



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR MÚLTIPLE PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE TRES PATÓGENOS EN ABEJAS DEL ECUADOR.

AUTOR

Gerald Andrés Maldonado Yaguana

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR MÚLTIPLE PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE TRES PATÓGENOS EN ABEJAS DEL ECUADOR.

“Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología”

Docente Guía

MSc. Carlos Andrés Bastidas Caldes

Autor

Gerald Andrés Maldonado Yaguana

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Estandarización de una PCR múltiple para la identificación de tres patógenos en abejas del Ecuador, a través de reuniones periódicas con el estudiante, Gerald Andrés Maldonado Yaguana, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Carlos Andrés Bastidas Caldes
Máster Universitario en Microbiología Avanzada
CI: 020161619806

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber dirigido el trabajo, Estandarización de una PCR múltiple para la identificación de tres patógenos en abejas del Ecuador, a través de reuniones periódicas con el estudiante, Gerald Andrés Maldonado Yaguana, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CI: 1718092701

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Ana Dolores Garrido Haro
Máster en Biología Molecular
CI: 1718496928

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Gerald Andres Maldonado Yaguana

CI: 1205175407

AGRADECIMIENTOS

Mi cordial agradecimiento a la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en su laboratorio de Biología Molecular y a todos los técnicos que lo conforman.

A Mvz. Hugo Rosero y al Dr. Francisco Reynaldi gracias por sus grandes conocimientos y aportes en cuanto a la apicultura y a la biología molecular para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Con todo el amor y esfuerzo dedico este trabajo a mi padre Mario, a mi madre Martha y a todas las personas que estuvieron presentes gracias por su apoyo incondicional y alentarme para cumplir mis metas, durante toda mi carrera universitaria.

RESUMEN

Las abejas son responsables de la polinización de muchas especies de plantas nativas y cultivadas. Estos insectos pueden ser afectados por hongos y bacterias los cuales pueden formar esporas que se dispersan fácilmente dentro de la colonia. Entre estas bacterias están *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*, agentes causantes de loque americano, loque europeo y el hongo *Ascosphaera apis*, causante de Ascosferosis. Estas enfermedades tienen alta prevalencia durante el estadio larvario de las abejas. La identificación y el diagnóstico de tales microorganismos mediante técnicas de microbiología y parasitología convencional se ven limitados, principalmente por el transporte, recolección y procesamiento incorrecto de muestras. En su lugar, las técnicas de biología molecular como la PCR, permiten obtener resultados en menor tiempo, con alta sensibilidad y especificidad. Por esta razón, se empleó un método molecular basado en la PCR múltiple para la identificación de estos microorganismos. Para la extracción de ADN a partir de larvas se utilizó un protocolo implementado con DNAzol. Se utilizaron cebadores específicos para la amplificación génica de los 3 microorganismos con bandas de 973 pb, 281 pb y 136 pb. Los resultados de la estandarización de la PCR multiplex mostraron una alta especificidad de los cebadores (100%) y un límite de detección de la PCR de 0.01 pg, con excepción de *A. apis* con 0.01 fg. Con estos resultados, se pudo demostrar la necesidad de disponer de un método molecular para la identificación temprana de estos patógenos causantes de las principales enfermedades que afectan a la apicultura del Ecuador.

Palabras clave: *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Ascosphaera apis*, PCR múltiple, DNAzol.

ABSTRACT

The pollination of native and cultivated plants is achieved by the interaction of bees, nevertheless these insects can be affected by fungi and bacteria. This type of infection is dispersed in the colony by spores. Bacterial diseases such as American and European foulbrood are caused by *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* respectively, and the fungus disease Ascospheerosis is caused by *Ascospheera apis*. These diseases have high prevalence during bees' larval stage. Microbiological and parasitological are limited techniques for identification and diagnosis of bacterial and fungus bees' diseases due to the transport, collection and incorrect processing of samples. As an alternative, molecular biology techniques such as PCR has better results, because is more effective in time, sensitivity and specificity. Consequently, a molecular method based on multiple PCR was used to identify these microorganisms. A protocol implemented with DNAzol was used for the extraction of DNA from larvae. For the gene amplification of the 3 microorganisms with bands of 973 bp, 281 bp and 136 bp Specific primers were used. The results of the multiplex PCR standardization showed high specificity of the primers (100%) and a detection limit of 0.01 pg of the PCR, except for *A. apis* with 0.01 fg. The obtained results shown the need the need to have a molecular method for identification of pathogens that cause diseases that affect beekeeping in Ecuador.

Key words: *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Ascospheera apis*, PCR multiplex, DNAzol.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.	1
1.2 Planteamiento del problema.	4
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.	5
1.3.2 Objetivos específicos.	5
1.4 Justificación de la investigación.....	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Abejas	7
2.1.1 Especies de abejas.	8
2.1.2 Biogeografía de las abejas.....	9
2.1.3 Biología de las abejas.	13
2.1.4 Ciclo de desarrollo de las abejas melíferas	15
2.2 Situación ecológica de las abejas.	16
2.2.1 Ecología de las abejas	16
2.2.2 Amenazas de las abejas en la actualidad.	18
2.3 La Apicultura.....	20
2.3.1 La Apicultura en el Ecuador.	21
2.4 Patógenos	22
2.4.1 Patógenos importantes en el Ecuador.	24
2.4.2 Enfermedades Fúngicas	25
2.4.2.1 <i>Ascosphaera apis</i>	26
2.4.3 Enfermedades Bacterianas.	28
2.4.3.1 <i>Paenibacillus larvae</i>	28
2.4.3.2 <i>Melissococcus plutonius</i>	32
3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL.....	35
4. PROCEDIMIENTOS	36

4.1	Población y Muestra	36
4.2	Materiales y Métodos	37
4.2.1	Extracción de ADN y cuantificación.....	37
4.2.1.1	Implementación y optimización de un protocolo de extracción de ADN bacteriano y fúngico de crías de abejas mediante DNAzol	37
4.2.2	Cebadores.....	38
4.2.3	Optimización de las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.....	38
4.2.3.1	Optimización de la temperatura de hibridación.....	39
4.2.3.2	Gradiente de Cloruro de Magnesio (MgCl ₂).....	39
4.2.3.3	Gradiente de cebadores.	40
4.2.4	Determinación de la sensibilidad analítica.	42
4.2.5	Determinación de la especificidad.....	42
4.2.6	Electroforesis en gel de agarosa.....	43
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1	Implementación y optimización de un protocolo de extracción de ADN bacteriano y fúngico de crías de abejas mediante DNAzol.....	43
5.2	Optimización de las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.....	46
5.2.1	Optimización de la temperatura de hibridación.	46
5.2.2	Gradiente de Cloruro de Magnesio (MgCl ₂).	48
5.2.3	Gradiente de cebadores.....	50
5.2.4	Determinación de la sensibilidad analítica	51
5.2.5	Determinación de la especificidad.....	53
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
6.1	Conclusiones.....	56
6.2	Recomendaciones.....	56
	REFERENCIAS	58

1 Introducción

1.1 Antecedentes

Las abejas son insectos holometabólicos, es decir que atraviesan por tres fases diferentes que son larva, pupa o pre-pupa y adulta con la distinción de mudas metamórficas. Por otra parte, también se las puede diferenciar por grupos o castas denominadas abeja reina, abeja obrera o nodriza y los zánganos que son los machos de la colonia (Evans y Schwarz, 2011).

Las abejas son de gran interés para los seres humanos como indicadores del equilibrio ambiental y para el desarrollo del hombre, ya que los alimentos de consumo diario desaparecerían al no ser polinizados por este tipo de himenópteros (Aronstein y Murray, 2010, pp. 20-29). Se han realizado diversas investigaciones para identificar los posibles agentes infecciosos, causantes de muchas enfermedades, tales como loque americana, loque europea y ascosferosis (James y Skinner, 2005, pp. 98-103). Desde 1989, el Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT-UNA, n.d.) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), han realizado estudios acerca del diagnóstico de enfermedades, basado en la identificación del agente patógeno de la cría y la abeja adulta, ya sea por técnicas convencionales o por medio de la biología molecular (Prost y Le Conte, 2007, pp. 60-88).

El reciente declive de la población de abejas, observado en algunas regiones del mundo, ha generado pérdidas tanto ecológicas como económicas. Para explicar las causas se están realizando investigaciones y la mayoría de los resultados apuntan al efecto aislado o sinérgico de patógenos (Evison, 2015, pp. 65-72).

Por otra parte Evans y Spivak (2009,p.S64), mencionaron que las enfermedades de las abejas se clasifican según el estadio en su ciclo de eclosión de estos insectos que el cual ocurre entre los 3 y 21 días de desarrollo. Como primera instancia el ciclo comienza como huevo el día 3; seguido del estadio de larva

desde el día 6; luego como pupa o pre-pupa a los 12 días y finalmente como abeja adulta a los 21 días. En los estadios de larva y pupa son susceptibles a ataques de enfermedades bacterianas, fúngicas y parasitarias. La Loque Americana (*Paenibacillus larvae*), Loque Europea (*Melissococcus Plutonium*), cría yesificada (*Ascosphaera apis*) y varroosis (*Varroa destructor*). Por otro lado, dentro de las enfermedades de la abeja adulta se encuentran enfermedades asociadas a virosis, acariosis, amebiasis y nosemosis, que afectan en este período de vida a estos insectos polinizadores (2009, p.64).

Ecuador, como país megadiverso en cuanto a sus diferentes ecosistemas se puede tomar a la apicultura como una pequeña ganadería o que generan ingresos económicos importantes (Cabrera, 2012,). Sin embargo, no se ha logrado un nivel de desarrollo adecuado por muchos factores, entre los cuales podemos mencionar la sanidad de apiarios que logran disminuir la carga patológica hasta un 75% en el interior de las colmenas (Guerra, Mosquera, y Rosero, 2013, pp. 19-30).

Puker en el año 2011 (pp. 28-36), diseñó una PCR multiplex (mPCR) para la detección simultánea de *Ascosphaera Apis*, *Nosema ceranae* y *Paenibacillus Larvae* de esporas presentes en mieles, en donde utilizó controles de muestras de miel con sintomatología positiva para estos patógenos, y empleó cebadores específicos para la amplificación de cada microorganismo.

El autor determinó que toda la metodología empleada durante el proceso de normalización de la PCR múltiple fue eficaz para la identificación de estos tres patógenos, en donde el umbral de detección de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex a partir de esporas fue de 10 UFC/mL de miel y 10 a 100 esporas/mL de miel para *A. apis*, *N. ceranae*, y 10 UFC/mL para *P. larvae* respectivamente (Puker, 2011).

Los datos proporcionados por Puker en el 2011 (p. 34), demuestran la capacidad de una técnica basada en PCR para detectar el ADN de hongos y bacterias en

muestras de miel contaminadas. La metodología empleada fue específica y sensible para la eventual identificación de tres patógenos en mieles infestadas.

En el Ecuador en el año 2016, la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la calidad del Agro (AGROCALIDAD), realizó un diseño de muestreo para determinar la prevalencia de loque Americana y loque Europea y el porcentaje de nosemosis y varroosis en abejas melíferas de la región sierra del Ecuador. Comprobaron que la infesta por parte de estos patógenos era de un 20% en la sierra ecuatoriana, con afecciones a los apicultores y perjudicando sus ingresos económicos. Toda esta evaluación se centró en la zona andina, debido a que en esta región se concentra el 67% de la producción apícola del país (Rosero, 2016).

Garrido y colaboradores (2013, pp. 732-738) desarrollaron y evaluaron una PCR multiplex para la detección rápida y simultánea de *Ascosphaera Apis*, *Melissococcus plutonius* y *Paenibacillus larvae* para evaluar la prevalencia de estos patógenos en crías de abejas en apiarios españoles. Para ello evaluaron los genes 16S rRNA de *M. plutonius* y *P. larvae* y el gen 5.8S rRNA de *A. apis* a partir de la base de datos "GenBank" con la finalidad de localizar secuencias de regiones conservadas de los genes de cada especie. Las reacciones de la PCR multiplex para estos tres patógenos se evaluaron a partir de muestras de abejas adultas y de cría, sin la necesidad de cultivo microbiológico. Para una correcta optimización del ensayo múltiple, realizaron pruebas de diversas combinaciones de concentración de cloruro de magnesio y concentraciones de los cebadores.

La secuencia de los genes 5.8S rARN y 16S rARN fueron escogidos como blancos adecuados para la amplificación de una multiplex-PCR, porque tienen regiones conservadas que logran ser usadas para una amplificación génica eficiente de diferentes agentes etiológicos que afectan a las abejas. La especificidad y sensibilidad se determinó y evaluó a través de diluciones seriadas, y utilizaron aislados de patógenos encontrados comúnmente en panales enfermos, tales como *Bacillus alvei* (Garrido, 2013).

En conclusión, desarrollaron con gran éxito un ensayo de PCR multiplex que proporciona una herramienta rápida y específica que detecta y diferencia con eficiencia tres patógenos infecciosos.

Posteriormente en el 2016, se implementó un método basado en PCR monoplex y multiplex para la detección de esporas de *Nosema* spp., *Ascospaera apis* y *Paenibacillus larvae*, en muestras de polen, miel y jalea real de abejas. La optimización de la PCR se logró mediante la utilización de cultivo microbiológico para cada producto individualmente. El umbral de detección en cada subproducto a través de esporas se dio en rangos entre 0.4 - 7 esporas/mL de miel para cada patógeno respectivamente. Las condiciones de estandarización se determinaron a partir de variaciones de concentración de magnesio y gradientes de temperaturas, para encontrar la correcta combinación que asegure una rápida detección de estos patógenos en productos apícolas (Guimarães, Serrão y Fonseca, 2016).

1.2 Planteamiento del problema.

Las abejas son responsables de la polinización de muchas especies de plantas nativas y cultivadas. Estos insectos pueden ser afectados por muchos patógenos, incluyendo hongos, bacterias y virus. Algunos de estos tienen la capacidad de formar esporas que se dispersan fácilmente dentro de la colonia y contaminar al material apícola utilizado para el manejo de las colmenas (Anido, 2013).

Como estos insectos viven en sociedad y en conjunto, esto ayuda o facilita la infección, supervivencia y diseminación de parásitos cuando existe un desequilibrio huésped-hospedador dentro del colmenar. En general, el interior de los nidos de insectos eusociales, además de ofrecer abrigo, proporciona el mantenimiento de un microclima con temperaturas y humedad controladas, propicias para el desarrollo de microorganismos y parásitos (Carabajo, 2015)

La identificación de estos patógenos se realiza a través de varios métodos clásicos de detección del agente infeccioso. Se destacan por ejemplo ensayos microbiológicos, bioquímicos, parasitológicos, microscopia y técnicas basadas en anticuerpos. En la actualidad, los procedimientos de diagnóstico en el Ecuador se basan en cultivos, pero algunos son muy deficientes y no determinan con veracidad el grado patogénico de estos microorganismos (Guerra et al., 2013, p. 20).

