismos como la recombinación meiótica, la recombinación mitótica o la conversión génica. A nivel molecular todos ellos se desencadenan durante la reparación de roturas de la doble cadena de ADN, ya sea durante la meiosis, la mitosis o en fases distintas de la división celular (Chen et al., 2007). Según el modelo más aceptado, la reparación de la rotura de doble cadena requiere del uso de otra molécula de secuencia homóloga (ya sea en cromátidas hermanas, cromosomas homólogos, en otros cromosomas o en otros lugares del mismo cromosoma) como patrón para la síntesis del fragmento interrumpido. En este proceso cada una de las cadenas de la molécula rota se restaura utilizando como molde las de la molécula intacta. Es en este momento cuando las variantes en la molécula molde pueden ser copiadas en la que es reparada, proceso conocido como conversión génica. Adicionalmente, el desenlace de las estructuras secundarias formadas durante la reparación, conocidas como estructuras de Holliday, puede implicar el intercambio de fragmentos cromosómicos entre las cromátidas, fenómeno conocido como entrecruzamiento (**Figura 13**). En cualquier caso, y teniendo en cuenta que tratamos de secuencias de copia única en el genoma de *N. ceranae*, estos procesos sólo serían posibles si en algún momento del ciclo de estos microsporidios existiera comunicación entre sus dos núcleos haploides (Sagastume et al., 2011; Cuomo et al., 2012). Pero actualmente no existe ninguna observación citológica a favor de la comunicación entre distintos núcleos de *N. ceranae* (Fries et al., 1996; Higes et al., 2007; Roudel et al., 2013). De hecho, las crecientes evidencias de recombinación inspiraron la hipótesis de la existencia de una fase sexual críptica en microsporidios en apariencia totalmente asexuales, como *Nosema granulosis* (Ironsides, 2013) o *Nosema bombycis* (Ironsides, 2013; Krebs et al., 2014). Posibilidad que se vio reafirmada por la presencia de copias potencialmente activas de varios genes relacionados con la reproducción sexual (*TPT*, *HMG* o *ARN helicasa*, Lee et al., 2010) o involucrados en procesos meióticos como el *DMC1*, implicado en la cohesión y recombinación de cromosomas homólogos (Cuomo et al., 2012), en los genomas de estos microsporidios.

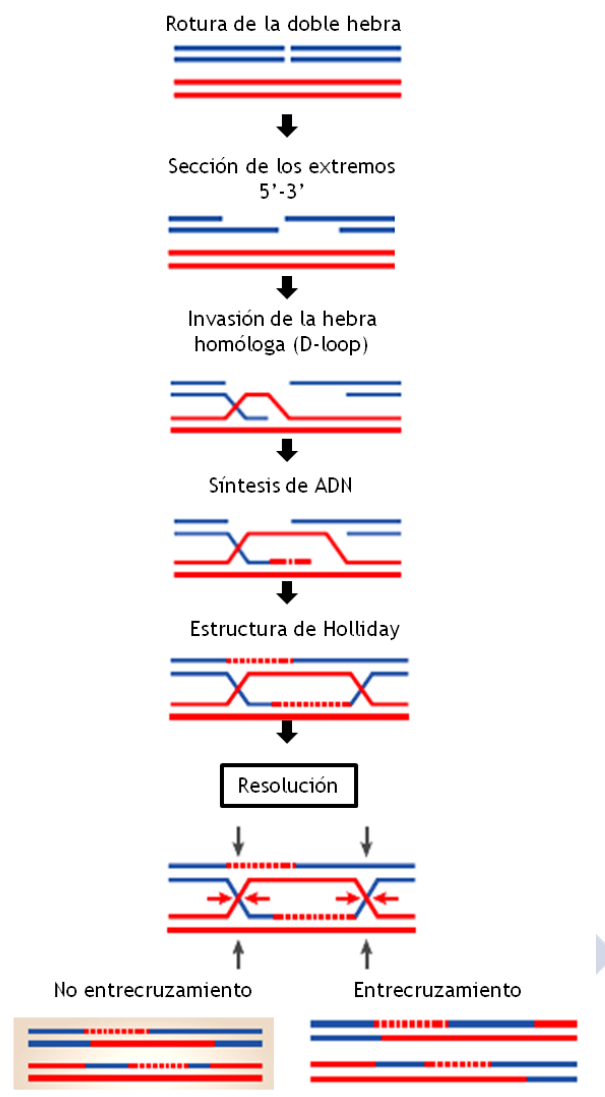


Figura 13. Resolución de las uniones de Holliday. Tras la rotura de una doble hebra, esta invade la secuencia homóloga y se copia a partir de ella, formando las estructuras de Holliday. La resolución de estas puede generar entrecruzamiento, si se resuelve siguiendo la flecha roja en una de las uniones, y una negra en la otra unión. Figura basada en Chen et al., (2007).

La posibilidad de una fase sexual en el ciclo de *Nosema* contrasta con la reciente propuesta de que este microsporidio se desarrolla de forma exclusivamente clonal (Pelin et al., 2015). Sin embargo, asumiendo un ciclo asexual puro, con el paso de las generaciones la acumulación de mutaciones conduciría hacia una diferenciación creciente entre los dos núcleos de cada célula, y entre distintos linajes del parásito. Esta expectativa no se corresponde con los moderados

niveles de variación observados entre las secuencias de *N. ceranae*, que rondan el 1%, lo que resta credibilidad a esta hipótesis.

Es preciso señalar que la recombinación genética no es consecuencia exclusivamente de un ciclo de reproducción sexual (Villeneuve and Hillers, 2001; Schurko et al., 2009; Ironside, 2013; Krebs et al., 2014) sino que también puede producirse durante la mitosis (LaFave and Sekelsky, 2009) y, por tanto, ocurrir en organismos asexuales (Chen et al., 2007). Sin embargo, esta solo generaría nuevas variantes si los dos núcleos (haploides) de *N. ceranae* fueran genéticamente distintos.

Dado que la tasa a la que aparecen estos eventos de recombinación es muy baja, es posible que en el ciclo vital de *Nosema* se alterne un modo de evolución clonal junto con sucesos puntuales de recombinación. Esta combinación ha sido considerada potencialmente ventajosa para muchos patógenos ya que permitiría estabilizar asociaciones entre variantes favorables (Tibayrenc and Ayala, 2012). Se sospecha que otros microsporidios, como *Encephalitozoon cuniculi*, pueden actuar como organismos sexuales oportunistas, de forma que aún teniendo un modo de reproducción clonal, bajo determinadas circunstancias podrían activar mecanismos de recombinación para acelerar la formación nuevas variantes alélicas (Selman et al., 2013). Estos autores plantearon que este intercambio genético ocurriría bien mediante recombinación mitótica, o a través de un ciclo poliploide asexual con la alternancia entre diferentes niveles de ploidía (p.ej. $2N - 4N - 2N$) mediante procesos de endomitosis, es decir, replicación sin división celular y posterior reducción mediante divisiones celulares, lo que sería equivalente a una fase sexual sin necesidad de fusión de gametos (Selman et al., 2013). En cualquier caso, nuevamente nos encontramos con el requisito del contacto físico entre dos cromosomas homólogos en un organismo hipotéticamente haploide. La única referencia reciente a la posibilidad de que los núcleos de *N. ceranae* sean diploides se inspira en la necesidad de explicar la consistente observación de diversidad genética en todos los aislados del parásito (Pelin et al., 2015), que los autores interpretan como evidencia de tetraploidía de los merontes, pero sin aportar evidencia directa alguna de esta elevada ploidía. Esta incertidumbre pone de relieve la necesidad de profundizar en el estudio del ciclo biológico de este parásito antes de pretender encontrar una respuesta definitiva al cuándo y cómo de la recombinación genética en este organismo.

Nosema apis

N. apis y *N. ceranae* difieren en muchos aspectos de su epidemiología y patogenicidad sobre *A. mellifera*, y parte de la explicación de estas diferencias probablemente reside en sus genes. La

divergencia neutra (d_s) entre *N. apis* y *N. ceranae* es $3,48 \pm 0,224$ ($d_s \pm SD$; estimada a partir de secuencias de 10 loci de Roudel et al. 2013 y nuestros propios datos, usando el método de Yang and Nielsen, 2000; con la ayuda del programa PAML v4.6; Yang, 2007). Asumiendo que la tasa de mutación es constante a lo largo del tiempo, las diferencias entre dos secuencias se pueden utilizar a modo de reloj molecular para estimar el tiempo transcurrido desde su separación, a partir de la expresión $d = 2T\mu$, donde d , T y μ son la divergencia genética observada, el tiempo desde su separación, y la tasa de mutación por generación, respectivamente (Kimura, 1968). En ausencia de estimas de la tasa de mutación en *Nosema* contamos con las obtenidas en otros hongos unicelulares: $7,2 \times 10^{-11}$ mutaciones por ronda de replicación en *Neurospora crassa* y $2,2 \times 10^{-10}$ en *Saccharomyces cerevisiae* (Drake et al., 1998). Podemos así estimar que para alcanzar un nivel de divergencia como el observado entre *N. apis* y *N. ceranae* debieron haber tenido lugar entre $8,0 \times 10^9$ y $2,4 \times 10^{10}$ rondas de replicación. Teniendo en cuenta que en condiciones naturales el número de esporas de *Nosema bombycis* se duplica aproximadamente cada 24 horas, lo que equivale a unas 365 divisiones anuales (Singh et al., 2005), podemos estimar que la separación de ambas especies ocurrió hace entre 21,8 y 66,6 millones de años. Existen razones para tomar esta estima con cautela. Por ejemplo, la saturación de mutaciones entre *N. ceranae* y *N. apis* (estimaciones de divergencia neutra superiores a la unidad) dificulta el cálculo preciso de la divergencia, que podría ser fácilmente infraestimada. Además, los microsporidios son eucariotas peculiares por lo que es posible que su tasa de mutación no sea equiparable a la de otros protozoos (aunque cabe esperar que se encuentre dentro del rango utilizado). Pero aún con la cautela necesaria, es evidente que estas dos especies divergieron hace mucho tiempo y por lo tanto no es de extrañar que los efectos que provocan en *A. mellifera* sean distintos. Si bien apenas se han analizado algunos pocos genes que pueden tener relación con su virulencia (p.ej. *PTP*) (Hatjina et al., 2011; Gómez-Moracho et al., 2015; Maside et al., en revisión), probablemente estos no sean los únicos, quedando abierta la puerta a la exploración del genoma de estos microsporidios en busca de marcadores alternativos que permitan ampliar el conocimiento sobre las bases que sustentan su diferente patogenicidad sobre *A. mellifera*.

Aunque *N. apis* y *N. ceranae* presentan niveles de diversidad genética muy semejantes (del orden del 1% en lugares sinónimos) que podrían sugerir una historia demográfica similar, existen notables variaciones en su estructura poblacional (Maside et al., en revisión). En primer lugar, la población mundial de *N. ceranae* es panmíctica y la de *N. apis* demuestra una estructuración significativa, ligada en cierta medida a las poblaciones (linajes) de las abejas que parasitan. Así, se distinguen dos subpoblaciones del patógeno, una presente en las abejas europeas (linajes C y

M) y otra en las africanas (linaje A; Tabla 6 en Maside et al., en revisión). Es de destacar que esta estructura no coincide con la de las abejas ya que los linajes de *A. mellifera* europeos (C y M), que son los más divergentes, albergan poblaciones indistinguibles de *N. apis* (Tabla 6 en Maside et al., en revisión). Esto sugiere que la parasitación es mucho más reciente que la separación de estos linajes de abejas, que tuvo lugar hace entre 0,3 y 1 millones de años (Walberg et al., 2014). Dado que la divergencia neta promedio en los loci *PTP2*, *PTP3* y *RPB1* entre los parásitos de aislados de colonias africanas (linaje A) y europeas (linajes C y M) es de 0,002, aplicando el mismo razonamiento que antes, estimamos que su separación data de hace entre 13.000 y 38.000 años, lo que sugiere que los parásitos europeos y africanos se separaron durante el último período glacial cuyo máximo fue hace unos 20.000 años. Esto ilustra cómo a pesar de haber estado marcadas por los mismos acontecimientos climatológicos, las historias demográficas de especies con un estrecho vínculo biológico pueden ser muy distintas.

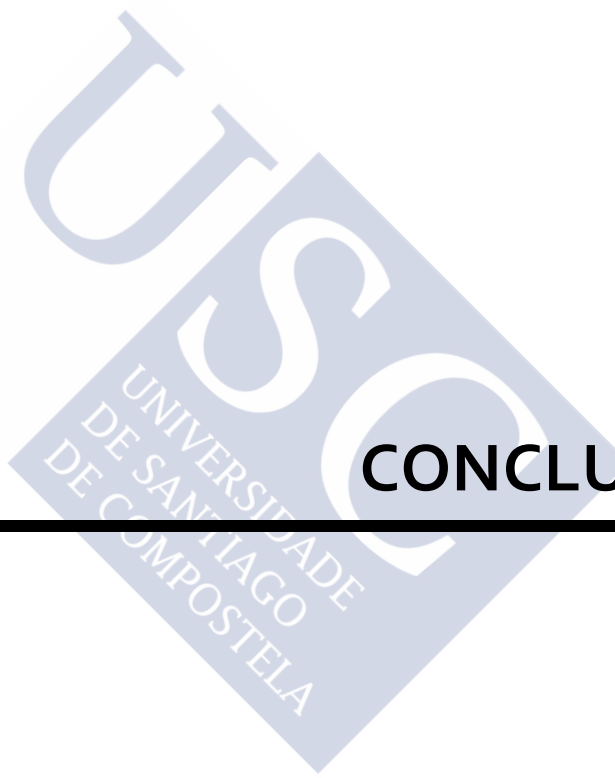
En segundo lugar, la población de *N. ceranae* muestra signos de expansión (Roudel et al., 2013; Gómez-Moracho et al., 2014b, 2015; Maside et al., en revisión), probablemente como consecuencia de su salto reciente a su nuevo hospedador. Estos signos son mucho más leves en *N. apis* y están más probablemente asociados a la expansión de *A. mellifera* en todo el mundo (FAOSTAT, 2015).

A partir de los resultados obtenidos en estos trabajos comprobamos que, aunque *A. mellifera* puede ser parasitada tanto por *N. apis* como por *N. ceranae*, la historia evolutiva de cada uno de estos patógenos es muy distinta, hecho que se explica por la antigüedad del primero en esta especie de abejas frente a la colonización reciente del segundo. La globalización del mercado y la importación de los productos apícolas como la miel o el polen (Klee et al., 2007; Higes et al., 2008b), o el transporte de reinas (Giersch et al., 2009) probablemente facilitaron la llegada y diseminación de *N. ceranae* en todo el mundo, lo que impide encontrar una huella genética que indique su ruta de diseminación, y apunta a una llegada prácticamente al mismo tiempo a casi todos los continentes, probablemente a partir de la misma población del parásito.

Dado que la infección de una abeja por *Nosema* puede ocurrir en diferentes momentos y a partir de diferentes focos de infección (contacto con otra abeja, polen, agua...) es razonable que diferentes variantes genéticas de estos patógenos coincidan en la misma, lo que en efecto provoca que el estudio de cada uno de estos insectos nos lleve a encontrar una población heterogénea del parásito (Gómez-Moracho et al., 2015).

N. ceranae y *N. apis* comparten algunos aspectos como su nivel de polimorfismo sinónimo o la existencia de recombinación entre sus secuencias genéticas. Sin embargo, estas características quedan sujetas a algunos aspectos de la biología de estos patógenos todavía sin resolver como la ploidía de sus núcleos (Pelin et al., 2015). El principal inconveniente para abordar esta cuestión reside en que el análisis de estos microsporidios se realiza a partir de muestras que incluyen el material genético de diferentes individuos, e incluso de diferentes estadios celulares que se encuentran en el tracto digestivo de la abeja que, a la hora de explicar su variabilidad genética, puede conducir a interpretaciones contradictorias (Sagastume et al., 2011; Gómez-Moracho et al., 2015; Pelin et al., 2015). Esto sugiere la necesidad de buscar herramientas que permitan conocer el polimorfismo genético de estos patógenos a nivel individual (p.ej. una espora), aplicando técnicas para el aislamiento de células como la de citometría de flujo (Pelin et al., 2015) o la microdissección (O'Mahony et al., 2007). Esto proporcionaría una visión más clara de la composición genética del diplocarion de *Nosema* spp. (diploide o tetraploide) a través del estudio de las posibles diferencias entre los genomas que alberga cada individuo. Por otro lado, el cultivo celular de *N. ceranae* y *N. apis* (Gisder et al., 2011; Gisder and Genersch, 2015) aportaría una mejora sustancial en el conocimiento de la biología molecular de estos patógenos. La obtención de cepas puras permitiría estudiar la base genética de su patogenicidad e incluso hacer experimentos de genética clásica para investigar los mecanismos de reproducción. Además, la combinación de estos cultivos con las técnicas de aislamiento celular comentadas sería clave para aclarar el contenido genético de sus fases celulares y comprobar si la ploidía del diplocarion de estos microsporidios varía a lo largo de su ciclo biológico.





CONCLUSIONES



1. *N. ceranae* y *N. apis* presentan niveles significativos de diversidad genética dentro de las colonias de abejas que parasitan. Asumiendo que *Nosema* es un diplocarionte con dos núcleos haploides, esta diversidad es indicativa de que las poblaciones del parásito están constituidas por individuos genéticamente distintos. Aunque se ha sugerido la posibilidad de que los núcleos de *Nosema* sean diploides, la presencia de cinco haplotipos en alguna de las muestras sigue exigiendo la existencia de diversidad genética entre individuos.
2. La estructura genética de *N. ceranae* y los patrones de diversidad nucleotídica y haplotípica son consistentes con una expansión reciente de este patógeno en las poblaciones de *A. mellifera* de todo el mundo. Aunque no fue posible determinar con absoluta certeza el origen de la población fundadora, nuestros datos son consistentes con la hipótesis de que reside en el SE de Asia, ya sea parasitando *A. cerana* u otros himenópteros.
3. No se encontraron evidencias de asociación entre la variación genética de las poblaciones del parásito y los niveles de patogenicidad. Esto sugiere que la variación de este carácter debería atribuirse a otras causas como mutaciones en otros genes distintos a los estudiados, factores ambientales, manejo de las colmenas o características subyacentes del hospedador.
4. El análisis de SGA produjo evidencias de recombinación en el gen *PTP2* de *N. ceranae*. Esto sugiere la existencia de intercambio genético entre cromosomas. Aunque es posible la recombinación en organismos asexuales, el descubrimiento de genes propios de la meiosis potencialmente activos en el genoma de *N. ceranae* es consistente con la existencia de una fase sexual críptica en el ciclo vital de este parásito.
5. La población de *N. apis* presenta niveles significativos de estructuración. La falta de correspondencia entre la estructura genética de las poblaciones del parásito y su hospedador nos permite datar el origen de esta relación después del último máximo glacial en Europa, hace unos 20.000 años. Es por tanto probable que la relación entre *A. mellifera* y *N. apis* sea más antigua que la existente entre la abeja y *N. ceranae*.





BIBLIOGRAFÍA



- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M. a, Andersen, R. a, Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R. a, Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L. a, Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T. a, Shearer, C. a, Smirnov, A. V, Spiegel, F.W., Taylor, M.F.J.R., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399–451.
- Aizen, M.A., Harder, L.D., 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.* 19, 915–918.
- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782.
- Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Le Conte, Y., 2011. Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 106, 380–385.
- Aliouane, Y., El Hassani, A.K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., Gauthier, M., 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 113–122.
- Amdam, G. V, Page, R.E., 2010. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. *Anim. Behav.* 79, 973–980.
- Anderson, D., East, I.J., 2008. The latest buzz about colony collapse disorder. *Science.* 319, 724–725.
- Anderson, D.L., Giacón, H., 1992. Reduced Pollen Collection by Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies Infected with *Nosema apis* and Sacbrood Virus. *J. Econ. Entomol.* 85, 47–51.
- 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). *Environ. Microbiol.* 11, 2284–2290.
- Ares, a M., Nozal, M.J., Bernal, J.L., Martín-Hernández, R., M Higes, 2012. Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee

- hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 899, 146–153.
- Arias, M.C., Sheppard, W.S., 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. Mol. Phylogenet. Evol. 5, 557–566.
- Arias, M.C., Sheppard, W.S., 2005. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera:Apinae:Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. Mol. Phylogenet. Evol. 37, 25–35.
- Aronstein, K. a, Murray, K.D., 2010. Chalkbrood disease in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 103, S20–S29.
- Aydin, L., Gulegen, E., Cakmak, I., Girisgin, A.O., Wells, H., 2006. Relation between *Nosema* and chalkbrood diseases, and its implication for an Apiary Management Model. Bull. Vet. Inst. Puławy 471–475.
- Bacandritsos, N., Granato, A., Budge, G., Papanastasiou, I., Roinioti, E., Caldon, M., Falcaro, C., Gallina, A., Mutinelli, F., 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. J. Invertebr. Pathol. 105, 335–340.
- Bailey, L., 1955. The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). Parasitology 45, 86–94.
- Bailey, L., 1981. Honey bee pathology. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Bekele, A.Z., Mor, S.K., Phelps, N.B.D., Goyal, S.M., Armien, A.G., 2015. A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. Vet. Q. 35, 48–50.
- Bernal, J., Garrido-Bailón, E., Del Nozal, M.J., González-Porto, a. V., Martín-Hernández, R., Diego, J.C., Jiménez, J.J., Bernal, J.L., Higes, M., 2010. Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. J. Econ. Entomol. 103, 1964–1971.
- Bernal, J., Martin-Hernandez, R., Diego, J.C., Nozal, M.J., Gozalez-Porto, A. V, Bernal, J.L., Higes, M., 2011. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. Pest Manag. Sci. 67, 1320–1331.