Las técnicas antes mencionadas pueden resultar laboriosas, y la utilización de medios selectivos y la compra de insumos para realizarlas pueden ser de alto costo. Es por ello que se hace necesaria la implementación de métodos de identificación molecular, con mayor grado de especificidad y sensibilidad que aporten de alguna forma al desarrollo sustentable de la apicultura en el Ecuador (Waite et al., 2003).

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo general.

- Estandarizar una PCR múltiple para la identificación simultánea de *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* y *Ascosphaera apis* en abejas del Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos.

- Implementar y optimizar el protocolo de extracción de ADN a partir de crías o larvas de abejas.
- Optimizar las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.
- Determinar la especificidad y sensibilidad analítica de la técnica estandarizada.

1.4 Justificación de la investigación.

Además de polinizadoras de numerosas plantas, las abejas de la especie *A. mellifera*, conocidas comúnmente como abejas melíferas, están presentes en prácticamente todo el mundo, y el Ecuador no es la excepción para la obtención de innumerables productos de interés. En nuestro país la práctica apícola genera divisas para los apicultores, no sólo con la comercialización de los productos directos de las abejas, como la apitoxina, cera, mermelada real, miel, polen y el propóleo entre otros, sino también con el alquiler de colonias para la polinización de cultivos agrícolas que dependen o se benefician de la acción de estos insectos. Actualmente, el papel ecológico como económico que las abejas representan, se ha estado viendo afectado por la disminución de estos polinizadores. Esta reducción puede ser explicada o comprendida parcialmente por la acción antrópica o por varios factores que aún permanecen desconocidos.

En este contexto, cabe destacar que las pérdidas de abejas (himenóptera: Apidae) e inclusive la disminución de colmenas, afectan de manera directa, ya que tienen grandes repercusiones en la producción de miel y en la polinización. Esto conlleva al aumento de gastos y por consiguiente, las pérdidas monetarias para el apicultor, obteniendo un negocio improductivo. La polinización de cultivos ayuda a que exista un equilibrio dentro del mundo animal y vegetal, en donde se estima que en algunos países estos insectos son los responsables del incremento de producción de alimentos de hasta un 87% a través de la polinización de cultivos de interés económico. Además, las abejas desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la biodiversidad de grandes zonas ecuatorianas, por lo tanto, la alta tasa de mortalidad que las abejas representan, debe ser un factor crucial para implementar nuevas metodologías de identificación de enfermedades y desarrollar procedimientos idóneos para las mismas (Wallder, 1998; Brabdear, 2005).

Por lo antes expuesto, la importancia del estudio se centra en el desarrollo de un método molecular e investigativo basado en la estandarización de una técnica ya establecida como lo es la PCR. En el Ecuador actualmente, no se emplea este tipo de metodología para la identificación de bacterias y hongos en abejas melíferas, como en varios países en donde se utiliza la PCR multiplex con cebadores específicos. La aplicación de esta técnica permitirá reducir costos y tiempo para la identificación temprana de patógenos causantes de las principales enfermedades que afectan a la apicultura, evitando la comercialización o diseminación de las mismas si estuviesen infectadas.

2 Marco teórico

2.1 Abejas

Las abejas pertenecen a la clase insecta, al orden Himenópteros y a la familia Apidae. Están organizadas en sociedades reales, complejas y rígidamente reguladas. En particular, las abejas han sido de gran importancia para el medio ambiente, gracias a las sustancias beneficiosas y útiles que producen y en gran medida a la fertilización de muchas plantas. Además, pueden intercambiar información altamente precisa a través de un sistema de comunicación muy complejo para la ubicación de alimento (Nates, 2005, pp. 7-13). A continuación, se describe la clasificación taxonómica (tabla 1).

Tabla 1.

Taxonomía de la abeja

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Hymenoptera
Suborden	Apocrita
Superfamilia	Apoidea
Familia	Apidae
Subfamilia	Apinae
Género	<i>Apis</i>

Adaptado de NCBI taxonomy, 2017.

2.1.1 Especies de abejas.

Se han descrito alrededor de 43.000 especies tanto de abejorros como de abejas, donde también están incluidas las abejas parasitarias así, como las que viven en sociedad y las solitarias. Dentro de este género se incluyen 9 especies de abejas melíferas (Lino, Báo, y Dolder, 2000).

Por otra parte cabe mencionar que la morfología de las abejas no tiene grandes diferencias, por lo que una anatomía general de las abejas según especie, género e incluso a nivel jerárquico no varían significativamente. La gran diferencia que se puede evidenciar es entre la abeja hembra (reina y nodriza) y la abeja macho (zángano) por sus gónadas sexuales. Por esta razón la morfología de una abeja se basa en la cabeza, alas, abdomen, patas delanteras y traseras (figura 1) (Fonta, Sun, & Masson, 1993).

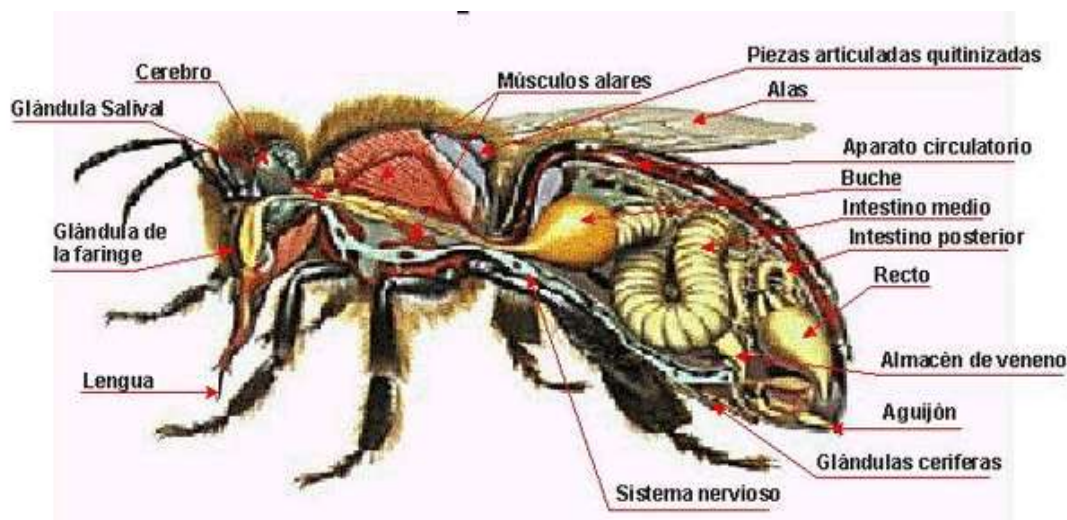


Figura 1. Morfología y anatomía general de una abeja nodriza.

Tomado de Fonta, Sun, y Masson, 1993.

Estas especies pueden ser clasificadas en 3 grupos (figura 2), según la función de comportamiento de anidación y tamaño:

Grupo 1: Las que anidan con panales paralelos en áreas naturales cerradas, por ejemplo, en cavidades de árboles. Esto ha sido aprovechado por los seres

humanos para sus intereses económicos y poder reproducir colmenas en espacios cerrados. Dentro de este grupo se encuentran *A. koschevnikovi*, *A. nigrocincta*, *A. nuluensis*, *A. mellifera* y *A. cerana*, siendo las dos últimas las más utilizadas para la apicultura.

Grupo 2: En este grupo se clasifican, las abejas que anidan en espacios abiertos, por ejemplo en superficies de rocas o ramas de árboles. Dentro de este grupo se encuentran las abejas extremadamente pequeñas como *A. florea* y *A. adeniformis*.

Grupo 3: En este grupo se clasifican las abejas de gran tamaño tales como *A. dorsata* y *A. laboriosa* (Lino, Báó, y Dolder, 2000).

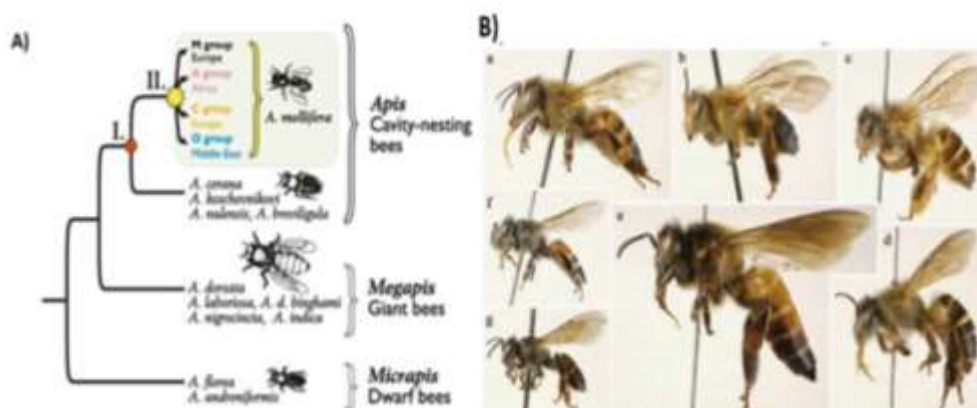


Figura 2. Especies de abejas.

Adaptado de Ugajin y Takayuki, 2016.

- a) *A. mellifera*,
- b) *A. koschevnikovi*,
- c) *A. nigrocincta*,
- d) *A. cerana*,
- e) *A. dorsata*,
- f) *A. florea*,
- g) *A. adeniformis*.

2.1.2 Biogeografía de las abejas.

La gran mayoría de los trópicos en el mundo fueron parte del gran continente austral de Gondwana. Actualmente estos fragmentos continentales, que más tarde se convirtieron en islas tales, como la India y Madagascar, alguna vez estuvieron cerca de África, la Antártida y Australia. Después, las tres comenzaron

a separarse de Gondwana antes de que África Central fuese separada de América del Sur (Michener, 1980).

Es por ello que recientemente se obtuvieron datos biogeográficos donde indican que el origen de las abejas se evidencia por el cretácico medio, hace aproximadamente 120 millones de años en Norteamérica. Actualmente, se llegó a esta conclusión porque se encontró un fósil del cretáceo de una abeja de la especie *A. melipona* de hace 80 millones de años en territorio americano. Así mismo, encontraron fósiles con características iguales del género *melipona* envueltas en ámbar de árbol en Australia y en las costas de América del Sur (Ruttner, 1991) .

Estudios recientes revelan que las abejas *meliponas* o también llamadas abejas sin aguijón, sirven como un claro ejemplo de abejas que tuvieron la oportunidad de dispersarse a nivel global. Sobre la base de las consideraciones anteriores el género *melipona* evidencia su amplia distribución antes del cretácico tardío, es decir cuando todavía existían uniones o brechas continentales entre América del Sur, Australia y África (Almeida, Pie, Brady, y Danforth, 2007).

Es por ello que, esta especie puede encontrarse a nivel mundial debido a una distribución disyuntiva, resultado de una deriva continental. Las especies de abejas sin aguijón de América del Sur, Australia e Irán son grupos de himenópteros con características similares, pero con subgéneros diferentes, evidenciando así otra razón de que su origen data desde hace millones de años y de lugares específicos con evoluciones diferenciadas. Dentro de estas similitudes se deben incluir también a grupos de abejas de las zonas neotropicales de ciertos países y del este Asiático. Este estudio sugiere que las abejas del género *Apis* son originarias de Sudamérica, pero diversos argumentos tales como la distribución geográfica y derivas continentales proponen que su centro de origen proviene de África (Almeida, Pie, Brady, y Danforth, 2007).

Posteriormente, Ruttner, F. (1991) realizó estudios de comportamiento y anidación, donde concluyó que los himenópteros de las familias Bombinae y

Meliponinae, son los parientes más cercanos a la especie *Apis mellifera*, observando características tales como recolección de miel, anidación en lugares al aire libre o cerrados, trabajo en equipo y la divergencia de características morfológicas de las abejas nodrizas. Sin embargo, ambos grupos evolucionaron de forma independiente con un comportamiento eusocial. También se menciona que no se ha encontrado una especie primitiva de *A. mellifera* para poder estudiar su evolución a través de los años, en comparación con abejas del género melipona.

Es por esta razón que se han realizado diversos estudios sobre la diversificación de abejas de la tribu *meliponini*, para tener un mayor entendimiento o reseña evolutiva de la evolución de las abejas melíferas. Sin embargo, estos datos no proporcionan mayor claridad del ciclo evolutivo de *A. mellifera*, ya que hicieron referencia que este tipo de especie de abeja es un híbrido entre una abeja Europea y Africana. Por ende, son más resistentes a desarrollarse o a coexistir en zonas templadas o extremadamente frías en comparación a las abejas meliponas que son susceptibles a vivir en climas templados o fríos. El hábitat propicio para esta especie de abeja sin aguijón son climas tropicales o zonas cálidas para su desarrollo y crecimiento (Patiny & Michez, 2007).

Después de lo anteriormente expuesto, cabe señalar que en Europa encontraron fósiles de abejas meliponas primitivas, con características peculiares, ya que estas tenían aguijón. No obstante, se correlacionó que hace millones de años África estuvo conectada con Europa y por esta razón se logró encontrar este pariente primitivo. Entonces se concluyó que las abejas meliponas tuvieron su origen evolutivo en África, pero se vio impedida de seguir avanzando por las desfavorables condiciones climatológicas y por ende reduciendo la población de las mismas. Por esta razón, permanecieron en zonas tropicales y en partes de Sudamérica, propicias para perpetuar la especie y su evolución (Patiny y Michez, 2007).

En conclusión, *Apis mellifera*, es considerada la abeja evolutivamente más relevante en cuanto a la preservación de su especie. Todo esto debido a la capacidad conductual que esta especie posee dentro de la colonia. Por esta razón se ha estudiado la termorregulación que existe dentro de las colonias de estos insectos eusociales. Este estudio concluyó que la homeostasis de la temperatura de las abejas melíferas tiene un comportamiento bastante similar con los vertebrados de sangre caliente para regular su temperatura. Cabe mencionar que algunas familias tales como Meliponinae, Bombinae entre otras regulan su temperatura con ayuda de abejas nodrizas que llevan agua a la colonia y enfrían a la misma a través de la evaporación (Patiny & Michez, 2007).

Finalmente y después de las consideraciones anteriores, las abejas en cuanto a distribución geográfica se refiere pueden tener un mejor entendimiento por un solo género (*Apis*), el cual tiene mayor expansión a nivel mundial. Originalmente, *A. mellifera* se encontraba en África, al norte de Asia, Europa, Cáucaso, Medio Oriente. Su esparcimiento por el continente americano fue debido a la introducción antrópica de colmenas. Sin embargo, un sinnúmero de sub-especies existen en la actualidad, una de ellas es el híbrido entre *A. mellifera* y *A. scutellata* o mejor conocida como abeja africanizada y esta se encuentra expandida en su mayoría desde América del norte hasta América del Sur. Por el contrario, el resto de especies se encuentran distribuidas por el Oriente próximo hasta el este del continente asiático figura 3 (Michelette y Soares, 1993).