- Berthoud, H., Imdorf, A., Haueter, M., Radloff, S., Neumann, P., 2010. Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). J. Apic. Res. 49, 60–65.
- Betti, M.I., Wahl, L.M., Zamir, M., 2014. Effects of infection on honey bee population dynamics: a model. PLoS One 9, e110237.
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. Science 313, 351–354.
- Bigliardi, E., 2001. Microsporidia, enigmatic parasites. Ital. J. Zool. 68, 263–271.
- Bigliardi, E., Riparbelli, M.G., Selmi, M.G., Bini, L., Lliberatori, S., Pallini, V., Bernuzzi, A., Gatti, S., Scaglia, M., Sacchi, L., 1999. Evidence of actin in the cytoskeleton of microsporidia. J. Eukaryot. Microbiol. 46, 410–415.
- Bigliardi, E., Sacchi, L., 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes Infect. 3, 373–379.
- Bigliardi, E., Selmi, M.G., Lupetti, P., Corona, S., Gatti, S., Scaglia, M., Sacchi, L., 1996. Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. J. Eukaryot. Microbiol. 43, 181–186.
- Blacquière, T., Smaghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. Ecotoxicology 21, 973–992.
- Bollan, K. a, Hothersall, J.D., Moffat, C., Durkacz, J., Saranzewa, N., Wright, G. a, Raine, N.E., Hight, F., Connolly, C.N., 2013. The microsporidian parasites *Nosema ceranae* and *Nosema apis* are widespread in honeybee (*Apis mellifera*) colonies across Scotland. Parasitol. Res. 112, 751–9.
- Borneck, R., Viry, A., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2010. Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. J. Apic. Res. Bee World 49, 334–336.
- Botías, C., 2013. Patrón epidemiológico y nuevos metodos de control de las nosemosis en *Apis mellifera* L. en España. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria.

- Botías, C., Anderson, D.L., Meana, A., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2012a. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 110, 108–113.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., Higes, M., 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet. Res.* 44, 25.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Días, J., García-Palencia, P., Matabuena, M., Juarranz, A., Barrios, L., Meana, A., Nanetti, A., Higes, M., 2012b. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ. Microbiol.* 14, 845–859.
- Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., Sylvester, H.A., Holloway, B., Oldroyd, B.P., 2012. Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects. *Apidologie* 43, 539–548.
- Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, C.H., Stanford, M.F., Zulich, A.W., Jabbour, R.E., Deshpande, S. V, McCubbin, P.E., Seccomb, R. a, Welch, P.M., Williams, T., Firth, D.R., Skowronski, E., Lehmann, M.M., Bilimoria, S.L., Gress, J., Wanner, K.W., Cramer, R. a, 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* 5, e13181.
- Brown, J.R., Doolittle, W.F., 1995. Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2441–2445.
- Calderón, R.A., Sanchez, L., Yáñez, O., Fallas, N., 2008. Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honey bee colonies in Costa Rica. *J. Apic. Res.* 47, 328–329.
- Canning, E.U., Curry, A., Cheney, S., Lafranchi-Tristem, N.J., Haque, M.A., 1999. *Vairimorpha imperfecta* n.sp., a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Parasitology* 119, 273–286.
- Cánovas, F., De La Rúa, P., Serrano, J., Galián, J., 2008. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 46, 24–30.
- Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., Gabaldón, T., 2012. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol.* 10, 47.

- Carreck, N., Williams, I., 1998. The economic value of bees in the UK. *Bee World*, *Bee World* 79, 115–123.
- Carreck, N.L., Ratnieks, F.L.W., 2014. The dose makes the poison: have “field realistic” rates of exposure of bees to neonicotinoid insecticides been overestimated in laboratory studies? *J. Apic. Res.* 53, 607–614.
- Cavalier-Smith, T., 1983. A six-kingdom classification and a unified phylogeny, in: HEA Schenk, W.S. (Ed.), *Endocytobiology II: Intracellular Space as Oligogenetic*. Berlin: de Gruyter, pp. 1027–1034.
- Cepero, A., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Gómez-Moracho, T., Martínez-Salvador, A., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., Higes, M., 2014a. Is *Acarapis woodi* a single species? A new PCR protocol to evaluate its prevalence. *Parasitol. Res.* 114, 651–658.
- Cepero, A., Ravoet, J., Gómez-Moracho, T., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., González-Porto, A. V, de Graaf, D.C., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2014b. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Res. Notes* 7, 649.
- Chaimanee, V., Chen, Y.-P.Y., Pettis, J.S., Scott Cornman, R., Chantawannakul, P., 2011. Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *J. Invertebr. Pathol.* 107, 229–233.
- Chaimanee, V., Warrit, N., Chantawannakul, P., 2010. Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 207–10.
- Charlesworth, B., Morgan, M.T., Charlesworth, D., 1993. The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics* 134, 1289–1303.
- Charlesworth, B., Charlesworth, D., 2010. *Elements of evolutionary genetics*. Roberts & Company Publishers, Greenwood Village, Colorado - USA.
- Chauzat, M., Faucon, J., Martel, A., 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entom.* 99, 253–262.
- Chauzat, M.-P., Martel, A.-C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J.-P., 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis*

- mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. Environ. Toxicol. Chem. 30, 103–111.
- Chen, J.-M., Cooper, D.N., Chuzhanova, N., Férec, C., Patrinos, G.P., 2007. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. Nat. Rev. Genet. 8, 762–775.
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J. Invertebr. Pathol. 97, 186–188.
- Chen, Y., Pettis, J.S., Zhao, Y., Liu, X., Tallon, L.J., Sadzewicz, L.D., Li, R., Zheng, H., Huang, S., Zhang, X., Hamilton, M.C., Pernal, S.F., Melathopoulos, A.P., Yan, X., Evans, J.D., 2013. Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. BMC Genomics 14, 451.
- Chen, Y.P., Evans, J.D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., Pettis, J.S., 2009. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. J. Eukaryot. Microbiol. 56, 142–147.
- Chen, Y.P., Huang, Z.Y., 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. Apidologie 41, 364–374.
- Chevin, A., Schurr, F., Blanchard, P., Thiéry, R., and Ribière, M. (2012) Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): Infectivity of naked CBPV RNAs. *Virus Res.* 167: 173–178.
- Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., Evans, J.D., 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. PLoS Pathog. 5, e1000466.
- Cornman, R.S., Tarpy, D.R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J.S., VanEngelsdorp, D., Evans, J.D., 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. PLoS One 7, e43562.
- Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., Robinson, G.E., 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 7128–7133.

- Corradi, N., Keeling, P.J., 2009. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biol. Rev.* 23, 1–8.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N. a, Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., VanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283–287.
- Crane, E., 1999. *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*. Gerald Duckworth & Co. Ltd, London.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P., 2007. Social Immunity. *Curr. Biol.* 17, R693-R702
- Cresswell, J., Thompson, H., 2012. Comment on “A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees.” *Science*. 337.1453.
- Cresswell, J.E., 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20, 149–157.
- Cuomo, C.A., Desjardins, C.A., Bakowski, M.A., Goldberg, J., Ma, A.T., Becnel, J.J., Didier, E.S., Fan, L., Heiman, D.I., Levin, J.Z., Young, S., Zeng, Q., Troemel, E.R., 2012. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *Genome Res.* 22, 2478–2488.
- Curgy, J.J., Vavra, J., Vivares, C., 1980. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol. Cell.* 38, 49–51.
- Cutler, C.G., Scott-Dupree, C.D., 2014. A field study examining the effects of exposure to neonicotinoid seed-treated corn on commercial bumble bee colonies. *Ecotoxicology* 23, 1755–1763.
- Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D., 2007. Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. *J. Econ. Entomol.* 100, 765–772.
- Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D., Drexler, D.M., 2014. Honey bees, neonicotinoids and bee incident reports: the Canadian situation. *Pest Manag. Sci.* 70, 779–783.

- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012a. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 981–987.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012b. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One* 7, e32151.
- De Graaf, D.C., Raes, H., Sabbe, G., De Rycke, P.H., Jacobs, F.J., 1994. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the Midgut Epithelium of the Honeybee (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 63, 74–81.
- De Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G., 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl, S30–47.
- De Miranda, J.R., Genersch, E., 2010. Deformed wing virus. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl , S48–61.
- De Rijk, P., Gatehouse, H.S., De Wachter, R., 1998. The secondary structure of *Nosema apis* large subunit ribosomal RNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1442, 326–328.
- Decourtye, A., Armengaud, C., Renou, M., Devillers, J., Cluzeau, S., Gauthier, M., Pham-Delègue, M.-H., 2004a. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 78, 83–92.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham-Delègue, M.-H., 2004b. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 410–419.
- Delaplane, K.S. and Mayer, D.F. (2000) *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing, New York.
- Delbac, F., Peuvrel, I., Metenier, G., Peyretailade, E., Vivares, C.P., 2001. Microsporidian invasion apparatus: Identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of ptp1 and ptp2 genes in three Encephalitozoon species. *Infect. Immun.* 69, 1016–1024.
- Delbac, F., Peyret, P., Méténier, G., David, D., Danchin, A., Vivarès, C.P., 1998. On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Microbiol.* 29, 825–34.

- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.-L., Alaux, C., 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* 8, e72016.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F., Evans, J.D., Chen, Y., 2011. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* 92, 151–155.
- Dively, G.P., Embrey, M.S., Kamel, A., Hawthorne, D.J., Pettis, J.S., 2015. Assessment of Chronic Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Health. *PLoS One* 10, e0118748.
- Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., Crow, J.F., 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genet. Soc. Am.* 148, 1667–1686.
- Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.-H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., Moritz, R.F. a, Le Conte, Y., Alaux, C., 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7, e37017.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.-L., Plettner, E., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Chem. Ecol.* 36, 522–525.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., 2013a. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 42–51.
- Dussaubat, C., Sagastume, S., Gómez-Moracho, T., Botías, C., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Le Conte, Y., Higes, M., 2013b. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Vet. Microbiol.* 162, 670–678.
- Edlind, T.D., Li, J., Visvesvara, G.S., Vodkin, M.H., McLaughlin, G.L., Katiyar, S.K., 1996. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from mitochondrial protozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 359–367.

- Eickbush, T.H., Eickbush, D.G., 2007. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175, 477–485.
- El Hassani, A.K., Dacher, M., Gauthier, M., Armengaud, C., 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 30–39.
- Engel, M.S., 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera Apidae *Apis*). *J. Hymenopt. Res.* 8, 165–196.
- Evans, J.D., Schwarz, R.S., 2011. Bees brought to their knees: Microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.*
- Evans, J.D., Spivak, M., 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl, S62–72.
- Fast, N., 1999. Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from *Nosema locustae*: evidence for a microsporidia-fungi relationship and spliceosomal. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1415–1419.
- Faucon, J.-P., Aurières, C., Drajnudel, P., Mathieu, L., Ribière, M., Martel, A.-C., Zeggane, S., Chauzat, M.-P., Aubert, M.F.A., 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Manag. Sci.* 61, 111–125.
- Faucon, J.P., Mathieu, L., Ribiere, M., Martel, C.A., Drajnudel, P., Zeggane, S., Aurières, C., Aubert, M.F.A., 2002. Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee world* 83, 13–23.
- Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R., del Aguila, C., 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6886–6889.
- Fisher, F.M., Sanborn, R.C., 1962. Production of insect juvenile hormone by the Microsporidian parasite *Nosema*. *Nature* 194, 1193–1193.
- Fontbonne, R., Garnery, L., Vidau, C., Aufauvre, J., Texier, C., Tchamitchian, S., Alaoui, H. El, Brunet, J.L., Delbac, F., Biron, D.G., 2013. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infect. Genet. Evol.* 17, 188–194.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): FAOSTAT. 2015. <http://faostat3.fao.org/home/E>
- Forsgren, E., 2010. European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 55–59.
- Forsgren, E., Fries, I., 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.* 170, 212–217.
- Francis, R.M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2013. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 8, e57540.
- Fries, I., 1989. Observations on the development and transmission of *Nosema apis* Z. In the ventriculus of the honeybee - International Bee Research Association. *J. Apic. Res.* 28, 107–117.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103, s73–s79.
- Fries, I., Ekbohm, G., Villumstad, E., 1984. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *J. Apic. Res.* 23, 102–105.
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., S.B, 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). *Eur. J. Protistology* 32, 356–365.
- Fries, I., Granados, R., Morse, R.A., 1992. Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie* 23, 61–70.
- Fries, I., Martín, R., Meana, a, García-Palencia, P., Higes, M., 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *J. Apic. Res.* 47, 230–233.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810–821.
- Gamboa, V., Ravoet, J., Brunain, M., Smagghe, G., Meeus, I., Figueroa, J., Riaño, D., de Graaf, D.C., 2015. Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. *J. Invertebr. Pathol.* 129, 36–39.

- García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., González-Porto, A.-V., Marin, P., Meana, A., Higes, M., 2010. Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-workers honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* 49, 278-283.
- Garibaldi, L. a, Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M. a, Bommarco, R., Cunningham, S. a, Kremen, C., Carvalheiro, L.G., Harder, L.D., Afik, O., Bartomeus, I., Benjamin, F., Boreux, V., Cariveau, D., Chacoff, N.P., Dudenhöffer, J.H., Freitas, B.M., Ghazoul, J., Greenleaf, S., Hipólito, J., Holzschuh, A., Howlett, B., Isaacs, R., Javorek, S.K., Kennedy, C.M., Krewenka, K.M., Krishnan, S., Mandelik, Y., Mayfield, M.M., Motzke, I., Munyuli, T., Nault, B. a, Otieno, M., Petersen, J., Pisanty, G., Potts, S.G., Rader, R., Ricketts, T.H., Rundlöf, M., Seymour, C.L., Schüepp, C., Szentgyörgyi, H., Taki, H., Tscharrntke, T., Vergara, C.H., Viana, B.F., Wanger, T.C., Westphal, C., Williams, N., Klein, A.M., 2013. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339, 1608–1611.
- Garnery, L., Cournet, J.M., Solignac, M., 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analyses. *Mol. Ecol.* 1, 145–154.
- Garrido Bailón, E., 2012. Repercusión potencial en la cabaña apícola española de agentes nosógenos detectados en colonias de “*Apis mellifera iberiensis*.” Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid. 2012; 233 pp.
- Garrido-Bailón, E., Higes, M., Martínez-Salvador, A., Antúnez, K., Botías, C., Meana, A., Prieto, L., Martín-Hernández, R., 2013. The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microb. Biotechnol.* 6, 731–739.
- Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Bernal, J., Bernal, J.L., Martínez-Salvador, A., Barrios, L., Meana, A., Higes, M., 2010. Short communication . 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 J. Agric. Res. Agric. Res.* 8, 658–661.
- Gatehouse, H.S., Malone, L. a, 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 97–105.
- Genersch, E., 2010. Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 87-97

- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, 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(3), 332-352
- Germot, A., Philippe, H., Le Guyader, H., 1997. Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87, 159–168.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M., 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40, 117–123.
- Gilliam, M., Shimanuki, H., 1967. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 9, 387–389.
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Di Bernardo, A., Greatti, M., Giorio, C., Tapparo, A., 2009. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J. Econ. Entomol.* 102, 1808–1815.
- Gisder, S., Genersch, E., 2015. Identification of candidate agents active against *N. ceranae* infection in honey bees: establishment of a medium throughput screening assay based on *N. ceranae* infected cultured cells. *PLoS One* 10, e0117200.
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M.-C., Linde, A., Genersch, E., 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3032–3038.
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., Genersch, E., 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ. Microbiol.* 13, 404–413.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One* 8, e58165.
- Gómez-Moracho, T., Bartolomé, C., Bello, X., Martín-Hernández, R., Higes, M., Maside, X., 2015. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infect. Genet. Evol.* 31, 87-94.

- Gómez-Moracho, T., Bartolomé, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., Maside, X., 2014a. Evidence for weak genetic recombination at the *PTP2* locus of *Nosema ceranae*. *Environ. Microbiol.* 17(4), 1300-1309
- Gómez-Moracho, T., Maside, X., Martín-Hernández, R., Higes, M., Bartolomé, C., 2014b. High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. *Parasitology* 141, 475–481.
- Gray, F., Cali, A., Briggs, J., 1969. Intracellular stages in the life cycle of the microsporidian *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol.* 14, 391–394.
- Graystock, P., Yates, K., Evison, S.E.F., Darvill, B., Goulson, D., Hughes, W.O.H., 2013. The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *J. Appl. Ecol.* 50, 1207–1215.
- Gupta, R.S., Singh, B., 1994. Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Curr. Biol.* 4, 1104–1114.
- Han, F., Wallberg, A., Webster, M.T., 2012. From where did the western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecol. Evol.* 2, 1949–1957.
- Hassanein, M.H., 1951. Studies on the Effect of Infection with *Nosema apis* on the Physiology of the Queen Honeybee. *J. Microsc. Sci.* 92, 225–231.
- Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzis, D., Meeus, I., Brunain, M., Smagghe, G., de Graaf, D.C., 2011. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *J. Invertebr. Pathol.* 108, 131–134.
- Hedtke, K., Jensen, P.M., Jensen, A.B., Genersch, E., 2011a. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J. Invertebr. Pathol.* 108, 167–173.
- Hedtke, K., Jensen, P.M., Jensen, A.B., Genersch, E., 2011b. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J. Invertebr. Pathol.* 108, 167–173.

- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–450.
- Higes, M., García-Palencia, P., Botías, C., Meana, A., Martín-Hernández, R., 2010a. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 745–748.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211–217.
- Higes, M., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Lucena, S., Botías, C., Meana, A., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., 2013a. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 530–536.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 93–95.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A. V, Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008a. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659–2569.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Botías, C., Meana, A., 2009a. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *J. Apic. Res.* 48, 217–219.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P., Meana, A., 2008b. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 76–78.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V, García-Palencia, P., Meana, A., Del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J.L., 2009b. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 110–113.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Meana, A., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Bernal, J., 2010b. A preliminary study of the

- epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 243–50.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010c. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., 2013b. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 17–29.
- Higes, M., Sanz, A., Meana Mañes, A., Martín, R., García, M. del P., Alvarez, N., Sanz, A., 2005. El Síndrome de Despoblamiento de las colmenas en España: consideraciones sobre su origen. *Vida apícola Rev. Apic.* 133, 15-21.
- Highfield, A.C., El Nagar, A., Mackinder, L.C.M., Noël, L.M.-L.J., Hall, M.J., Martin, S.J., Schroeder, D.C., 2009. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7212–7220.
- Hirt, R.P., Healy, B., Vossbrinck, C.R., Canning, E.U., Embley, T.M., 1997. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr. Biol.* 7, 995–998.
- Hirt, R.P., Logsdon, J.M., Healy, B., Dorey, M.W., Doolittle, W.F., Embley, T.M., 1999. Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 580–585.
- Huang, Q., Kryger, P., Le Conte, Y., Moritz, R.F. a, 2012. Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 297–302.
- Huang, W.F., Bocquet, M., Lee, K.C., Sung, I.H., Jiang, J.H., Chen, Y.W., Wang, C.H., 2008. The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 9–13.
- Huang, W.-F., Jiang, J.-H., Chen, Y.-W., Wang, C.-H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38, 30–37.
- Huang, W.-F., Solter, L.F., 2013. Comparative development and tissue tropism in *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 35–41.

- Huang,W.-F., Solter,L., Aronstein,K., and Huang,Z. (2015) Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **124**: 107–113.
- Huang, W.-F., Tsai, S.-J., Lo, C.-F., Soichi, Y., Wang, C.-H., 2004. The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 473–481.
- Huang, Z., Robinson, G.E., 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav Ecol Sociobiol.* **39**, 147–158.
- Huger, A., 1960. Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J. insect Pathol.* **2**, 84–105.
- Ironside, J.E., 2013. Diversity and Recombination of Dispersed Ribosomal DNA and Protein Coding Genes in Microsporidia. *PLoS One* **8**, e55878.
- Ishihara, R., Hayashi, Y., 1968. Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.* **11**, 377-385.
- Issi, I. V., 1986. Microsporidia as a phylum of parasitic protozoa. *Acad. Sci. U.S.S.R* **1**, 6–136.
- James, T.Y., Pelin, A., Bonen, L., Ahrendt, S., Sain, D., Corradi, N., Stajich, J.E., 2013. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and Microsporidia. *Curr. Biol.* **23**, 1548–1553.
- Jara, L., Cepero, A., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Higes, M., De La Rúa, P., 2012. Linking evolutionary lineage with parasite and pathogen prevalence in the Iberian honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 8–13.
- Johnson, B.R., 2007. Within-nest temporal polyethism in the honey bee. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **62**, 777–784.
- Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D., Ellis, M.D., 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* **8**, e54092.
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C. a., Frazier, M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* **41**, 312–331.

- Kamaishi, T., Hashimoto, T., Nakamura, Y., Masuda, Y., Nakamura, F., Okamoto, K. -i., Shimizu, M., Hasegawa, M., 1996a. Complete nucleotide sequences of the genes encoding translation elongation factors 1 alpha and 2 from a microsporidian parasite, *Glugea plecoglossi*: implications for the deepest branching of eukaryotes. *J. Biochem.* 120, 1095–1103.
- Kamaishi, T., Hashimoto, T., Nakamura, Y., Nakamura, F., Murata, S., Okada, N., Okamoto, K., Shimizu, M., Hasegawa, M., 1996b. Protein phylogeny of translation elongation factor EF-1 alpha suggests microsporidians are extremely ancient eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 42, 257–263.
- Karpov, S. a., Mamkaeva, M. a., Aleoshin, V. V., Nassonova, E., Lilje, O., Gleason, F.H., 2014. Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Front. Microbiol.* 5, 1–11.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, 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., Vivarès, C.P., 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450–453.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.M., 1998. Endangered mutualism: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 83–112.
- Keeling, P., 2009. Five questions about microsporidia. *PLoS Pathog.* 5, e1000489.
- Keeling, P.J., 2003. Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet. Biol.* 38, 298–309.
- Keeling, P.J., Doolittle, W.F., 1996. Alpha tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1297–1305.
- Keeling, P.J., Fast, N.M., 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 93–116.
- Keeling, P.J., Fast, N.M., Law, J.S., Williams, B.A.P., Slamovits, C.H., 2005. Comparative genomics of microsporidia, in: *Folia Parasitologica*. pp. 8–14.
- Keohane, E.M., Orr, G.A., Takvoriand, P.M., Calid, A., Wittner, M., Weissa, L.M., 1996. Purification and characterization of a microsporidian protein polar tube. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79, 255–259.

- Keoghane, E.M., Weiss, L.M., 1998. Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitol. (Praha)*. 45, 117–127.
- Khoury, D.S., Barron, A.B., Myerscough, M.R., 2013. Modelling food and population dynamics in honey bee colonies. *PLoS One* 8, e59084.
- Khoury, D.S., Myerscough, M.R., Barron, A.B., 2011. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. *PLoS One* 6, e18491.
- Kimura, M., 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature*. 217, 624-626.
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R.J., 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 1–10.
- Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. a, Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.* 274, 303–313.
- Krebes, L., Zeidler, L., Frankowski, J., Bastrop, R., 2014. (Cryptic) sex in the microsporidian *Nosema granulosis* - Evidence from parasite rDNA and host mitochondrial DNA. *Infect. Genet. Evol.* 21, 259–268.
- Kudo, R., 1918. Experiments on the extrusion of polar filaments of cnidosporidian spores. *J. Parasitol.* 4, 141–147.
- Kwak, M.M., Velterop, O., van Andel, J., 1998. Pollen and gene flow in fragmented habitats. *Appl. Veg. Sci.* 1, 37–54.
- L'Arrivee, J.C.M., 1963. The Effects of Sampling Sites on *Nosema* Determination. *J. Insect Pathol.* 5, 355–394.
- LaFave, M.C., Sekelsky, J., 2009. Mitotic recombination: why? when? how? where? *PLoS Genet.* 5, e1000411.
- Lahr, D.J.G., Katz, L.A., 2009. Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase. *Biotechniques* 47, 857–866.

- Langridge, D.F., McGhee, R.B., 1967. *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic Trypanosomatid of the Honey Bee *Apis mellifera*. J. Protozool. 14, 485–487.
- Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W., 2010. *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? Apidologie 41, 353–363.
- Le Conte, Y., Navajas, M., 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. Rev. Sci. Tech. 27, 499–510.
- Lee, S.C., Corradi, N., Byrnes, E.J., Torres-Martinez, S., Dietrich, F.S., Keeling, P.J., Heitman, J., 2008. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. Curr. Biol. 18, 1675–1679.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., Heitman, J., 2010. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 298–340.
- Leoncini, I., Le Conte, Y., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A.L., Wang, M., Huang, Z., Bécard, J.-M., Crauser, D., Slessor, K.N., Robinson, G.E., 2004. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 17559–17564.
- Li, J., Chen, W., Wu, J., Peng, W., An, J., Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., 2012. Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China. Int. J. Parasitol. 42, 49–61.
- Lipa, J.J., Triggiani, O., 1996. *Apicystis* gen nov and *Apicystis bombi* (Liu, Macfarlane & Pengelly) comb nov (Protozoa: Neogregarinida), a cosmopolitan parasite of *Bombus* and *Apis* (Hymenoptera: Apidae). Apidologie 27, 29–34.
- Liu, H., Pan, G., Luo, B., Li, T., Yang, Q., Vossbrinck, C.R., Debrunner-Vossbrinck, B. a, Zhou, Z., 2013. Intraspecific polymorphism of rDNA among five *Nosema bombycis* isolates from different geographic regions in China. J. Invertebr. Pathol. 113, 63–69.
- Liu, T.P., 1984. Ultrastructure of the midgut of the worker honey bee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. J. Invertebr. Pathol. 44, 282–291.
- Liu, T.P., 1992. Oöcytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*. Tissue Cell 24, 131–138.
- Liu, W., Li, Y., Peeters, M., Rayner, J., Sharp, P., Shaw, G., Hahn, B., 2010. Single genome amplification and direct amplicon sequencing of Plasmodium spp. DNA from ape fecal

- specimens. Protoc. Exch. do:10.1038/nprot.2010.156. URL
<http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/1892>
- Lodesani, M., Costa, C., Besana, A., Dall'Olio, R., Franceschetti, S., Tesoriero, D., Vaccari, G., 2014. Impact of control strategies for *Varroa destructor* on colony survival and health in northern and central regions of Italy. *J. Apic. Res.* 53, 155–164.
- MAGRAMA, 2013. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA): Anuario de estadística 2012–2013. Capítulo 14; <Http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2013/default.aspx?parte=3&capitulo=14&grupo=3&seccion=4>.
- Maharramov, J., Meeus, I., Maebe, K., Arbetman, M., Morales, C., Graystock, P., Hughes, W.O.H., Plischuk, S., Lange, C.E., de Graaf, D.C., Zapata, N., de la Rosa, J.J.P., Murray, T.E., Brown, M.J.F., Smagghe, G., 2013. Genetic Variability of the Neogregarine *Apicystis bombi*, an Etiological Agent of an Emergent Bumblebee Disease. *PLoS One* 8, e81475.
- Martin, S.J., Hardy, J., Villalobos, E., Martín-Hernández, R., Nikaido, S., Higes, M., 2013. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 506–510.
- Martínez, J., Leal, G., Conget, P., 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol. Res.* 111, 601–607.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M., 2012a. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* 14, 2127–2138.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M., 2012b. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* 14, 2127–2138.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., Higes, M., 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.* 109, 605–612.

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2554–2557.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E., Higes, M., 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6331–6338.
- Maside, X., Gómez-moracho, T., Martín-henández, R., Higes, M., Bartolomé, C., 2015. Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: one host (*Apis mellifera*) and two different histories. *Under Rev.*
- Matheson, A., 1996. World bee health update 1996. *Bee World* 77, 45–51.
- Mayack, C., Naug, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 185–188.
- Mayack, C., Naug, D., 2010. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J. Insect Physiol.* 56, 1572–1575.
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. Columbia University Press. New York.
- McGregor, S.E., 1976. *Insect Pollination Of Cultivated Crop Plants*, USDA.
- Medici, S.K., Sarlo, E.G., Porrini, M.P., Braunstein, M., Eguaras, M.J., 2012. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitol. Res.* 110, 859–864.
- Méténier, G., Vivarès, C.P., 2001. Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 3, 407–415.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46.
- Meyerhans, A., Vartanian, J.-P., Wain-Hobson, S., 1990. DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Res.* 18, 1687–1691.
- Michalczyk, M., Sokół, R., Szczerba-turek, A., 2013. Phylogenetic analysis of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* small subunit 16S rRNA in honey bees (*Apis mellifera*) from north-eastern Poland*). *Pr. oryginalna* 69, 733–735.

- Morimoto, T., Kojima, Y., Yoshiyama, M., Kimura, K., Yang, B., Peng, G., Kadowaki, T., 2013. Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 74–77.
- Moritz, R.F. a., de Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P., Paxton, R.J., 2010. Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41, 227–242.
- Morse, R., Calderone, N., 2000. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee Cult.* 1-15
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., Vanengelsdorp, D., Pettis, J.S., 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5, e9754.
- Nabian, S., Ahmadi, K., Shirazi, M.N., Sadeghian, A.G., 2011. First Detection of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Protozoa of European Honeybees (*Apis mellifera*) in Iran. *Iran. Soc. Parasitol.* 6, 89–95.
- Nakjang, S., Williams, T. a, Heinz, E., Watson, A.K., Foster, P.G., Sendra, K.M., Heaps, S.E., Hirt, R.P., Martin Embley, T., 2013. Reduction and expansion in microsporidian genome evolution: new insights from comparative genomics. *Genome Biol. Evol.* 5, 2285–303.
- Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., Doublet, V., Bryden, J., Paxton, R.J., 2015. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc. Biol. Sci.* 282: 20141896.
- Naug, D., 2014. Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. *Biol. Lett.* 10: 20140731.
- Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E., Pennacchio, F., 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog.* 8, e1002735.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.* 39, 121–152.
- Neumann, P., Carreck, N., 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49, 1-6.