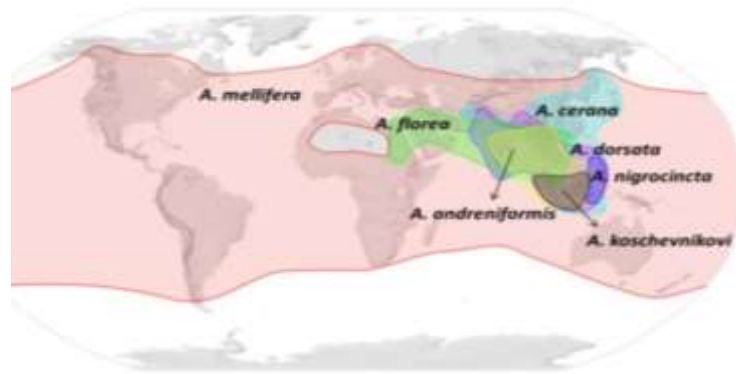


Figura 3. Distribución a nivel global de las especies de abejas del género *Apis*. Adaptado de Fonta, Sun, & Masson, 1993

2.1.3 Biología de las abejas.

La abeja occidental o también conocida como *Apis mellifera*, es una de las pocas especies cuya evolución ha alcanzado su clímax en una sociedad desarrollada. Además de ser insectos que conviven en consorcios, se los conoce por su alto nivel de organización y especialización. Cuando unas poblaciones de abejas descienden de una misma abeja reina, esta se denomina colonia o colmenar. La estructura de insectos eusociales se diferencia por grupos, funciones o llamadas comúnmente “castas”. Existen tres castas: la abeja reina, reproductiva, la abeja obrera y los machos conocidos como zánganos. La abeja reina reproductiva, así como la obrera no reproductiva son hembras y descienden de huevos fecundados por lo que son organismos diploides ($2n$). Por otra parte los machos (zánganos), provienen de huevos no fecundados y por esta razón son organismos haploides (n) (figura 4) (Engel, 1999).

- Abeja reina: Es la hembra fértil o reproductiva, gracias a la cual se sostiene la colonia. Su rol dentro de la misma se basa en la reproducción de la colonia. En los colmenares de abejas sociales, habita una sola reina debido a la producción de feromonas por parte de esta, mantienen unidas al conjunto de abejas y no propician al desarrollo de nuevas reinas. Estas nacen en opérculos especiales dentro del panal denominados "realeras",

los cuales son celdillas alargadas en comparación, al de una abeja obrera. Su alimentación se basa en una secreción que las abejas obreras producen llamada jalea real. Debido a la composición de esta sustancia la reina puede desarrollar de mejor manera su sistema reproductivo y por esta razón tiene un abdomen más largo, en comparación con el resto de la población de la colonia. Es evidente entonces que la abeja reina tiene la disposición de poner huevos fecundados o no fecundados según sea la necesidad de la colmena. Esto gracias a su espermatógena, que le permite tener el control de la fecundación. Si bien pueden vivir hasta los seis años, cada tres años se renuevan de forma natural para la supervivencia de la colonia (Engel, 1999).

- Abeja obrera: Es la casta más grande dentro de una colmena, ya que es la abeja más pequeña dentro de la colmena. Típicamente pueden estar constituidas entre 25.000 a 60.000 abejas trabajadoras. Además, las funciones de esta casta dependen de la edad de las mismas. Cuando eclosiona de la celda, su primera función es ser limpiadoras de las celdillas; después de varios días se convierten en nodrizas que van a ser las encargadas de alimentar a la cría; luego pasan a ser obreras que ayudan con la construcción del panal; seguido de ello pasan a ser almacenadoras del alimento recolectado. Posteriormente, se vuelven ventiladoras que van ayudar a mantener el microclima apropiado de la colmena y finalmente es la de recolectoras que son las encargadas de recolectar agua, polen y néctar de las flores para la supervivencia de la colonia. Sin embargo, hay que mencionar a las guardianas, que son las abejas con mayor edad y se encargan de la protección del colmenar, evitando la entrada de depredadores. La distancia habitual que las abejas realizan para recolectar el polen de flores es alrededor de 2-5 km alrededor de la colmena (Engel, 1999).
- Abeja macho (zángano): Es la casta de menor proporción dentro de la colmena. Su función primordial es la de fecundar a la abeja reina a través de danzas nupciales. Su morfología se distingue por el tamaño de sus ojos y por un abdomen abultado.

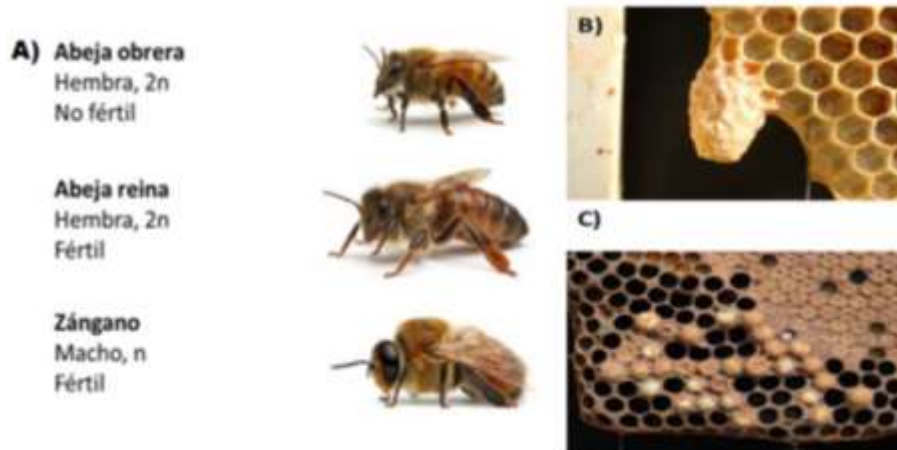


Figura 4. Los tipos de castas y celdas de *Apis mellifera*.

Adaptado de Engel, 1999,

- a) Castas de la abeja melífera.
- b) Celda realera.
- c) Celda de abejas trabajadoras y de zánganos.

2.1.4 Ciclo de desarrollo de las abejas melíferas

El ciclo de vida de las abejas melíferas comienza con la puesta del huevo en el interior de la celda que realiza la abeja reina. Al cuarto o sexto día, el huevo eclosiona formando una larva. Durante este estadio las abejas nodrizas deberán alimentar a la larva hasta el octavo día, en donde esta aumentará de tamaño y se colocará en una posición vertical en el interior de la celda. A la llegada del noveno día, las abejas nodrizas cerraran la celda dando inicio a la metamorfosis. El estadio de pupa a adulta tomará alrededor de 21 días en lo que emerge del opérculo la abeja adulta (figura 5).

Por otra parte, en los zánganos el estadio de desarrollo es diferente, ya que cuando las abejas nodrizas operculan o cierran la celda se da en el décimo día y emergen hasta día 24. En cambio para la abeja reina el ciclo de desarrollo es menos extendido con la duración de aproximadamente 17 días, y tiene lugar en la celda real (figura 4B) (Kauhausen y Ruttner, 1997).



Figura 5. Ciclo de eclosión de las abejas melíferas obreras.

Adaptado de Potts, Biesmeijer y Kremen, 2010.

2.2 Situación ecológica de las abejas.

2.2.1 Ecología de las abejas

Las abejas de la especie *Apis mellifera* es son de las más exitosas en el reino animal. Han poblado el planeta desde hace más de 65 millones de años, colonizando grandes áreas del mundo dentro de un período relativamente corto y sin ayuda del *Homo sapiens*. Además, han atravesado grandes cambios en el planeta como el periodo glacial y hasta hoy en día han sobrevivido. Son insectos en su mayoría independientes, esto debido en gran medida a las condiciones ambientales que ha pasado el planeta para su supervivencia. Por lo tanto, una misma especie es capaz de sobrevivir en regiones típicas semi-desérticas, así como en zonas templadas. (Vincens y Bosch, 2000, pp. 414-419).

De igual manera, habitan ecosistemas o zonas no agrarias, praderas y bosques. Las abejas son un pilar fundamental en el ámbito de la ecología y biodiversidad. Además, son bioindicadores para el mantenimiento y regeneración de los ecosistemas donde ellas se sitúan. (Vincens y Bosch, 2000)

Es por ello, que el fenotipo de las abejas de la especie *A. mellifera* puede variar o diferenciarse en comportamiento, como en morfología. Dentro de esto se incluyen características esenciales tales como el ritmo durante la comunicación, la reacción al frío, la especificidad del aprendizaje y la susceptibilidad a enfermedades (Vanbergen, 2013).

Una investigación realizada por la Universidad de San Diego en California, observó el comportamiento de pecoreo de las abejas en flores endémicas de esa zona y cómo este tipo de conducta tenía algún efecto en su alimentación. Por otra parte, también estudiaron como otro tipo de polinizadores interactuaban con su entorno y competían con las abejas *A. mellifera* para obtener alimento. Sin embargo, al final de la investigación se dieron cuenta que la conducta ecológica de las abejas fue de gran interés ya que ellas no son los únicos animales que se benefician del néctar de las flores y que existe mucha competencia y por ende existe un efecto en todo el sistema y en su conjunto (Murray, Kuhlmann y Potts, 2009).

Murray y Kuhlman en el año 2009, realizaron un estudio para poder comprender las interacciones que existen entre las abejas y las plantas. Cierta tipo de plantas reciben o atraen un mayor número de abejas, en comparación a otras. Esto se debe a las características que la flor posee, tales como el color, el tamaño, simetría, ubicación entre otras. Los resultados mostraron que el color de la flor es un factor fenotípico que las flores poseen para tener un efecto de atracción mayor para las abejas, es decir flores muy brillantes y llamativas. El tamaño y simetría también son característica importante ya que a las abejas les atrae por el volumen y forma similar a las de los panales o colonias. Finalmente la ubicación es otro rasgo importante, debido a que las abejas tienen la capacidad de comunicarse y poder transmitir información específica del lugar de una planta. Es por ello, que ciertas áreas o zonas tienen mayor población de abejas en comparación a otras.

2.2.2 Amenazas de las abejas en la actualidad.

A pesar que la apicultura ha existido desde la antigüedad, sólo a finales del siglo XIX, es cuando comenzó a ser más utilizada por el hombre, convirtiéndose en una actividad más intensiva. La intensificación condujo a un incremento del número de colmenas para el aprovechamiento de sus productos, por lo que los problemas zoonos sanitarios se hicieron más visibles y comunes (Potts, Biesmeijer, & Kremen, 2010).

Asimismo, en las últimas décadas, y en todos los continentes a excepción de la Antártida, se ha registrado la disminución de las poblaciones, comunidades y especies de abejas en los ecosistemas agrícolas y áreas naturales, lo que constituye un gran problema de interés ecológico (Potts, Biesmeijer, y Kremen, 2010).

Posteriormente, una investigación acerca de la conservación de las abejas, llevado a cabo por Rader y Murray, (2009) analizaron datos acerca de cómo ciertos ecosistemas afectados por el clima tienen repercusiones y amenazas en la diversidad de las abejas. Actualmente, estos insectos están en peligro de extinción debido a factores antropogénicos. Por otra parte, utilizaron un parámetro muy importante denominado la autoecología, para predecir la conservación de los himenópteros. Este estudia las adaptaciones evolutivas y permite calcular parámetros específicos, en donde pueden predecir el posible declive de una especie, por medio de “análisis de viabilidad poblacional” (por su siglas en inglés *Population Viability Analysis, PVA*).

De igual manera, otra de las causas para la desaparición de las abejas es la inadecuada nutrición que poseen. Esto inicia cuando las abejas se preparan para la hibernación y los recursos naturales para la sobrevivencia cuando escasean. Una vez pasada la hibernación y si las abejas no han recolectado suficientes alimentos, estas mueren dentro de la celdilla del panal. La nutrición inadecuada que las abejas poseen hoy en día se debe al aumento de monocultivos, por lo

tanto su dieta es deficiente y esto provoca efectos negativos en su salud, principalmente sobre su sistema inmune, ya que se ha visto que su dieta está basada en aminoácidos y es primordial para la vida de estos insectos (Brodschneider y Crailsheim, 2010).

Por otra parte, el uso de sustancias químicas es un claro ejemplo de cómo la actividad humana contribuye a la muerte de muerte de abejas e inicia a partir de la agricultura moderna con el uso de sustancias químicas para controlar las plagas de los cultivos. Estas quedan expuestas a estos productos químicos a través del pecoreo que ellas realizan para alimentar a la colonia. Se ha estudiado distintos compuestos, tales como herbicidas, pesticidas e insecticidas que actúan sobre las abejas y se corroboró analizando los datos para entender que estas sustancias pueden generar efectos crónicos, agudos o sub-letales, además de observar cambios en el comportamiento, parálisis y desorientación en la ubicación de su colmena (RAPAM, 2017) .

Recientemente, estudios realizados en Norte América han demostrado que en los últimos 22 años, la abundancia relativa de ciertos tipos de himenópteros de la familia Apidae en América del Norte disminuyó en un 96%. Encontraron que las causas de la llamada "crisis polinizadora" se basa en el conjunto de ciertos parámetros, tales como la entrada de especies portadoras de nuevos parásitos a los polinizadores nativos. Esto debido a la trashumancia y alquiler de colmenas que se dan entre estados, países e inclusive entre continentes. La introducción de ciertas plantas invasoras que alteran la composición de la flora endémica, así como la deforestación, monocultivos que favorecen a la economía agrícola de la comunidad, pero perjudica a la abejas en cuanto a su alimentación y por último, el uso intensivo de agroquímicos (Ugajin y Takayuki, 2016).

Por otra parte, se debe hacer referencia al fenómeno del "Síndrome de Despoblación de Colmenas" por su abreviatura en inglés *SDC* o *CCD*, el cual se caracteriza por:

- La notable observación de abejas (obreras) muertas en el interior y alrededor del colmenar afectado.
- Un exceso de larvas en comparación con la población adulta.
- Baja reducción de especies invasoras (polilla de cera) y falta de cleptoparasitismo de colonias que se encuentran alrededor.



Figura 6. Cuadros de colmenas sanos vs enfermos. Izquierda cuadro sano. Derecha cuadro con sintomatología SDC. Se observa mayor prevalencia de cría o larva en comparación a población de abeja adulta.

Adaptado de Ugajin y Takayuki, 2016.

Finalmente, la existencia de un síndrome poco estudiado y de gran impacto sobre las abejas el denominado “síndrome de pérdidas invernales”, el cual provoca muertes o colapso de colonias de abejas melíferas. Sin embargo, aunque existe diferencia entre estos dos fenómenos, los aspectos en común tanto para el SDC y “pérdidas invernales”, es que no se le hace atribución a ninguna enfermedad conocida hasta el momento. (Ugajin y Takayuki, 2016).

2.3 La Apicultura

Se define como una actividad que utiliza y aprovecha a las abejas y/o productos derivados. El termino apicultura viene del vocablo, apis: abeja y cultura: cultivo. Los primeros indicios de la utilización de las abejas por parte del hombre se dan desde la era de mesolítico, con evidencia de pinturas paleolíticas que muestran

recolección de mieles a partir de colmenares silvestres. El pleno auge de la civilización hace millones de años, el ser humano comenzó con la domesticación de colmenas para sus propios intereses. Esta cúspide de crianza y domesticación inicio en recipientes de barro así como en vasijas de mimbre, tal como lo muestran ciertos jeroglíficos encontrados del año 2.600 a.C en el Medio Oriente y partes del continente Asiático (Evans & Schwarz, 2011).

Gracias a la expansión de las grandes civilizaciones, esto trajo consigo nuevos conocimientos para el mantenimiento y domesticación de colmenas por parte del hombre. A estas personas se les acuño el nombre de apicultores, ya que su labor de trabajo era a partir del aprovechamiento de estos himenópteros (Rosero, 2012).

Cabe agregar que durante los avances en manejos de colmenas se diferenciaron a dos tipos de apicultura: La apicultura trashumante y la apicultura estante. En apicultura trashumante las colmenas permanecen en constante movimiento o desplazadas a diferentes áreas para aprovechar las floraciones durante todo el año y los cambios climatológicos. En cambio, en apicultura estante las colmenas eran trasladadas a un sitio específico en donde tenían que permanecer inmóviles todo el año, en ambos casos, la apicultura era plenamente dependiente del clima de la zona lo cual constituye un problema en la actualidad. (Evans & Schwarz, 2011).

2.3.1 La Apicultura en el Ecuador.

La apicultura en el estado Ecuatoriano comenzó desde que se introdujeron ejemplares europeas traídas desde Francia. Estas abejas europeas se donaron a una iglesia en la ciudad de Cuenca, a los hermanos cristianos en el año de 1985. Según el ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), no existen datos completos y seguros que corroboren el inicio de la apicultura en el Ecuador.

Sin embargo, hallazgos recientes indican que la domesticación de abejas para fines económicos independientes, se logró con la llegada de la abeja africanizada a Ecuador en el año 1976. Esto tuvo como resultado a un híbrido resistente y con mayor obtención de productos apícolas (Cabrera, 2012).

Actualmente, el Ecuador se está proyectando para ingresar al mercado internacional, con el objetivo de exportar miel de calidad, ya que tiene gran potencial para la apicultura. Cabe destacar que el Ecuador tiene aproximadamente 200 mil colmenas y hoy en día solo se están aprovechando o explotando 936, las cuales se encuentran por todas las zonas ecuatorianas (Cabrera, 2012).

2.4 Patógenos

Existe una amplia gama de patógenos que causan enfermedades a las abejas, entre las cuales tenemos bacterias, hongos, parásitos y virus (figura 7). La gran mayoría de estos microorganismos se encuentran en el interior de la colmena, por lo que se necesita de una gran variedad de factores para tener un desequilibrio entre el hospedador y huésped, y dar paso a un efecto negativo en la colonia (Evans & Schwarz, 2011) .

Posteriormente, Linares y Martínez en el año 2005, investigaron como ciertos patógenos pueden sobrevivir, alimentarse y desarrollarse en el interior de hospederos, sin causarle alguna clase de afección. Además, que no presentan ninguna sintomatología positiva de la enfermedad, es decir que existe una especie de simbiosis entre huésped-hospedador. A este tipo de microorganismos se los conoce como patógenos de virulencia oportunista. Por esta razón, algunos microorganismos tales como bacterias, hongos y parásitos, entre otros, son estudiados para encontrar que clase de mecanismos utilizan para su supervivencia tanto, para el huésped como para el hospedador (Pemán & Salavert, 2012).

No obstante, existe un sinnúmero de factores a tomar en cuenta para que este tipo de microorganismos manifieste su virulencia, ya que está presente pero no se expresan debido a las condiciones ambientales donde inició su ciclo de desarrollo. Es por ello, que se ha visto que tanto *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* y *Ascosphaera apis*, son microorganismos oportunistas, es decir que están presentes en las colmenas, pero sus características o factores de virulencia no se expresan sino existen las condiciones abióticas propicias para su manifestación. Una vez que se presentan estas condiciones, la infección por parte de cada uno de ellos prolifera. En este caso a las abejas tanto en su estadio larvario como en adulta se ven igualmente afectadas (Linares & Matínez, 2005).

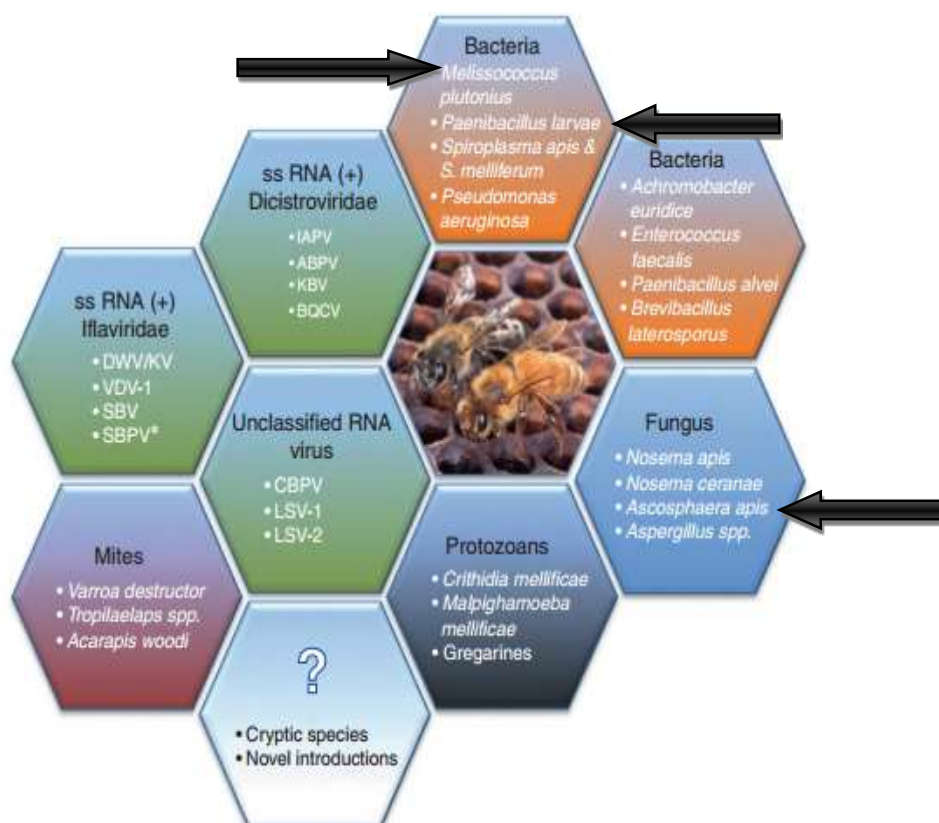


Figura 7. Esquema de las principales enfermedades de las abejas con sus agentes etiológicos en donde las flechas ayudan a la visualización de los principales patógenos que afectan a las abejas del Ecuador.

Adaptado de Evans y Schwarz, 2011.

2.4.1 Patógenos importantes en el Ecuador.

Por otra parte, los únicos estudios o básicamente los censos acerca de la enfermedades de las abejas han sido realizados, por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD). En ningún otro centro de investigación se ha efectuado esta clase de estudios. Sin embargo, desde el año 2014 “Agrocalidad” emprendió la realización del primer catastro de enfermedades apícolas del Ecuador (tabla 2):

Tabla 2

Principales enfermedades apícolas en el Ecuador, según la etapa de desarrollo de la abeja junto con su agente etiológico y la prevalencia.

Nombre común	Nombre científico	Naturaleza del agente causal	Etapa de la biología de la abeja en que se presenta	Ocurrencia en Ecuador
Varroa	<i>Varroa destructor</i>	Ácaro	Crías y Adultos	Presente
Acariosis	<i>Acarapis woodi</i>	Ácaro	Adultos	Presente
Nosema	<i>Nosema apis</i>	Protozoo	Adultos	Presente
Amebiasis	<i>Malpighamoeba mellifica</i>	Protozoo	Adultos	Presente
Loque Americana	<i>Paenibacillus larvae</i>	Bacteria	Crías	Presente
Cría tiza	<i>Ascosphaera apis</i>	Hongo	Crías	Presente
Piojo	<i>Braula coeca</i>	Insecto	Adultos	Presente
Loque Europea	<i>Melissococcus plutonius</i>	Bacteria	Crías	Presente
Pequeño escarbajo de la colmena	<i>Aethina tumida</i>	Insecto	Crías	Ausente
Ácaro asiático	<i>Tropilaelaps clareae</i>	Ácaro	Crías	Ausente

Tomado de Rosero, 2014.

Cabe mencionar que la particularidad que los patógenos poseen es su acción antropogénica, es decir cuando está presente la intervención del hombre. Se logra a partir de que ciertos microorganismos patogénicos, tienen la capacidad de atacar en momentos definidos del ciclo de eclosión de las abejas melíferas tanto en la cría como en la abeja adulta (Figura 8).



Figura 8. Enfermedades de las abejas según el ciclo de eclosión de abejas melíferas.

Tomado de Beeman, 2015

2.4.2 Enfermedades Fúngicas

Las enfermedades fúngicas que atacan a las colmenas de abejas son un factor fundamental para el colapso de estas. Pueden perjudicar la producción apícola y reducir los niveles de producción de miel y propóleo con cuantiosas pérdidas significativas entre (10-45%). Recientemente se han realizado estudios epidemiológicos, en donde observaron como las enfermedades fúngicas atacan de manera significativa a la colmena por factores como la falta de alimentación y la humedad excesiva y por ende están apuntando a una mayor propagación de estas enfermedades fúngicas a nivel global, donde se ven afectadas las colonias de abejas. No obstante, uno de los agentes etiológicos de origen fúngico y con mayor prevalencia es *Ascosphaera apis*. Por otra parte, también existen otros microorganismos capaces de atacar a las abejas tales como *Aspergillus flavus* y *Nosema* spp (Evans, 2015).

2.4.2.1 *Ascosphaera apis*

Es un hongo filamentoso y entomopatógeno, perteneciente al orden Ascospherales y a la familia Ascosphaeraceae. También conocido comúnmente como “cría momificada”. Esta enfermedad fúngica denominada ascosferosis, solo tiene repercusión virulenta en la cría o larva de abejas melíferas. Debido a que esta patología solo ataca durante su estadio larvario, puede provocar reducción en la población de la colmena y por lo tanto reduce la producción de sus productos de interés para el hombre tales como la miel, propóleo, cera. Además bajo ciertas circunstancias y factores ambientales tales como la humedad y temperatura, pueden llegar a matar a la colmena. Por esta razón esta enfermedad se ha convertido en un importante factor en la pérdida de productividad de las colmenas (Aronstein y Murray, 2010).

Las esporas se transmiten por vía oral desde la abeja nodriza, la cual es la encargada de la alimentación hasta la larva; y por otra parte se puede contaminar el material apícola. Esta enfermedad por lo general se produce en situaciones de estrés de la colmena tales como bajas temperaturas, humedad excesiva, y altas cargas de patógenos como el acaro *Varroa destructor*. También está asociada a situaciones que conllevan a la inmunosupresión (James & Skinner, 2005).

Una vez que las larvas introducen las esporas por el alimento, estas son capaces de producir una respuesta inmune en contra de la infección. Sí la larva llega a morir a causa de esta enfermedad, estas se vuelven duras y secas en el interior de la celda producto del crecimiento del hongo (Aronstein y Murray, 2010).

Por otro lado, la morfología del hongo se basa en el crecimiento de un micelio blanco, esponjoso y denso. Este formado por hifas aéreas, sub-superficiales y superficiales. Las hifas son septadas y tienen un tamaño que oscila entre 2.7 y 7.8 μm de diámetro, y presentan una singular ramificación con forma dicotómica. Cuando se disgrega una hifa, el tabique tiene la función de darle cierta rigidez

física, y por ende limita la pérdida de citoplasma. Todos los tabiques tienen un poro que le ayuda con el movimiento del citoplasma y algunos núcleos pequeños entre las células vegetativas (James & Skinner, 2005).

2.4.2.1.1 Patología de infección.

Las esporas de este hongo *Ascosphaera apis* son producidas sexualmente y son llamadas ascosporas. James y Skinner (2005, pp. 98-103), realizaron estudios donde mencionaron dos métodos de infección. Primeramente, que el hongo atravesaba la cutícula que recubre el cuerpo de la larva, y por la ingestión de esporas a partir de alimento contaminado. Sin embargo, lograron evidenciar que el hongo no podía crecer en la superficie de la cutícula larvaria. No obstante, lograron encontrar el método de infección y dijeron que iniciaba con la ingesta de las esporas. Cabe mencionar que *A. apis* puede infectar a todas las castas de las abejas (nodriza, reina y zángano) pero solo en su estadio de larva (Evison, 2015).

Por lo tanto, las larvas son más susceptibles a esta enfermedad en los días 3 y 4 de su desarrollo. Como las esporas pueden estar presentes y acumularse en todo el interior de la colmena, estas pueden sobrevivir aproximadamente 15 años hasta que exista un desequilibrio en el nido y poder así propagarse (Evison, 2015), por último, las esporas que son consumidas por las larvas a partir de alimento contaminado, ingresan por el tracto digestivo donde germinan y se instalan en la luz del tracto gastrointestinal, donde son activadas por el CO₂ presente.

Posteriormente, cuando las esporas son activadas estas comienzan con un proceso bioquímico para producir enzimas que le van a ayudar al patógeno para poder ingresar al intestino medio y penetrar la membrana peritrópica de las larvas de abejas. Una vez penetrada la pared intestinal, el micelio del hongo comienza su desarrollo en la cavidad intestinal en donde interrumpen varias funciones tales como enzimáticas y mecánicas, por ejemplo, la paralización de la circulación de

la hemolinfa. Finalmente comienza el crecimiento vegetativo del hongo y este envuelve a la larva desde el extremo superior hasta el extremo inferior, recubriendo a toda la cría, dándole un aspecto yesoso o momificado figura 9 (Evison, 2015).



Figura 9. Sintomatología de *Ascospaera apis*.

Adaptado de Aronstein y Murray, 2010.

- a) Larva sana (izquierda) y larva enferma (derecha).
- b) Cuadro de panal enfermo con *A. apis*.
- c) Fotografía de *A. apis*.

2.4.3 Enfermedades Bacterianas.

Aunque se han descrito diversas enfermedades bacterianas, las que son de gran importancia para las colonias se conocen como "loques". Son dos enfermedades conocidas, que afectan en mayor proporción a la abeja en su estadio larvario. Sus agentes etiológicos son *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius* (Ugajin & Takayuki, 2016). Las cuales causan loque americana y loque europea respectivamente.