- Nguyen, B.K., Saegerman, C., Pirard, C., Mignon, J., Widart, J., Thirionet, B., Verheggen, F.J., Berkvens, D., De Pauw, E., Haubruge, E., 2009. Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *J. Econ. Entomol.* 102, 616–623.
- O'Mahony, E.M., Tay, W.T., Paxton, R.J., 2007. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54, 103–109.
- OIE, 2008a. Office International des Épizooties, OIE (2008a). Manual of standards for diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.2.3: European Foulbrood of honey bees. 442–446.
- OIE, 2008b. Office International des Épizooties, OIE (2008b). Manual of standards for diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.2.1. Acarapisosis of honey bees. OIE—World Organisation for Animal Health <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health>.
- OIE, 2008c. Office international epizooties, OIE (2008c). Chapter 2.2.4, Nosemosis of honey bees. 410-414.
- OIE, 2014. Office International des Épizooties, OIE (2014). Manual of standards for diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.2.2: American Foulbrood 1–15.
- Oldroyd, B.P., 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends Ecol. Evol.* 14, 312–315.
- Palmer, S., Kearney, M., Maldarelli, F., Halvas, E.K., Bixby, C.J., Bazmi, H., Rock, D., Falloon, J., Richard T. Davey, J., Dewar, R.L., Metcalf, J.A., Hammer, S., Mellors, J.W., Coffin, J.M., 2005. Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 406–413.
- Parisot, N., Pelin, a., Gasc, C., Polonais, V., Belkorchia, a., Panek, J., Alaoui, H.E., Biron, D.G., Brassat, E., Vaury, C., Peyret, P., Corradi, N., Peyretailade, E., Lerat, E., 2014. Microsporidian genomes harbour a diverse array of transposable elements that demonstrate an ancestry of horizontal exchange with metazoans. *Genome Biol. Evol.* 6, 2289–2300.
- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558–565.

- Pelin, A., Selman, M., Aris-Brosou, S., Farinelli, L., Corradi, N., 2015. Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen *Nosema ceranae*. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.
- Perry, C.J., Søvik, E., Myerscough, M.R., Barron, A.B., 2015. Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112:3427-3432.
- Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., 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.S., 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.
- Peuvel, I., Peyret, P., Méténier, G., Vivarès, C.P., Delbac, F., 2002. The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 69–80.
- Peyretilade, E., Broussolle, V., Peyret, P., Metenier, G., Gouy, M., Vivares, C.P., 1998. Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol. Biol. Evol.* 15, 683–689.
- Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N., Tornier, I., 2013. A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PLoS One* 8, e77193.
- Pinto, L.Z., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 2000. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.* 46, 153–160.
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A.H., Lange, C., Higes, M., 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 131–135.
- Plischuk, S., Meeus, I., Smagghe, G., Lange, C.E., 2011. *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 565–568.

- Polonais, V., Prensier, G., Méténier, G., Vivarès, C.P., Delbac, F., 2005. Microsporidian polar tube proteins: highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant *Antonospora* and *Encephalitozoon* groups. *Fungal Genet. Biol.* 42, 791–803.
- Potts, S., Roberts, S., Dean, R., Marris, G., Brown, M., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49, 15.
- Ptaszyńska, A. a, Borsuk, G., Wiesław, M., Demetraki-Paleolog, J., 2014a. Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under Scanning Electron Microscopy (SEM). *J. Apic. Res.* 53, 537–544.
- Ptaszyńska, A. a, Borsuk, G., Woźniakowski, G., Gnat, S., Małek, W., 2014b. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees. *FEMS Microbiol. Lett.* 357, 40–48.
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smaghe, G., de Graaf, D.C., 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* 8, e72443.
- REGA, 2015. Indicadores económicos del sector apícola. Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA). 01/05/2015.
- Robinson, G.E., 1987. Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20, 329–338.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl, 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.
- Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., Andino, R., DeRisi, J.L., 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* 6, e20656.
- Ruttner, F., 1988. *Biogeography and taxonomy of honeybees*, Springer-V. ed. Berlin.

- Ruttner, F., Tassencourt, L., Louveaux, J., 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9, 363–381.
- Sagastume, S., del Aguila, 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. *Environ. Microbiol.* 13, 84–95.
- Salazar-Gonzalez, J.F., Bailes, E., Pham, K.T., Salazar, M.G., Guffey, M.B., Keele, B.F., Derdeyn, C. a, Farmer, P., Hunter, E., Allen, S., Manigart, O., Mulenga, J., Anderson, J. a, Swanstrom, R., Haynes, B.F., Athreya, G.S., Korber, B.T.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Hahn, B.H., 2008. Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing. *J. Virol.* 82, 3952–3970.
- Salazar-Gonzalez, J.F., Pham, K., Keele, B.F., McPherson, D., 2007. Standard Operating Procedure for: Single Genome Amplification of HIV-1 Envelope. *Mol. Biol. Seq. Core. Univ. Alabama.*
- Sandrock, C., Tanadini, M., Tanadini, L.G., Fauser-misslin, A., Potts, S.G., Neumann, P., 2014. Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *PLoS One* 9, 1–13.
- Schmid-Hempel, P., 2001. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: Addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften* 88, 147–158.
- Schmuck, R., Schöning, R., Stork, A., Schramel, O., 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag. Sci.* 57, 225–238.
- Schurko, A.M., Neiman, M., Logsdon, J.M., 2009. Signs of sex: what we know and how we know it. *Trends Ecol. Evol.* 24, 208–217.
- Schwarz, R.S., Bauchan, G.R., Murphy, C. a., Ravoet, J., de Graaf, D.C., Evans, J.D., 2015. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera* : *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* doi: 10.1111/jeu.12209
- Schwarz, R.S., Evans, J.D., 2013. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit dis- tinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Dev. Comp. Immunol* 40, 300–310.

- Seeley, T.D., 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 11, 287–293.
- Seeley, T.D., 1985. *Honeybee ecology*, Monographs in behavior and ecology. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Selman, M., Sak, B., Kváč, M., Farinelli, L., Weiss, L.M., Corradi, N., 2013. Extremely reduced levels of heterozygosity in the vertebrate pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Eukaryot. Cell* 12, 496–502.
- Sheppard, W.S., Meixner, M.D., 2003. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie* 34, 367–375.
- Shimanuki, H., Knox, D., Furgala, B., Caron, D., Williams, J., 1992. Diseases and Pests of Honey Bees, in: *The Hive and the Honey Bee*. pp. 1083–1151.
- Singh, R.N., Sasidharan, T.O., Santha, P.C., Daniel, A.G.K., Kamble, C.K., 2005. Role of Temperature on Multiplication and Sporulation of *Nosema bombycis* in Silk Moth, *Bombyx mori* L. *Karnataka J. Agric. Sci.* 18, 398–400.
- Simeunovic, P., Stevanovic, J., Cirkovic, D., Sonja, R., Lakic, N., Stanisic, L., Stanimirovic, Z., 2014. *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *J. Apic. Res.* 53, 545–554.
- Slamovits, C.H., Fast, N.M., Law, J.S., Keeling, P.J., 2004. Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. *Curr. Biol.* 14, 891–896.
- Solter, L.F., Becnel, J.J., Oi, D.H., 2012. Microsporidian entomopathogens, in: Vega, F.E., Kaya, H.K. (Ed.), *Insect Pathology*. San Diego.
- Soroker, V., Hetzroni, A., Yakobson, B., David, D., David, A., Voet, H., Slabezki, Y., Efrat, H., Levski, S., Kamer, Y., Klinberg, E., Zioni, N., Inbar, S., Chejanovsky, N., 2011. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie* 42, 192–199.
- Sprague, V., 1982. *Synopsis and classification of living organisms*, Volumen 1. Parker, S. P. (ed), New York.
- Sprague, V., Becnel, J.J., Hazard, E.I., 1992. Taxonomy of phylum microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 285–395.

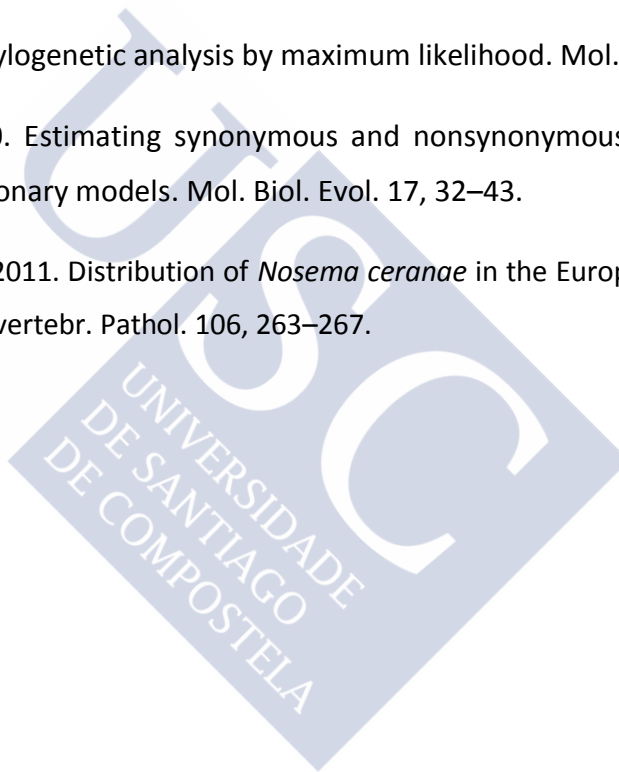
- Stephan, W., 2010. Genetic hitchhiking versus background selection: the controversy and its implications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1245–1253.
- Stevanovic, J., Simeunovic, P., Gajic, B., Lakic, N., Radovic, D., Fries, I., Stanimirovic, Z., 2013. Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie* 44, 522–536.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S.R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M., Aleksic, N., 2011. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42, 49–58.
- Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L.P., 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2482–2486.
- Suwannapong, G., Maksong, S., Seanbualuang, P., Benbow, M.E., 2010. Experimental infection of red dwarf honeybee, *Apis florea*, with *Nosema ceranae*. *J. Asia. Pac. Entomol.* 13, 361–364.
- Suwannapong, G., Yemor, T., Boonpakdee, C., Benbow, M.E., 2011. *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 236–41.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Tapasztai, Z., Forgách, P., Kövágó, C., Békési, L., Bakonyi, T., Rusvai, M., 2009. First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Vet. Hung.* 57, 383–388.
- Teixeira, E.W., Santos, L.G. Dos, Sattler, A., Message, D., Alves, M.L.T.M.F., Martins, M.F., Grassi-Sella, M.L., Franco, T.M., 2013. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 250–254.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7185–7191.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 2012. Reproductive clonality of pathogens: a perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3305–13.