2.4.3.1 *Paenibacillus larvae*

Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa y esporulada, muy resistente al calor. Gracias a esta característica de formar endoesporas, tolera a temperaturas que están entre los 95 y 130 °C por largos períodos. *P. larvae*, es un bacilo ovalado recto con una longitud de entre 2-7 μm de largo y entre 0.5-0.9 μm de ancho en su forma vegetativa. Posee flagelos peritricos, los cuales le dan la capacidad de movilizarse a través de movimientos brownianos. Su perfil

bioquímico posee catalasa positiva. Por otra parte *P. larvae* tiene un proceso de acidificación ya que obtiene ácido a través de trehalosa y glucosa; puede reducir el nitrato a nitrito; hidroliza la caseína y no es capaz de hidrolizar el almidón (Govan, Allsopp, & Davison, 1999). Adicionalmente tienen la capacidad de resistir a radiaciones UV durante 30 minutos y a agentes químicos para la desinfección. (Alippi, Reynaldi, López, DE Giusti, y Aguilar, 2004).

La patología o enfermedad causada por este microorganismo se denomina Loque americana (por su denominación en inglés American Foulbrood). Es altamente contagiosa en su forma esporulada y capaz de formar endoesporas que se propagan y reproducen rápidamente cuando infectan a una larva, pre-pupa y pupa. Ataca principalmente a las abejas melíferas en su estadio larvario. Por otra parte, también existen estudios realizados por Borracci, Chacana, y Palacio (2004, p. 356), donde encontraron afecciones por esta enfermedad en otras especies *Apis*, tales como *A. florea*, *A. cerana* y *A. dorsata*.

Es una enfermedad que existe a nivel global y que provoca pérdidas económicas y afectan al ecosistema, reduciendo así el número de polinizadores presentes en el ambiente (Borracci, Chacana, & Palacio, 2004).

La diseminación de la enfermedad comienza desde el ingreso de abejas pecoreadoras contaminadas con esporas de *P. larvae* al interior de la colmena. Una vez contaminado el alimento, este se disipa por toda la colmena y en gran medida a las larvas, ya que estas son alimentadas con jalea real la cual tiene un pH ácido entre 3.5 y 4.3, lo que favorece al contagio de las larvas a través de la ingesta de jalea real, produciendo la muerte de las mismas (Alippi y Aguilar, 2015).

2.4.3.1.1 Identificación y aislamiento.

La identificación temprana de esta enfermedad es de gran interés esto debido, a las enormes pérdidas que puede representar esta patología. Por esta razón, la

implementación de un procedimiento rápido y eficaz para el diagnóstico es de gran utilidad (Alippi, Reynaldi, López, DE Giusti, & Aguilar, 2004).

En la actualidad, las técnicas más empleadas para la detección, se basan en cultivos, microscopia y tinción Gram. A continuación se mencionan ciertas pruebas de laboratorio para evaluar la carga patogénica de *P. larvae* (Evans & Schwarz, 2011).

- Técnica de microscopia (Hanging drop): Se basa en la utilización de restos larvales y en observar el movimiento browniano de las endoesporas. Se prepara una mezcla de larvas muertas con sintomatología clínica supuestamente positiva y se tiñe con fucsina fenicada. Finalmente, por medio del microscopio se evidencia este particular movimiento browniano, para dar como resultado la presencia de *P. larvae*. Sin embargo, De Graff, Antúnez, y Aronstein, (2015) mencionan que esta técnica es deficiente, ya que la imagen creada por el microscopio óptico se mezcla con el fondo, se vuelve uniforme y carece de detalles para dar un resultado positivo.
- Técnicas de cultivo: Se basan en la utilización de compuestos o medios propicios para el crecimiento del microorganismo. Un ejemplo de medios básicos para el aislamiento de *P. larvae* es el medio PLA (*Paenibacillus larvae* Agar), el cual utiliza ácido nalidíxico y pipemídico como antibióticos en contra de bacterias Gram negativas, (De Graff, Antúnez, & Aronstein, 2015). Sin embargo, algunos de estos medios de cultivo son extremadamente selectivos, lo que al final aumenta su costo.
- Tinción Gram: Se fundamenta en la utilización de colorantes para teñir los componentes celulares de un microorganismo y permite observar a las bacterias, dependiendo de la morfología y estructuras celulares (De Graff, Antúnez, & Aronstein, 2015).

2.4.3.1.2 Patología de la infección.

La infección comienza con la ingesta oral de esporas cuando las abejas están en su estadio de larva y pupa (6-12 días). Una vez que ingresan al tracto intestinal anterior, se mueven al intestino posterior de la larva donde germinan después de 15 horas. Govan, Allsopp, y Davinson en 1999, mencionan que una vez que germinan y pasan a su fase vegetativa, estas penetran el epitelio del intestino por medio de fagocitosis. Sin embargo, Genersh, (2010) por medio de la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) encontró que las bacterias en su estadio vegetativo colonizan el intestino medio y se reproducen masivamente, sin la necesidad de penetrar el epitelio y que no exista muerte del hospedero.

Por otra parte, Genersh, (2010) evidenció que *P. larvae* posee ciertas enzimas que ayudan durante la infección, sin que el huésped presente alguna molestia, tales como las fosfato-pentosas que pueden metabolizar carbohidratos y algunos azúcares (glucosa y fructosa). Estas enzimas ayudan al patógeno en su crecimiento vegetativo para que se sigan reproduciendo e infectando a la larva.

El intestino de la larva y de la pupa está recubierto por una membrana peritrófica, que le ayuda a soportar la masa bacteriana presente en el lumen del intestino medio. Por otra parte *P. larvae* secreta algunas proteasas que tienen como función romper la integridad de la membrana epitelial de la estructura célula-matriz y así invadir la cavidad corporal del invertebrado, donde está contenido el fluido circulatorio, el cual usan para migrar y proliferar (Cassidy, Goszczynska, y Burnet, 2015).

Finalmente, la degradación de esta capa protectora (membrana epitelial) cede por la acumulación masiva de masa bacteriana. Inmediatamente las bacterias migran hacia la epidermis larvaria en su estado vegetativo antes de que muera la larva. Posteriormente, comienza el proceso de esporulación para que estas

puedan diseminarse por toda la colmena para que otro huésped se infecte y dar paso a un nuevo proceso infeccioso de la larva y pupa (Genersh, 2010).

Un indicativo de que el patógeno ha infectado la colmena es el cambio de color de las larvas, que pasan de un color blanco característico a un color café oscuro o castaño, además de la presencia de una sustancia viscosa que constituye el indicador principal de la enfermedad en campo. Pudiendo observar que sus hebras alcanzan hasta los 3 centímetros de largo (figura 10).

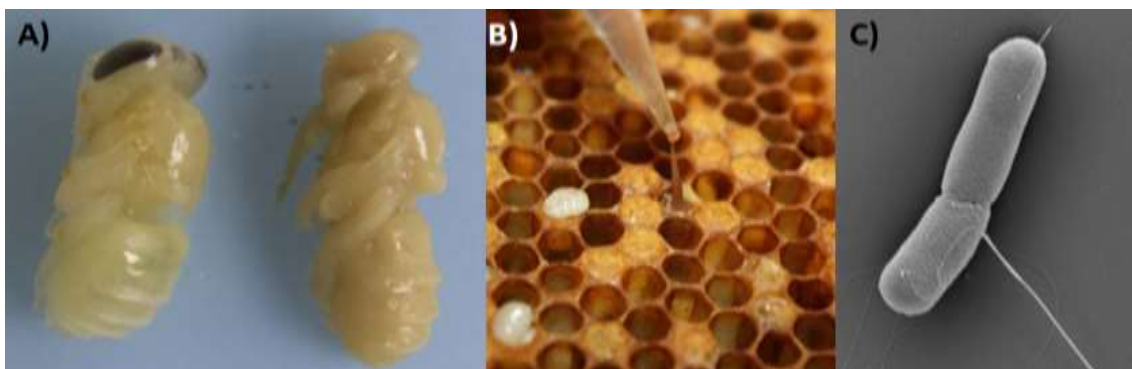


Figura 10. Sintomatología de *Paenibacillus larvae*.

Adaptado de Genersh, 2010.

- a) Pupa sana (izquierda) y pupa enferma con loque americana (derecha).
- b) Pupa o larva muerta en el interior de la celda, prueba del palillo con formación de hebra.
- c) Fotografía tomada a través del microscopio electrónico de la morfología de *P. larvae*.

2.4.3.2 *Melissococcus plutonius*.

Es una bacteria Gram positiva, anaerobia estricta, no esporulada característica por la cual se considera menos contagiosa que *Paenibacillus larvae*. Además, es un coco lanceolado no móviles con una longitud de 0.6-0.8 μm de largo y 0.9-1.3 μm de ancho. Su desarrollo puede encontrarse en pares, es decir diplococo o formando cadenas. Su perfil bioquímico posee actividad catalasa y β -galactosidasa negativa. Tienen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa y D-manosa para obtener energía para su crecimiento y desarrollo (Forsgren, 2010). Posee ciertas características de resistencia en ambientes disgenésicos, es decir, tiene la capacidad de resistir grandes períodos de desecación y tiempos prolongados a exposición solar (20 horas); resistencia notable a condiciones ambientales de putrefacción (27 días) y a los pH ácidos de la jalea real. Cabe

mencionar que su eliminación es lenta cuando se le aplica algún tipo de antiséptico.

La enfermedad es causada por este microorganismo y se denomina Loque Europea o loque benigna (por su denominación en inglés European Foulbrood). También se la conoce como larva pútrida o cría avinagrada, considerada una enfermedad polibacteriana. Se encuentra en el puesto número dos de afecciones más importantes que atacan a las abejas melíferas. De igual manera que loque americana ataca a la abeja en su estadio larvario, provocando grandes afecciones por el despoblamiento de colmenas. Por otra parte, Forsgren y colaboradores en el año 2005 encontraron que *M. plutonius* había acabado con el 68% de colmenas en Suiza, dando a conocer que este microorganismo patógeno ataca a la larva y pupa. Para todo lo anteriormente mencionado, deberán existir las condiciones óptimas para su desarrollo. Es por ello que esta enfermedad tiene mayor incidencia en zonas frías y lluviosas, en donde existe escasez de alimento, limitado por la baja disponibilidad de flores (néctar) (Forsgren, Lundhagen, & Imdorf, 2005).

Es una enfermedad que se está extendiendo a nivel mundial, dejando graves daños a los ecosistemas donde se presenta. Aunque sea más fácil de controlar comparada con *P. larvae*, las condiciones ambientales donde prolifera le ayudan a que sea resistente y den paso al colapso del colmenar y es así como su índice epidemiológico en diversos países incrementa con el transcurso de los años (Ansari, Ghamdi, & Nuru, 2016).

Al igual que *P. larvae*, la diseminación de esta patología bacteriana empieza por la ingesta de alimento contaminado, y esta a su vez por el ingreso de abejas pecoreadoras invasoras de otras colmenas, que sufrieron el colapso del colmenar debido a *M. plutonius* (De Graff, Antúnez, & Aronstein, 2015) .

2.4.3.2.1 Patología de la infección.

Melissococcus plutonius tiene afecciones sobre las larvas de cualquier casta (nodriza, reina y zángano). Esta patología bacteriana ataca durante los días 3 y 4 de la larva, después de la eclosión del huevo. La larva ingiere el alimento contaminado por medio de abejas nodrizas antes que la celda sea operculada. No obstante, Roetschi, Berthoud y Kuhn en el año 2008 menciona que los mecanismo de patogénesis provocada por *M. plutonius* no estan bien definidos o son poco conocidos, ya que ha encontrado otro tipo de bacterias una vez que ataca *M. plutonius*. Sin embargo, se menciona que la infección comienza en el tracto gastrointestinal de la larva y es aquí donde inicia la diseminación de la bacteria por todo sistema digestivo, multiplicándose rápidamente en el estómago, aunque su mecanismo siga siendo desconocido.

Su proliferación empieza en el intestino delgado. Una vez establecidas, las bacterias compiten por los nutrientes con larva y esta a su vez entra en una etapa de inanición. Luego que ha alcanzado su desarrollo completo en el interior de la larva, esta de igual forma atraviesa el epitelio, destruyendo la membrana peritrófica, induciendo la muerte de la cría (Pinnock & Featherstone, 2015).

Un indicativo de que el patógeno ha infectado la colmena es el cambio de color de las larvas, que pasan de un color blanco característico a un color amarillo o marrón, además de la presencia de un olor inusual agrio o fétido que constituye el indicador principal de la enfermedad en campo (figura 11) (Forsgren, 2010).

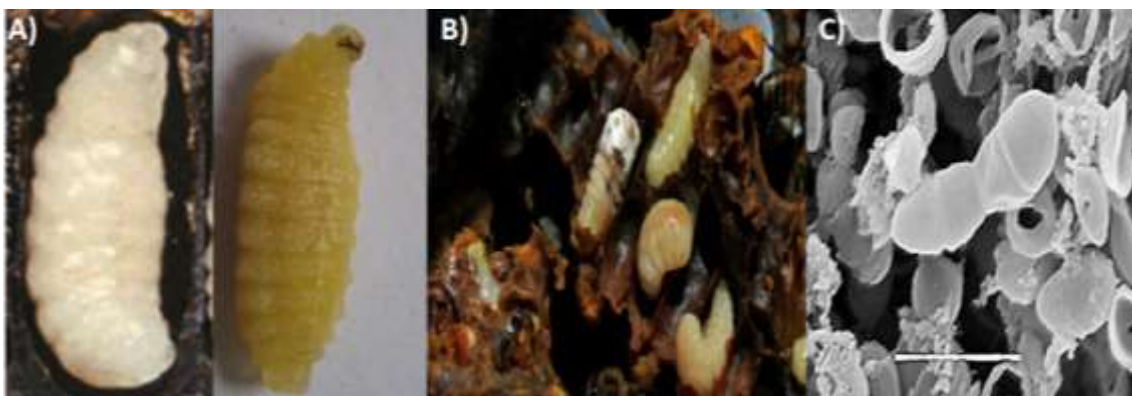


Figura 11. Sintomatología de *Melissococcus plutonius*.

Adaptado de Forsgren, 2010.

- a) Larva sana (izquierda), larva enferma (derecha).
- b) Panal enfermo con loque europea.
- c) Fotografía electrónica de *M. plutonius*.