- Tofilski, A., 2009. Shorter-lived workers start foraging earlier. *Inse* 56, 359–366.
- Topolska, G., Hartwig, A., 2005. Diagnosis of *Nosema apis* infection by investigations of two kinds of samples: dead bees and live bees. *J. Apic. Sci.* 49, 75–79.
- Traver, B.E., Fell, R.D., 2014. A scientific note: Survey for *Nosema* spp. in preserved *Apis* spp. *Apidologie* 46, 194–196.
- Tsai, S.-J., Lo, C.-F., Soichi, Y., Wang, C.-H., 2003. The characterization of microsporidian isolates (*Nosematidae: Nosema*) from five important lepidopteran pests in Taiwan. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 51–59.
- Van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.M., Belzunces, L.P., 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 5, 293–305.
- Van der Zee, R., Gómez-Moracho, T., Pisa, L., Sagastume, S., García-Palencia, P., Maside, X., 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*). *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 401–413.
- Van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Crailsheim, K., Dahle, B., Gajda, A., Gray, A., Drazic, M.M., Higes, M., Kauko, L., Kence, A., Kence, M., Kezic, N., Kiprijanovska, H., Kralj, J., Kristiansen, P., Martin Hernandez, R., Mutinelli, F., Nguyen, B.K., Otten, C., Özkirim, A., Pernal, S.F., Peterson, M., Ramsay, G., Santrac, V., Soroker, V., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnæs, F., Wei, S., Wilkins, S., 2012. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *J. Apic. Res.* 51, 100–114.
- VanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One* 4, e6481.
- VanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R.M., Pettis, J., 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3, e4071.

- VanEngelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl, S80–95.
- Vávra, J., 2005. “Polar vesicles” of microsporidia are mitochondrial remnants (“mitosomes”)? *Folia Parasitol. (Praha)*. 52, 193–195.
- Vávra, J., Larsson, 1976. Biology of the Microsporidia, in: Bulla, L.A., Cheng, T.C. (Eds.), *Biology of the Microsporidia*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–84.
- Vávra, J., Larsson, J.I., 1999. Structure of the microsporidia, in: Wittner, Weiss (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC (USA), pp. 7–84.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L.P., Delbac, F., 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6, e21550.
- Vidau, C., Panek, J., Texier, C., Biron, D.G., Belzunces, L.P., Le Gall, M., Broussard, C., Delbac, F., El Alaoui, H., 2014. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J. Invertebr. Pathol.* 121, 89–96.
- Villa, J.D., Bourgeois, a. L., Danka, R.G., 2013. Negative evidence for effects of genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of *Nosema ceranae* on bees. *Apidologie* 44, 511–518.
- Villeneuve, a M., Hillers, K.J., 2001. Whence meiosis? *Cell* 106, 647–650.
- Vossbrinck, C.R., Maddox, J. V, Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B.A., Woese, C.R., 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326, 411–414.
- Vossbrinck, C.R., Woese, C.R., 1986. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* 320, 287–8.
- Wang, D., Moeller, F., 1970. Comparison of the free amino acid composition in the hemolymph of healthy and *Nosema*-infected female honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 15, 202–206.

- Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., Kawata, M., Haddad, N., Luz, Z., Simões, P., Allsopp, M.H., Kandemir, I., Rúa, P. De, Pirk, C.W., Webster, M.T., 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nat. Genet.* 46, 1801-1808.
- Webster, T., 1993. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.* 133, 867–870.
- Webster, T.C., Pomper, K.W., Hunt, G., Thacker, E.M., Jones, S.C., 2004. *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie* 35, 49–54.
- Weiser, J., 1977. Contribution to the classification of microsporidia. *Vestn. Českoslov. Spol. Zool.* 41, 308–321.
- Whitaker, J., Szalanski, A.L., Kence, M., 2011. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. *Apidologie* 42, 174–180.
- White, G., 1919. *Nosema*-disease. United States Department of Agriculture, Bulletin No.780, Washington D.C.
- Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, A.G., Johnston, J.S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A. V, 2006. Thrice out of Africa : ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* (80-.). 314, 642–645.
- Williams, B. a P., 2009. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell. Microbiol.* 11, 1551–1560.
- Williams, B. a P., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., Embley, T.M., 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418, 865–869.
- Williams, G.R., Shafer, A.B. a, Rogers, R.E.L., Shutler, D., Stewart, D.T., 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 189–192.
- Williams, G.R., Shutler, D., Burgher-MacLellan, K.L., Rogers, R.E.L., 2014. Infra-Population and Community Dynamics of the Parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and Consequences for Honey Bee (*Apis mellifera*) Hosts. *PLoS One* 9, e99465.
- Wilson, W., Nunamaker, R., 1983. The incidence of *Nosema apis* in honeybees in Mexico. *Bee World* 64, 132–136.

- Wolf, S., McMahon, D.P., Lim, K.S., Pull, C.D., Clark, S.J., Paxton, R.J., Osborne, J.L., 2014. So near and yet so far: harmonic radar reveals reduced homing ability of nosema infected honeybees. *PLoS One* 9, e103989.
- Wittner, M., Weiss, L., 1999. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press Washington, DC. 1999 - 553 pp. Wolf, S., McMahon, D.P., Lim, K.S., Pull, C.D., Clark, S.J., Paxton, R.J., Osborne, J.L., 2014. So near and yet so far: harmonic radar reveals reduced homing ability of nosema infected honeybees. *PLoS One* 9, e103989.
- Xu, Y., Weiss, L.M., 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int. J. Parasitol.* 35, 941–953.
- Yang, Z., 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.*
- Yang, Z., Nielsen, R., 2000. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* 17, 32–43.
- Yoshiyama, M., Kimura, K., 2011. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 263–267.







ANEXOS: Material suplementario

Material suplementario: “Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: one host (*Apis mellifera*) and two different histories”

Supporting information

S1 Table. Origin and accession numbers of *N. apis* sequences obtained from *A. mellifera* honey bees.

S2 Table. Origin and accession numbers of *N. ceranae* sequences obtained from *A. mellifera* honey bees.

S3 Table. Number of occurrences and nucleotide variants of *PTP2*^A haplotypes from *N. apis*.

S4 Table. Number of occurrences and nucleotide variants of *PTP3*^A haplotypes from *N. apis*.

S5 Table. Number of occurrences and nucleotide variants of *RPB1*^A haplotypes from *N. apis*.

S6 Table. Number of occurrences and nucleotide variants of *RPB1*^{A+B} haplotypes from *N. apis*.



S1 Table. Origin and accession numbers of *N. apis* sequences obtained from *A. mellifera* honeybees.

Dataset	Isolate	Origin	<i>A. mellifera</i> evolutionary		PTP2		PTP3		RPB1	
			N	Acc. numbers	N	Acc. numbers	N	Acc. numbers	N	Acc. numbers
<i>N. apis</i> ^A	52	SLO	9	KJ472925 - KJ472933	5	KJ473021 - KJ473025	9	KJ473104 - KJ473112		
<i>N. apis</i> ^A	174	TUR	10	KJ472934 - KJ472943	5	KJ473026 - KJ473030	10	KJ473121 - KJ473130		
<i>N. apis</i> ^A	204	ARG	8	KJ472944 - KJ472951	5	KJ472993 - KJ472997	11	KJ473046 - KJ473056		
<i>N. apis</i> ^A	381	CAN	9	KJ472952 - KJ472960	10	KJ472998 - KJ473007	11	KJ473073 - KJ473083		
<i>N. apis</i> ^A	399	SPA	7	KJ472961 - KJ472967	7	KJ473031 - KJ473037	7	KJ473227 - KJ473233		
<i>N. apis</i> ^A	410	SPA	10	KJ472968 - KJ472977	13	KJ473008 - KJ473020	12	KJ908955 - KJ908966		
<i>N. apis</i> ^A	854	ALG	10	KJ472978 - KJ472987	5	KJ472988 - KJ472992	8	KJ473038 - KJ473045		
<i>N. apis</i> ^B	59	SLO					8	KJ473113 - KJ473120		
<i>N. apis</i> ^B	264	POL					10	KJ473131 - KJ473140		
<i>N. apis</i> ^B	266	POL					10	KJ473141 - KJ473150		
<i>N. apis</i> ^B	268	POL					10	KJ473151 - KJ473160		
<i>N. apis</i> ^B	363	CHI					8	KJ473057 - KJ473064		
<i>N. apis</i> ^B	380	CAN					8	KJ473065 - KJ473072		
<i>N. apis</i> ^B	382	CAN					10	KJ473084 - KJ473093		
<i>N. apis</i> ^B	411	CHI					10	KJ473094 - KJ473103		
<i>N. apis</i> ^B	529	SLO					9	KJ473161 - KJ473169		
<i>N. apis</i> ^B	569	HUN					10	KJ473170 - KJ473179		
<i>N. apis</i> ^B	1074	GER					8	KJ473180 - KJ473187		
<i>N. apis</i> ^B	1098	GER					10	KJ473188 - KJ473197		
<i>N. apis</i> ^B	1099	GER					10	KJ473198 - KJ473207		
<i>N. apis</i> ^B	1511	NED					10	KJ473208 - KJ473217		
<i>N. apis</i> ^B	1735	NED					9	KJ473218 - KJ473226		

^A, Seven isolates used to estimate *N. apis* diversity; ^B, 15 additional isolates used for further analysis of RPB1

ALG: Algeria, ARG: Argentina, CAN: Canada, CHI: Chile, GER: Germany, HUN: Hungary, NED: Netherlands, POL: Poland, SLO: Slovenia, SPA: Spain, TUR: Turkey

S2 Table. Origin and accession numbers of *N. ceranae* sequences obtained from *A. mellifera* honeybees.