3 Diseño del plan experimental.

En el presente trabajo de investigación se buscó identificar los tres patógenos más comunes que afecten a las abejas del Ecuador. Para ello, se recolectaron panales a nivel de todas las zonas ecuatorianas. Iniciando con el proyecto, se extrajo el ADN de crías o larvas de abejas a partir de panales con sintomatología clínica positiva desde el campo, para el diagnóstico de las tres enfermedades mediante un método implementado y optimizado con DNAzol (Invitrogen, Alemania). Posteriormente, se cuantificó el ADN obtenido en donde se midió la cantidad y pureza, empleando el equipo Nanodrop 8000 UV Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), luego se realizó la dilución del ADN obtenido dejándolo a 10 ng/ μ L. Posteriormente, se determinó gradientes de temperatura, Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) y cebadores para una correcta amplificación génica sin la presencia de bandas inespecíficas o estructuras secundarias. Para finalmente se analizaron los resultados por medio de la visualización de una electroforesis en geles de agarosa.

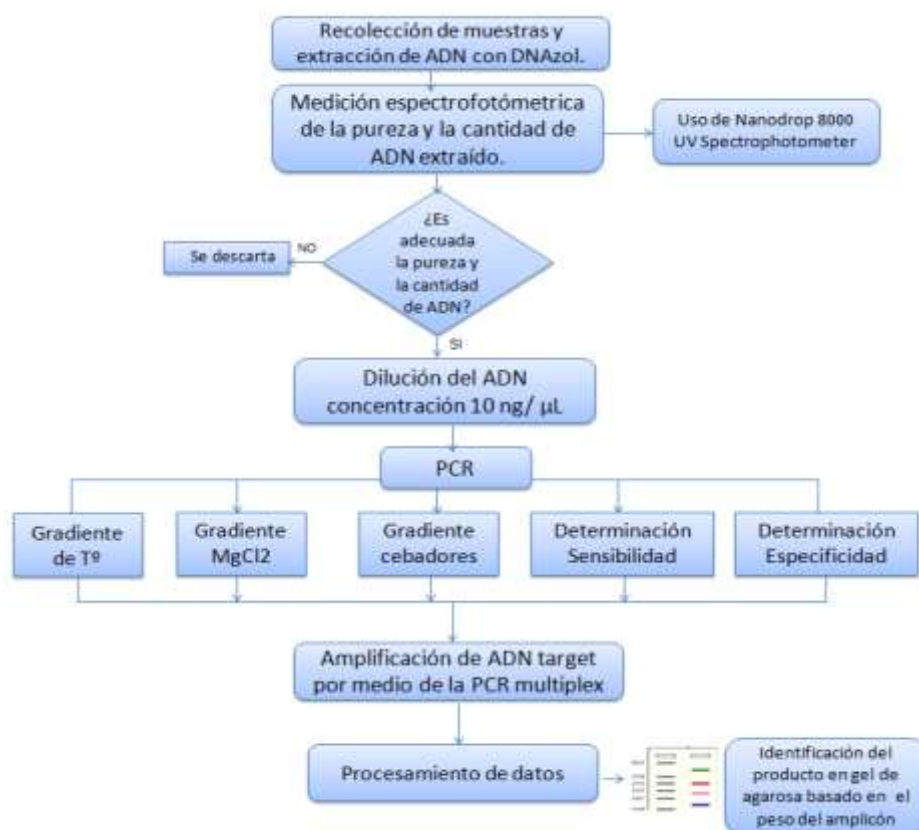


Figura 12. Diagrama de flujo del diseño experimental para la identificación de patógenos en abejas del Ecuador.

4 Procedimientos

4.1 Población y Muestra

La población del estudio consistió en 160 panales (larva o cría), con sintomatología clínica positiva de campo. Los panales a ser analizados proceden de todas las provincias del Ecuador. Todas las muestras se encontraban disponibles en el Banco de muestras de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento del Agro "AGROCALIDAD".

La muestra de estudio que se utilizó fueron panales con sintomatología positiva donde se evidenció el estado de la cría (larva) enferma, los cuales fueron

conservados en refrigeración a -80°C y usados para su posterior identificación de *Ascosphaera apis*, *Melissococcus plutonius* y *Paenibacillus larvae*.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Extracción de ADN y cuantificación

4.2.1.1 Implementación y optimización de un protocolo de extracción de ADN bacteriano y fúngico de crías de abejas mediante DNAzol

El protocolo empleado para la extracción de ADN bacteriano como fúngico, se basa en la utilización de un agente caotrópico DNAzol (Invitrogen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante con ciertas modificaciones (Chomczynski, Mackey, & Drews, 1997; Ligozzi & Fontana, 2003; Guo, Schnieder & Abd-Elsalam, 2005).

La extracción de ADN a partir de crías (larvas) de abejas, inició con la colocación del cuerpo de la larva entera en microtubos de 1.5 mL individualmente para cada patógeno, en el cual se añadieron 300 μL del agente caotrópico DNAzol (Invitrogen, Alemania) y con ayuda de minipistilos se trituró a la larva hasta obtener partículas pequeñas a este paso se incubó a 95°C durante 10 min, únicamente para los patógenos *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*. Para *Melissococcus plutonius* no se realizó este paso. Luego se agregaron 200 μL de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Seguido, se llevó a centrifugación a 12000 rpm durante 15 min a 4°C . Una vez culminada la centrifugación, se tomaron 150 μL del sobrenadante y se agregó un volumen igual de isopropanol. Se mezcló por inmersión y continuación, se enfrió a -70°C por 15 min seguido se centrifugó 20 min a 12000 rpm. Terminado este proceso, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 200 μL de etanol al 75% y se llevó a agitación por 10 segundos. Se centrifugó 5 min a 13000 rpm, y se eliminaron los restos de etanol, se dejó secar 25 min sobre papel autoclavado. Finalmente, se resuspendió el pelet obtenido con 100 μL de agua

DEPC. El ADN obtenido se conservó y almacenó a -20 °C hasta su posterior uso. Para la cuantificación del ADN se leyeron las muestras en un espectrofotómetro *Nanodrop 8000 UV Spectrophotometer* (Thermo Scientific, USA). Para determinar las relaciones 260/280 y 260/230 para verificar la pureza del DNA.

4.2.2 Cebadores

Los cebadores utilizados durante los ensayos de estandarización de PCR múltiple fueron los implementados por Garrido y colaboradores (Garrido et al., 2013). Los cebadores amplifican fragmentos de ADN de 136, 281 y 973 pb, los cuales pertenecen a los genes 16S de bacterias y 5.8S para el hongo. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se describen a continuación en la tabla 3:

Tabla 3.

Secuencias de los cebadores para la identificación de patógenos en abejas.

Patógenos	Secuencia	Cebador	Tamaño amplicón (bp)	Temperatura de "melting" °C
<i>Ascosphaera</i>	TGTGTCTGTGCGGCTAGGTG	AscFor	136	62
<i>apis</i>	GCTAGCCAGGGGGAACTAA	AscRev		
<i>Melissococcus</i>	GTAAAAGGCGCTTTCGGGT	MeliFor	281	61
<i>plutonium</i>	GAGGAAAACAGTTACTCTTCCCCTA	MeliRev		
<i>Paenibacillus</i>	AAGTCGAGCGGACCTTGTTTC	PL1For	973	60
<i>larvae</i>	TCTATCTCAAACCGGTCAGAGG	PL2Rev		

Adaptado de Garrido et al., 2013.

4.2.3 Optimización de las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.

La optimización para la amplificación génica de la PCR multiplex, se realizó bajo las condiciones del protocolo de Garrido y colaboradores (2013), pero con ciertas modificaciones del master mix de la reacción y el perfil térmico usado. Dentro de las alteraciones del protocolo para la *Master mix* de reacción se emplearon los siguientes reactivos: tampón (Buffer) PCR *Green Flexi* (Promega, USA), cloruro

de magnesio ($MgCl_2$, Invitrogen, USA), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's, Invitrogen, USA) y la enzima *Go Taq Hot start* (Promega, USA). Cabe mencionar que se realizó una pre-mezcla de los cebadores previo a su utilización. Por otra parte, las reacciones de optimización para el sistema de amplificación de PCR multiplex se completaron a un volumen final de 25 μL , en donde se añadieron 5 μL de ADN de cada patógeno, previamente diluido a una concentración final de 10 ng/ μL y se utilizó como control negativo agua DEPC (agua libre de pirógenos, Invitrogen, USA).

4.2.3.1 Optimización de la temperatura de hibridación.

Con la finalidad de optimizar el protocolo de reacción para la PCR multiplex, se realizó un gradiente de temperatura de hibridación. Este ensayo se lo llevó a cabo gracias a la ayuda de un termociclador (Bio-rad, USA), en base a las siguientes condiciones (Tabla 4).

Tabla 4.

Gradiente de temperatura de hibridación para la optimización del PCR múltiple.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	2 min
35 ciclos	95 °C	30 seg
	T*	30 seg
	72 °C	45 seg
	72 °C	7 min
Final	12 °C	∞

Nota: T* Gradiente de temperatura 53; 55; 57; 59; 60; 62 °C

4.2.3.2 Gradiente de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$).

Para el sistema de amplificación optimizado se realizó un gradiente de la concentración de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$). Se lo realizó a concentraciones diferentes de 1 μM a 4 μM con intervalos de 0.75 μM tabla 5 y 6.

Tabla 5.

Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para el gradiente de cloruro de magnesio.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen Master mix 1X (µL)
H ₂ O grado PCR	--	H*	--
Buffer	5X	1X	2.50
MgCl ₂	25 mM	M*	--
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.50
Go taq Hot Start polimerasa	5 U/ µL	0.6 U	0.12
Cebador PL1-F	10 µM	0.05 µM	0.13
Cebador PL2-R	10 µM	0.05 µM	0.13
Cebador Meli-F	10 µM	0.6 µM	1.5
Cebador Meli-R	10 µM	0.6 µM	1.5
Cebador Ascos-F	10 µM	0.09 µM	0.23
Cebador Ascos-R	10 µM	0.09 µM	0.23
Volumen Total Master mix			20

Nota: M* Gradiente de Cloruro de Magnesio con variaciones de 0.75 µM.

Tabla 6.

Variaciones en las concentraciones de cloruro de magnesio para la optimización de la PCR múltiple.

	1 mM	1.75 mM	2.5 mM	3.25 mM	4 mM
H ₂ O grado PCR (µL)	8.67	7.92	7.17	6.42	5.67
MgCl ₂ (µL)	1	1.75	2.5	3.25	4

4.2.3.3 Gradiente de cebadores.

Para el proceso de optimización de PCR multiplex, se realizó un gradiente de la concentración cebadores previamente diluidos a una concentración final de 10 µM, con variaciones en la concentración final de 0.05 a 0.5 µM en intervalos de 0.12 (tabla 8).

Tabla 7.

Concentración de los reactivos de la Master mix.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen Master mix 1X (µL)
H ₂ O grado PCR	--	H*	--
Buffer	5X	1X	2.50
MgCl ₂	25 mM	3.25 mM	3.25
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.50
Go taq Hot Start polimerasa	5 U/ µL	0.6 U	0.12
Cebador PL1-F	10 µM	C*	C*
Cebador PL2-R	10 µM	C*	C*
Cebador Meli-F	10 µM	C*	C*
Cebador Meli-R	10 µM	C*	C*
Cebador Ascós-F	10 µM	C*	C*
Cebador Ascós-R	10 µM	C*	C*
Volumen Total Master mix			20

Nota: C* Gradiente de cebadores con intervalos de 0.12 µM.

Tabla 8.

Variaciones en las concentraciones de cebadores para la optimización de la PCR múltiple.

	0.05 mM	0.16 mM	0.28 mM	0.39 mM	0.5 mM
H ₂ O grado PCR (µL)	10.38	8.73	6.93	5.25	3.63
Cebador <i>Mix forward</i> * (µL)	0.125	0.40	0.70	0.98	1.25
Cebador <i>Mix Reverse</i> * (µL)	0.125	0.40	0.70	0.98	1.25

Nota: *Previamente se realizó una mezcla de cebadores tanto en forward como en reverse para el gradiente de cebadores.

Por último, se optimizaron todos los parámetros antes mencionados con la finalidad de reducir las cantidades requeridas y optimizar recursos para la identificación de patógenos en abejas del Ecuador, así como el perfil térmico empleado durante el ensayo.

4.2.4 Determinación de la sensibilidad analítica.

Con el fin de detectar la cantidad de ADN utilizado para la amplificación génica, se realizaron diluciones seriadas 1:10 del molde de ADN aislado previamente a una concentración de $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (figura 13). El análisis de los resultados se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% para evidenciar la concentración mínima detectable tras realizarse el ensayo de amplificación de los diferentes genes.

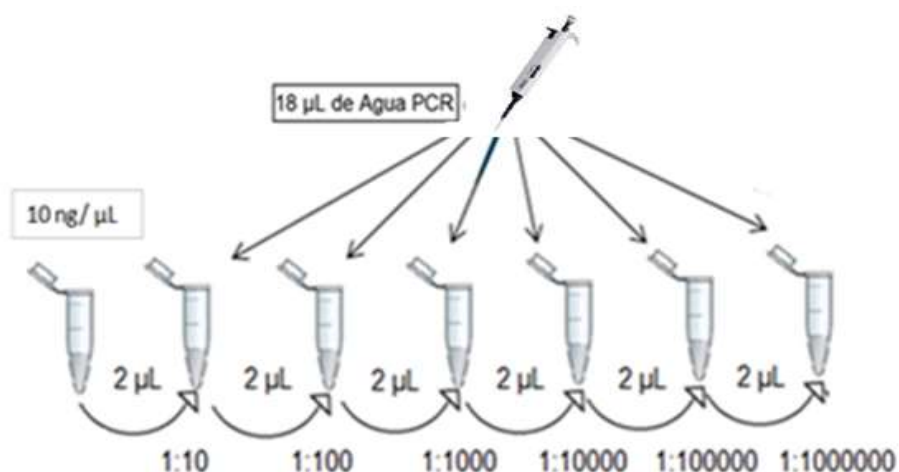


Figura 13. Esquema gráfico para determinar la cantidad mínima necesaria para amplificación génica de la PCR múltiple.

4.2.5 Determinación de la especificidad

Para el proceso de especificidad de los cebadores, se realizó la PCR multiplex utilizando el ADN de patógenos que afectan a las abejas. Adicionalmente, se aisló ADN proveniente de panales con sintomatología clínica negativa, para de igual manera realizar el ensayo de especificidad y garantizar una amplificación específica de los cebadores y que no sean capaces de amplificar secuencias de otros patógenos o microorganismos que están presentes en la biota de los panales de abejas.

4.2.6 Electroforesis en gel de agarosa.

Se pesó la agarosa (grado biología molecular) y se aforó con ayuda del Buffer TBE 0.5X hasta un volumen final requerido. Seguido, se calentó la solución en un microondas durante minuto y medio hasta observar ebullición, se agitó y se enfrió durante 4 minutos. Luego se agregó SYBER safe (Invitrogen, USA) en relación de 1 μ L por cada 10 mL de Buffer TBE 0.5X, respectivamente. Finalmente, se colocó en la cámara de electroforesis horizontal (SENNA, México), previamente armada y se dejó enfriar por 20 min. Una vez que se haya secado el gel, se colocó Buffer TBE 0.5X hasta cubrirlo.