Isolate	Origin	<i>A. mellifera</i> evolutionary		PTP2		PTP3		PTP1	
		N	Acc. numbers	N	Acc. numbers	N	Acc. numbers	N	Acc. numbers
3	AUS	C						8	KJ473381 - KJ473388
4	AUS	C						8	KJ473389 - KJ473396
57	SPA	A	9	KC520347 - KC520355 ^a	8	KC520107 - KC520114 ^a		10	KJ473315- KJ473324
169	BRA	A	7	KC520282 - KC520288 ^a	9	KC520023 - KC520031 ^a		9	KJ473241 - KJ473249
253	SPA	A	10	KC520356 - KC520365 ^a	12	KC520115 - KC520126 ^a		10	KJ473325- KJ473334
376	CAN	C	8	KC520289 - KC520296 ^a	6	KC520032 - KC520037 ^a		7	KJ473250 - KJ473256
377	CAN	C	6	KC520297 - KC520302 ^a	8	KC520038 - KC520045 ^a		10	KJ473257 - KJ473266
440	HUN	C	8	KC520366 - KC520373 ^a	9	KC520127 - KC520135 ^a		9	KF002461 - KF002469 ^b
526	NED	M	8	KC520374 - KC520381 ^a	10	KC520136 - KC520145 ^a		7	KJ473335 - KJ473341
531	SLO	C	13	KC520382 - KC520394 ^a	5	KC520146 - KC520150 ^a		7	KJ473342 - KJ473348
839	ALG	A	7	KC520275 - KC520281 ^a	10	KC520013 - KC520022 ^a		7	KJ473234 - KJ473240
911	TWN	C	6	KC520326 - KC520331 ^a	10	KC520080 - KC520089 ^a		10	KJ473305- KJ473314
912	SPA	M	8	KC520395 - KC520402 ^a	12	KC520151 - KC520162 ^a		6	KJ473349- KJ473354
1175	CRO	C	9	KC520403 - KC520411 ^a	11	KC520163 - KC520173 ^a		15	KJ473355 - KJ473361
1244	ARG	C	7	KC520303 - KC520309 ^a	11	KC520046 - KC520056 ^a		10	KJ473267 - KJ473276
1251	HI	M	10	KC520422 - KC520431 ^a	10	KC520186 - KC520195 ^a		8	KF002470 - KF002477 ^b
1299	GRE	C	10	KC520412 - KC520421 ^a	12	KC520174 - KC520185 ^a		8	KJ473362 - KJ473369
1319	HI	C	7	KC520432 - KC520438 ^a	5	KC520196 - KC520200 ^a		11	KJ473370 - KJ473380
1324	HI	C	8	KC520439 - KC520446 ^a	12	KC520201 - KC520212 ^a		6	KF002478 - KF002483 ^b
1610	USA	C	5	KC520310 - KC520314 ^a	11	KC520057 - KC520067 ^a		10	KJ473277- KJ473286
1994	CHI	C	11	KC520315 - KC520325 ^a	12	KC520068 - KC520079 ^a		10	KJ473287 - KJ473296
2032	SOL	C	12	KC520458 - KC520469 ^a	11	KC520232 - KC520242 ^a		9	KJ473397- KJ473406
KI	JAP	C						8	KJ473297 - KJ473304

^a Data from [21]; ^b Data from [41].

ALG: Algeria, ARG: Argentina, AUS: Australia, BRA: Brazil, CAN: Canada, CHI: Chile, CRO: Croatia, GRE: Greece, HI: Hawaii (USA), HUN: Hungary, JAP: Japan, NED: Netherlands, SLO: Slovenia, SOL: Solomon Islands, SPA: Spain, TWN: Taiwan, USA: United States of America.

S4 Table. Number of occurrences and nucleotide variants of *PTP3^A* haplotypes from *N. apis*

Country	ALG	SPA	SPA	ARG	CAN	SLO	TUR	Nucleotide variants in <i>PTP3^A</i> haplotypes from <i>N. apis</i>																													
Isolate	854	399	410	204	381	52	174	1390	1396	1400	1409	1433	1515	1530	1544	1618	1651	1684	1688	1692	1758	1759	1779	1790	1791	1818	1885	1887	1893	1947							
<i>A. mellifera</i> lineage	A	A	A/M	C	C	C	C																														
Haplotype																																					
h1			2	1	4	5	2	G	A	A	T	A	T	T	A	A	A	T	A	T	G	G	C	T	T	A	A	A	C	A							
h2	1												
h3	4	3	2					A					
h4				2	2						
h5				1						
h6				1						
h7					1				
h8					1				
h9					1			
h10					1			
h11							1	
h12							
h13							
h14							
h15							
h16							
h17							

ALG: Algeria, ARG: Argentina, CAN: Canada, SLO: Slovenia, SPA: Spain, TUR: Turkey.
 Nucleotide positions are as in the reference sequence KE647278.1: 2294-4285 (locus tag NAPIS_ORF01922).
 Dots represent the same genotype as in h1.

S6 Table. Number of occurrences and nucleotide variants of *RPB1*^{A+B} haplotypes from *N. apis* (pag. 1 de 4)

Country Isolate	ALG 854	SPA 399	SPA 410	CAN 382	CHI 411	ARG 204	CAN 380	CAN 381	CHI 363	GER 1074	GER 1098	GER 1099	HUN 569	NED 1511	NED 1735	POL 264	POL 266	POL 268	SLO 52	SLO 59	SLO 529	TUR 174
<i>A. mellifera</i> lineage	A	A	A/M	M	M	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Haplotype																						
h1																						
h2	6	4	6			2						3										
h3	1																					
h4	1																					
h5				3	4	5	3		5	2	6		3	5	6	3	3	3	2	3	5	1
h6						1																
h7						1																
h8						1																
h9						1																
h10																						
h11									1													
h12				4	5		2		1	1	1	1	2	2		2	1	2	1	3	1	
h13							1															
h14							1															
h15							1															
h16								3														
h17								1														
h18								1														
h19								1														
h20								1														
h21								1														
h22								1														
h23								1														
h24								1														
h25				1																		
h26				1																		
h27					1																	
h28					1																	
h29					1																	
h30					1																	
h31					1					1			1									
h32					1																	
h33										2				1					1			1
h34																			1			
h35																			1			
h36																			1			
h37																			1			
h38																			1			
h39																			1			
h40																			1			
h41																						5
h42																						1
h43																						1
h44																						1
h45																						1
h46																	1					
h47																	1					
h48																	1					
h49																	1					
h50																		1				
h51																		1				
h52																		1				
h53																		1				
h54																		1				
h55																			1			
h56																			1			
h57																			1			
h58																			1			
h59																			1			
h60																					1	
h61																					1	
h62														1								
h63														1								
h64														1								
h65														1								
h66										1												
h67										1												
h68											1											
h69											1											
h70												1										
h71													2									
h72													1									
h73													2									
h74													1									
h75															1							
h76																	1					
h77																	1					
h78																	1					
h79																						
h80			1																			
h81			1																			
h82				1																		
h83					1																	

ALG: Algeria, ARG: Argentina, CAN: Canada, CHI: Chile, GER: Germany, HUN: Hungary, NED: Netherlands, POL: Poland, SLO: Slovenia, SPA: Spain
 Nucleotide positions are as in the reference sequence DQ996230.1 (h1), which was not present in our dataset.
 Dots represent the same genotype as in h1.

S6 Table. Number of occurrences and nucleotide variants of *RPB1*^{A+B} haplotypes from *N. apis* (pag. 2 de 4)

Country Isolate <i>A. mellifera</i> lineage	Nucleotide variants in RPB1A+B haplotypes from <i>N. apis</i>																															
Haplotype	439	440	450	453	488	491	494	495	498	503	510	511	513	514	516	517	530	531	550	574	579	624	643	648	660	664	668	681	690	694	700	
h1	C	A	T	T	A	T	A	A	C	C	T	G	T	A	A	A	A	A	G	A	A	T	A	A	A	A	T	G	T	G	T	
h2
h3
h4	G
h5
h6
h7
h8
h9
h10
h11	C
h12
h13
h14
h15
h16
h17
h18
h19	G
h20
h21
h22
h23	G
h24
h25
h26	.	G
h27
h28
h29	.	.	.	C
h30	T
h31
h32
h33
h34
h35
h36
h37
h38	A
h39	G	G
h40
h41
h42	T
h43	T	C
h44	T
h45	T
h46
h47
h48	G
h49
h50
h51
h52	A
h53
h54	T
h55
h56
h57
h58
h59
h60	.	.	C
h61	T	G
h62	C	.	G
h63
h64
h65
h66
h67
h68	G
h69
h70	T
h71	G
h72	C
h73
h74
h75
h76	G
h77
h78	G	G
h79
h80
h81
h82
h83	G

ALG: Algeria, ARG: Argentina, CAN: Canada, CHI: Chile, GER: Germany, HUN: Hungary, NED: Netherlands, POL: Poland, SLO: Slovenia, SPA: Spain, TUR: Turkey.
Nucleotide positions are as in the reference sequence DQ996230.1 (h1), which was not present in our dataset.
Dots represent the same genotype as in h1.

S6 Table. Number of occurrences and nucleotide variants of *RPB1*^{A+B} haplotypes from *N. apis* (pag. 4 de 4)

Country Isolate	Nucleotide variants in RPB1A+B haplotypes from <i>N. apis</i>																															
<i>A. mellifera</i> lineage	1066	1069	1126	1133	1136	1137	1144	1147	1161	1165	1169	1172	1173	1182	1188	1221	1222	1236	1261	1275	1277	1282	1286	1312	1344	1350	1352	1355	1357	1375	1377	1381
Haplotype																																
h1	A	A	C	C	G	A	C	G	G	T	A	A	A	A	A	T	A	T	T	A	A	T	A	A	T	T	A	A	A	A	A	
h2
h3
h4
h5
h6	G
h7
h8
h9
h10
h11
h12	G
h13
h14
h15
h16
h17	G
h18
h19	G
h20	G	G
h21
h22
h23
h24	G
h25
h26	.	.	T
h27
h28	G
h29
h30
h31
h32
h33
h34
h35
h36	G
h37
h38
h39
h40
h41
h42
h43
h44
h45
h46
h47
h48
h49
h50
h51	G
h52
h53	C
h54	G
h55
h56
h57
h58	.	.	.	T
h59
h60
h61
h62
h63	A
h64	G
h65	A
h66	A
h67
h68
h69
h70
h71
h72	.	G
h73	A
h74	A
h75
h76
h77
h78
h79
h80
h81	A
h82
h83

ALG: Algeria, ARG: Argentina, CAN: Canada, CHI