Finalmente, todos los productos (amplicones) de 136, 281 y 973 pb. obtenidos a partir de la amplificación génica de la PCR múltiple fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5% al cargarse 10 μ L del producto de amplificación. Seguidamente, se cargaron 5 μ L del marcador de peso molecular de 1Kb. (Invitrogen) para la visualización del tamaño de los genes amplificados. Posteriormente, se migraron los amplicones a 100 V durante 35 minutos en la cámara de electroforesis.

5 Resultados y discusión

5.1 Implementación y optimización de un protocolo de extracción de ADN bacteriano y fúngico de crías de abejas mediante DNAzol.

La obtención del ADN es el primer punto clave para el estudio de la identificación molecular de patógenos en abejas del Ecuador, ya que permite obtener el material genético, el cual será empleado para la amplificación génica. Por lo tanto, el objetivo de este proceso es separar el ADN de todos los componentes celulares, para así tener una solución homogénea que contendrá la información genética de una sola célula (Ligozzi & Fontana, 2003).

La implementación de un protocolo de extracción a partir de un agente caotrópico, con la introducción de otros agentes mecánicos y químicos son de

gran ayuda para el aislamiento del ADN ya sea bacteriano o fúngico a costos económicos. Sin embargo, la extracción a partir de una muestra (cría de abeja) de campo con sintomatología positiva conlleva a una alta degradación y con mayores probabilidades de contaminación del ADN aislado, debido a que es una muestra clínica directamente del agente infectado del campo. Por esta razón, los resultados previstos y obtenidos a partir de la implementación de un protocolo con la ayuda de agentes químicos, caotrópicos y mecánicos arrojaron valores de concentraciones de la molécula de ADN en menor tiempo, aportándole simplicidad, eficacia y rapidez al ensayo (Chomczynski, Mackey, & Drews, 1997; Ligozzi & Fontana, 2003).

Por otra parte, en cuanto a la pureza obtenida durante la extracción del ADN bacteriano se obtuvieron variaciones en el ratio de absorbancia 260/280 con tendencias a ser bajas. Es por ello que se obtuvieron valores en la relación 260/280 en rangos que van entre 0.98 hasta 1.57 y en la relación 260/230 entre 1.31 hasta 1.61 y concentraciones desde 96.15 hasta 476.22 ng/ μ L (tabla 9). Por lo tanto, se podría mejorar la extracción de ADN con la ayuda y aplicación de agentes químicos de amplio espectro o con el empleo de kits comerciales, ya que la importancia de la purificación del ADN aislado es obtener un producto de peso molecular alto y libre de proteínas, carbohidratos, fenoles e inhibidores que afectan a la enzima Taq polimerasa (Guo, Schnieder, & Abd-Elsalam, 2005).

Por otra parte, Arai y colaboradores en el año 2012, realizaron estudios epidemiológicos para ver la presencia de microorganismos patógenos bacterianos, fúngicos y la virosis en apiarios de Japón. Los resultados que obtuvieron de la extracción de ADN a partir de cultivos puros de los microorganismos patogénicos fueron los esperados ya que la concentración fue de 156.43 ng/ μ L y la pureza fue de igual forma la esperada con rangos en el ratio de absorbancia 260/280 mayores a 2.

En cambio, la extracción de ADN a partir de la cría de abeja infectada reveló resultados no tan favorables las cuales fueron de 1.37-1.58 en la relación de 260/280 nm. Una posible explicación a este fenómeno es un ambiente rústico y

campestre en el que se desarrollan las abejas, pues al estar sometidas a la interacción con numerosas sustancias químicas, la contaminación con inhibidores de la PCR podría ser alta.

Por otro lado, en el año 2010, Genersh realizó un estudio para entender la virulencia, genotipificación y transmisión de *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius* y cómo estos patógenos afectan a las abejas. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios, demostraron un excelente aislamiento de la molécula de ADN en cuanto a concentración y pureza que fue de 245.67 ng/ μ L y en la relación 260/280 fue de 2.03, respectivamente.

Con base a las consideraciones anteriores, se puede concluir que los resultados obtenidos durante la implementación de un protocolo de extracción de ADN con el empleo de agentes químicos y caotrópicos a partir de crías enfermas de abejas, es un método simple y de bajo costo para el diagnóstico de enfermedades en estos insectos, considerando ciertos parámetros tales como la pureza y concentración esperada. Sin embargo, el empleo de kits comerciales para la extracción directamente de la larva es muy relevante pero eso conllevaría a elevar los costos de la investigación.

Tabla 9.

Rangos de concentraciones (ng/ μ L) y pureza (relación 260/280 y 260/230nm)^ del ADN aislado a partir de crías de abejas.*

Microorganismo	Concentración*	Pureza (260/280)^	Pureza (260/230)^
<i>Muestras correspondientes a Paenibacillus larvae</i>	96.15 - 252.45	0.98 – 1.42	1.31 – 1.68
<i>Muestras correspondientes a Melissococcus plutonius</i>	76.87 – 365.78	1.47 – 1.92	1.41 – 1.95
<i>Muestras correspondientes a Ascosphaera apis</i>	115.36 – 476.22	0.95 – 1.57	1.29 – 1.61

5.2 Optimización de las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.

5.2.1 Optimización de la temperatura de hibridación.

Durante la optimización de las condiciones de la PCR multiplex se determinó una temperatura de hibridación adecuada para los tres amplicones de los patógenos. Esta temperatura dependió de la secuencia de los cebadores y CG de los mismos.

Con base a lo anteriormente expuesto, los resultados muestran que las temperaturas idóneas para el ensayo de amplificación de los tres microorganismos patogénicos están entre de 59 °C y 62 °C, siendo la temperatura de 59 °C la idónea y escogida para la optimización de la PCR multiplex. Previamente se realizó un gradiente de temperatura desde 53 °C hasta 62 °C (figura 14). Sin embargo, a temperaturas inferiores a 59 °C se evidencia la aparición de productos o bandas inespecíficas durante el ensayo de amplificación. Es por ello, que según, lo reportado por Garrido y colaboradores en el año 2013 en donde utilizaron los mismos protocolos a una temperatura de alineación de 58 °C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) se obtuvo gran cantidad de producto amplificado, sin la presencia de productos inespecíficos (Hyndman et al., 2003).

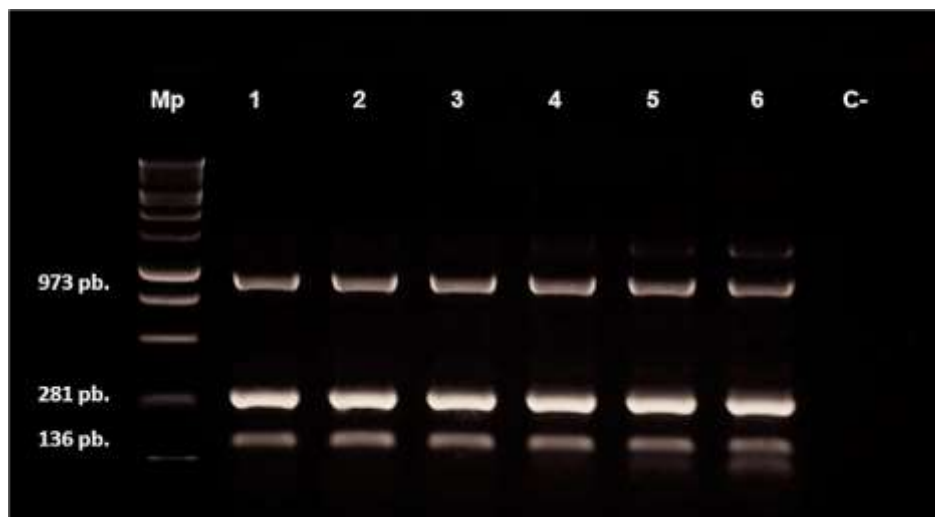


Figura 14. Amplificación génica de la PCR múltiple por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gradiente de temperatura de hibridación con sus respectivos pesos moleculares de 973 pb. *Paenibacillus larvae*; 281 pb. *Melissococcus plutonius* y de 136 pb. para *Ascospaera apis*.

- a) Carril Mp: Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, USA).
- b) Carril C-: Control negativo.
- c) Carril 1 - 6: Amplicones de 973, 281 y 136 pb. obtenidos del gradiente de temperatura de hibridación de izquierda a derecha respectivamente (62, 60, 59, 57, 55, 53 °C).

Los rangos óptimos de la temperatura se encuentran entre 50-62 °C. Es por ello, que mientras mayor sea la temperatura de hibridación va a ser altamente específico, pero se reduce la sensibilidad. En cambio, a temperaturas bajas existe un incremento de la sensibilidad y se reduce la especificidad (Bolívar, Rojas, & García, 2013). Este método desarrollado representa una alternativa para el diagnóstico inmediato y simultáneo para enfermedades en una colmena, resultados que no han sido reportados.

Es así que en otros estudios Cassidy y colaboradores en el año 2011 determinaron los agentes etiológicos de loque americana y loque europea en África Austral por medio de un ensayo de multiplex-PCR, en donde encontraron que a temperaturas mayores a 60 C° no son las adecuadas para la amplificación de los genes 16S y 5.8S. Sin embargo, en este estudio no se pudo detectar simultáneamente a *Ascospaera apis*.

Por otra parte, Guimarães, Serrão y Message (2016, p. 45), realizaron una detección simultánea de *Ascosphaera apis* y *Paenibacillus larvae*, en donde mencionaron que la temperatura de alineamiento fue de 60 °C y realizaron un gradiente de temperatura desde 55 °C hasta 64 °C con intervalos consecutivos de 1.5 °C. Por estas razones, la temperatura de hibridación idónea para la identificación de patógenos en abejas del Ecuador fue de 59°C para una correcta amplificación del proceso de PCR múltiple.

5.2.2 Gradiente de Cloruro de Magnesio (MgCl₂).

El cloruro de magnesio es otro parámetro que fué tomado en cuenta durante la amplificación génica de la PCR múltiple y en especial para la enzima *Taq polimerasa* ya que es un cofactor para la misma (Henagariu et al., 1997).

Es por ello, como se observa en la figura 15 los resultados demuestran que a bajas cantidades de MgCl₂ de (1.75 y 2.5mM), no se logra visualizar la amplificación de algunos productos. Esto puede deberse a la concentración de los dNTP's, ya que tienen una estrecha relación el uno con el otro debido a que los desoxirribonucleótidos trifosfatos al final del proceso de amplificación, tiene la capacidad de unir cationes divalentes y por ende disminuyen la concentración efectiva del MgCl₂ (Bolívar, Rojas, & García, 2013). Por otra parte, a concentraciones altas de cloruro de magnesio tales como 3.25 y 4 mM se pueden visualizar las diferentes bandas con su respectivo peso molecular, en donde se escogió la concentración de 3.25 mM para la optimización del ensayo. Garrido y colaboradores en el año 2013, menciona que las concentraciones finales de cloruro de magnesio están en los rangos de 2.5 mM y 4 mM para la amplificación génica de tres patógenos que afectan a los apiarios en España.

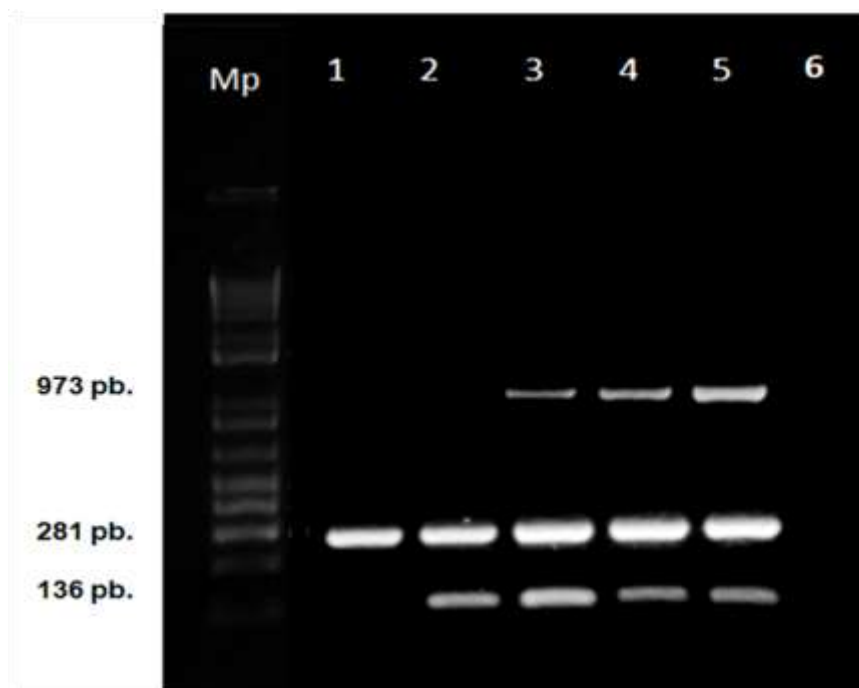


Figura 15. Amplificación génica de la PCR múltiple por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gradiente de cloruro de magnesio (MgCl₂) con sus respectivos pesos moleculares de 973 pb. *Paenibacillus larvae*; 281 pb. *Melissococcus plutonius* y de 136 pb. para *Ascospaera apis*.

- a) Carril Mp: Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, USA).
- b) Carril 6: Control negativo.
- c) Carril 1 - 5: Amplicones de 973, 281 y 136 obtenidos del gradiente de cloruro de magnesio (MgCl₂) de izquierda a derecha respectivamente (1, 1.75, 2.5, 3.25, 4 μM).

Como podemos corroborar en este estudio la concentración óptima que se emplea para los diferentes ensayos de PCR tanto convencional como múltiple se encuentran en el rango desde 1 mM hasta 4 mM. Adicionalmente, si la concentración empleada es demasiado baja, los productos de PCR no se observarán, pero la especificidad de los cebadores aumentaría. En cambio, si la concentración es muy elevada, bajaría la especificidad de los cebadores, promoviendo la aparición de bandas inespecíficas o productos del ensayo de PCR no deseados (Henagariu et al., 1997).

5.2.3 Gradiente de cebadores.

Los cebadores son cadenas de entre 20-35 oligonucleótidos sintéticos de longitud y son secuencias complementarias al genoma, específicamente a regiones conservadas de los microorganismos de interés, debido a esto los cebadores son los que van a brindar la especificidad de la reacción de amplificación (Moreno & Agudelo, 2010).

Los resultados obtenidos durante la optimización de la multiplex-PCR se pueden visualizar en la figura 16, donde la concentración de los cebadores para los distintos patógenos bacterianos fue de 0,16 μM para *P. larvae* y 0.39 μM para *Melissococcus plutonius*, para la amplificación de *Ascosphaera apis* se tomó la concentración final de 0.39 μM .

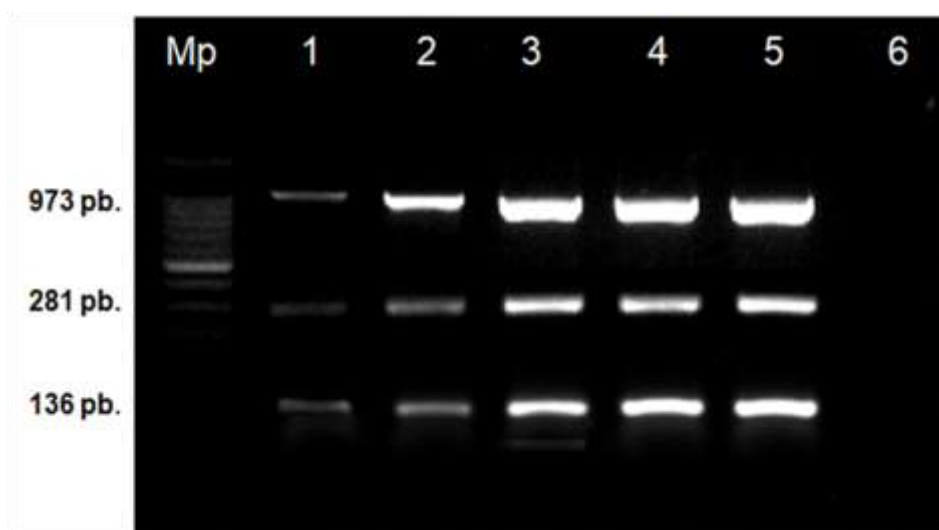


Figura 16. Amplificación génica de la PCR múltiple por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gradiente de cebadores con sus respectivos pesos moleculares de 973 pb. *Paenibacillus larvae*; 281 pb. *Melissococcus plutonius* y de 136 pb. para *Ascosphaera apis*.

- a) Carril Mp: Marcador de peso molecular de 1Kb (Promega, USA).
- b) Carril 6: Control negativo con agua DEPC (agua libre de pirógenos).
- c) Carril 1-5: Amplicones de 973, 281 y 136 obtenidos del gradiente de cebadores de izquierda a derecha respectivamente (0.05, 0.16, 0.28, 0.39, 0.5 μM).

Según Garrido y colaboradores (2013) las concentraciones finales para el ensayo de PCR multiplex sean de 0.05 μM para *P. larvae*; 0.6 μM para *M. plutonius* y de 0.09 μM para *A. apis*. Por otra parte, estos mismos autores diseñaron los cebadores utilizados en este trabajo y recomiendan emplear las concentraciones propuestas por ellos. Sin embargo, durante el ensayo realizado se evidenciaron estructuras secundarias, tales como las horquillas o dímeros de primers que son uniones entre cebadores distintos o entre ellos mismos, dando como resultado la visualización de un producto inespecífico de bajo peso molecular. Esto podría deberse al tipo de muestras, concentración de MgCl_2 e inhibidores presentes en el proceso de PCR, sin embargo harían falta más pruebas para comprobarlo.

Por otra parte estudios previos realizados para un ensayo de estandarización de PCR múltiple, demuestran que las condiciones y el lugar en donde se efectúan los ensayos pueden estar ligados a que no siempre se utilicen las concentraciones de reactivos recomendadas. De igual manera, el empleo de diferentes equipos puede ser otro parámetro a ser tomado en cuenta ya que ello conllevaría al apareamiento de problemas durante el proceso de amplificación (Klein, 2002) (Ma, Deng, Chen, & Wu, 2014, pp. 89-93).

5.2.4 Determinación de la sensibilidad analítica

Para la determinación de la sensibilidad analítica de la PCR multiplex de los tres patógenos que afectan a las abejas del Ecuador, se realizaron diluciones seriadas del ADN aislado de muestras de campo positiva. Este ensayo se basa en la amplificación génica del ADN obtenido hasta la mínima cantidad en $\text{ng}/\mu\text{L}$ del material genético.

Es por ello que los resultados obtenidos del ensayo de PCR múltiple, a partir de diluciones seriadas de una concentración inicial de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ fue de 0.01 $\text{ng}/\mu\text{L}$ como concentración mínima detectada, tanto para *Paenibacillus larvae* como

para *Melissococcus plutonius* figura 17. En cambio para el hongo *Ascosphaera apis* su límite de detección fue hasta 0.001 ng/ μ L.

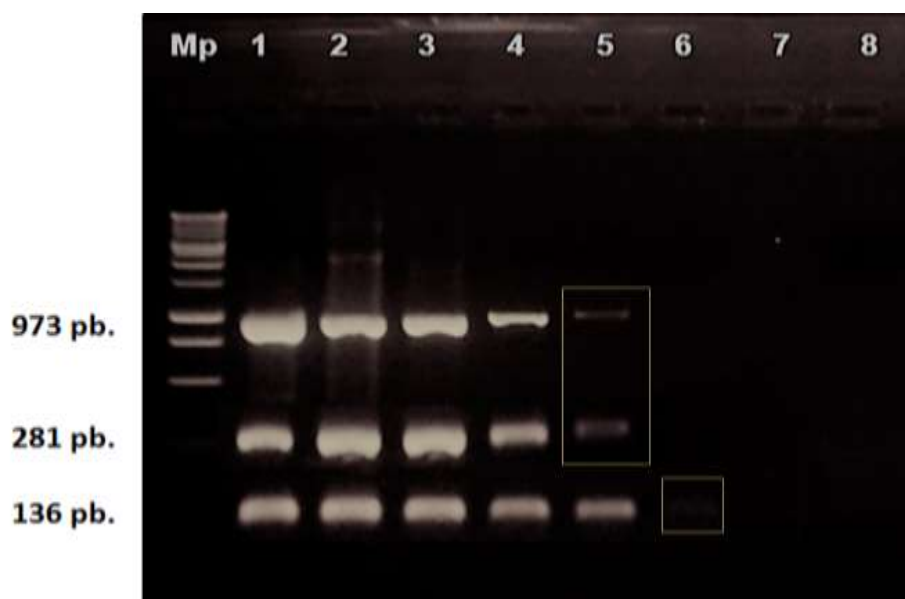


Figura 17. Determinación de la sensibilidad analítica por diluciones seriadas del ADN para la PCR múltiple por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con sus respectivos pesos moleculares de 973 pb. *Paenibacillus larvae*; 281 pb. *Melissococcus plutonius* y de 136 pb. para *Ascosphaera apis*.

- a) Carril Mp: Marcador de peso molecular de 1Kb (Promega, USA).
- b) Carril 1: Control positivo.
- c) Carril 2: dilución 1:10.
- d) Carril 3: dilución 1:100.
- e) Carril 4: dilución 1:1000.
- f) Carril 5: dilución 1:10000.
- g) Carril 6: dilución 1:100000.
- h) Carril 7: dilución 1:1000000.
- i) Carril 8: control negativo con agua DEPC (agua libre de pirógenos).

Estudios previos realizados por Soto en el año 2017 en Costa Rica, para determinar la sensibilidad analítica, ya sea de un PCR convencional o multiplex, lo realizaron a partir de cultivos puros por conteo de unidades formadoras de colonias, es decir a partir del crecimiento bacteriano en fase exponencial y demostraron resultados de diluciones de 10^{-5} UFC/mL que equivalen a 1×10^{-5} ng/ μ L, lo cual evidencia una cantidad inferior a lo propuesto en el trabajo de estudio.

Por esta razón, el límite de detección para la identificación de patógenos en abejas del Ecuador puede estar limitado ya que se utilizó un método rustico con DNazol para el aislamiento y purificación de la molécula de ADN. Por otra parte, se debe tomar en cuenta que el ADN obtenido fue a partir de larvas enfermas y que de igual forma existe un límite de detección idóneo para la estandarización de la PCR múltiplex, se podrían considerar un ensayo muy sensible.

De igual manera los resultados para la detección del hongo fueron muy prometedores ya que, al igual que con las bacterias se aisló el ADN a partir de larvas enfermas con este tipo de patología fúngica y no de un cultivo puro. Es por ello, que hasta la actualidad no se han realizado estudios para determinar el límite de detección de *Ascosphaera apis* a partir de muestras de campo de la larva o cría con este tipo de patología.

Por esta razón, los resultados obtenidos para la identificación de *Ascosphaera apis* en abejas del Ecuador son relevantes para un estudio preliminar de identificación ya que se encuentra por debajo de lo antes mencionado. Todo ello puede deberse al tipo de extracción empleada y a la muestra de origen utilizada durante el ensayo de PCR múltiplex (Maxfield, 2015).

5.2.5 Determinación de la especificidad.

Adicionalmente, debido a la dificultad de cultivar microorganismos patógenos y no patógenos propios de la biota de los panales, se utilizaron controles positivos de panales sanos en donde proliferan algunos microorganismos tales como *Bacillus alvei*, *Nosema* spp., *Streptococcus* y *Aspergillus* para verificar y comprobar la especificidad de los cebadores empleados durante el estudio (Garrido, M. 2012; Soto, 2017).

Se demostró que el protocolo estandarizado de PCR múltiple es altamente específico, como se muestra en la figura 18, en donde solo amplifican los

controles positivos de *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* y *Ascosphaera apis*.

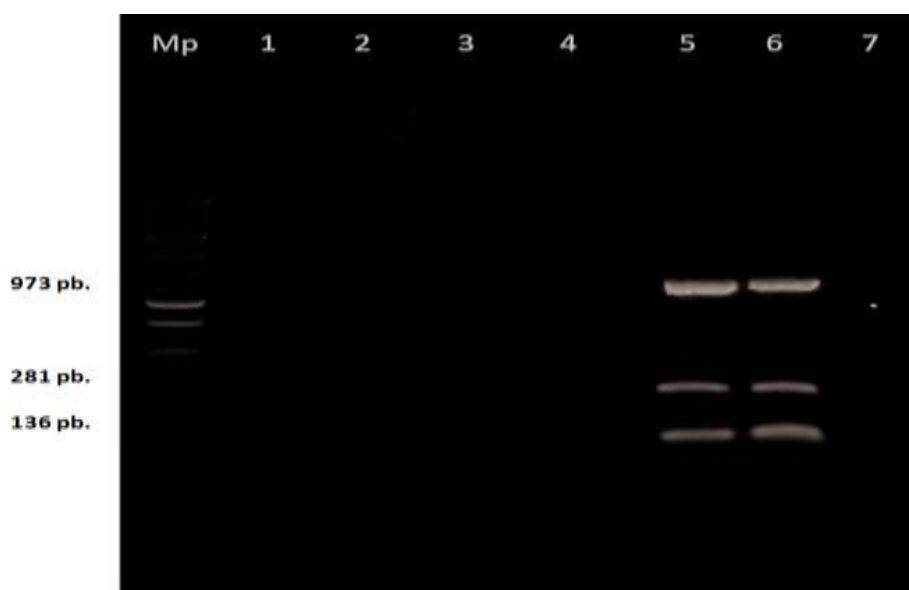


Figura 18. Determinación de la especificidad analítica de los cebadores utilizados para la PCR múltiple por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con sus respectivos pesos moleculares de 973 pb. *Paenibacillus larvae*; 281 pb. *Melissococcus plutonius* y de 136 pb. para *Ascosphaera apis*.

- a) Carril Mp: Marcador de peso molecular de 1Kb (Promega, USA).
- b) Carril 1-4: ADN de panal sano.
- c) Carril 5-6: controles positivos para cada microorganismo.
- d) Carril 7: control negativo con agua DEPC.

Finalmente, optimizados todos los parámetros propuestos para la estandarización de la PCR múltiple, se determinó que las mejores condiciones tanto de los reactivos como la temperatura de alineamiento para la amplificación génica de los tres microorganismos, sin que existiese bandas inespecíficas o alguna formación de estructuras secundarias que dieran como resultado un falso positivo se describen a continuación en las tablas 10 y 11, en donde se establecen las condiciones idóneas para la identificación de *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* y *Ascosphaera apis*:

Tabla 10.

Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para el proceso de PCR Múltiple optimizado para la identificación de patógenos en abejas del Ecuador.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen Master mix 1X (μL)
H ₂ O grado PCR	--	--	10.53
Buffer	5X	1X	2.50
MgCl ₂	25 mM	3.25 mM	3.25
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.50
Go taq Hot Start polimerasa	5 U/ μL	0.6 U	0.12
Cebador PL1-F	10 μM	0.16 μM	0.40
Cebador PL2-R	10 μM	0.16 μM	0.40
Cebador Meli-F	10 μM	0.39 μM	0.98
Cebador Meli-R	10 μM	0.39 μM	0.98
Cebador Ascosp-F	10 μM	0.39 μM	0.98
Cebador Ascosp-R	10 μM	0.39 μM	0.98
Volumen Total Master mix			20

Tabla 11.

Perfil térmico optimizado para la PCR múltiple para la identificación de patógenos en abejas del Ecuador.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	2 min
35 ciclos	95 °C	30 seg
	59 °C	30 seg
	72 °C	45 seg
	72 °C	7 min
Final	12 °C	∞

6 Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

El protocolo optimizado con DNazol desarrollado resulto económico, factible y rápido para la extracción del ADN utilizado para la amplificación génica de la PCR multiplex, obteniéndose óptimos resultados en la amplificación.

Las condiciones para la optimización de la PCR multiplex se ajustaron a una temperatura de hibridación de 59 °C, concentración de cloruro de magnesio igual a 3.25 μM y las concentraciones de los cebadores fue de 0.16 μM en *Paenibacillus larvae* y 0.98 μM de *Melissococcus plutonius* y *Ascosphaera apis* para la amplificación génica de los genes 16S y 5.8S.

Los resultados de sensibilidad son aceptables para los estándares de los laboratorios de Agrocalidad siendo de 0.01 ng/ μL como concentración mínima detectada, para *Paenibacillus larvae* como para *Melissococcus plutonius* y 0.001 ng/ μL para el hongo *Ascosphaera apis*.

La especificidad de los cebadores PL1F, PL2R; MeliF, MeliR y AscospF, AscospR usados para la amplificación del gen 16S y del gen 5.8S respectivamente, resultaron con un alta especificad para los mismos.

6.2 Recomendaciones

Promover el uso de técnicas moleculares en comparación con métodos tradicionales para la identificación de microorganismos patogénicos en abejas del Ecuador.

Realizar estudios epidemiológicos a nivel molecular para determinar la prevalencia de estos patógenos en abejas de todo el territorio ecuatoriano.

Emplear kits comerciales para la extracción de ADN bacteriano como fúngico para el aislamiento del material genético a partir de larvas enfermas provenientes de campo.

Efectuar estudios ecológicos para comprender la virulencia que ciertos patógenos tienen sobre las distintas especies de abejas.

Realizar estudios de variabilidad genética de las diferentes especies de abejas y su susceptibilidad a los patógenos.

REFERENCIAS

- Alippi, A., & Aguilar, M. (2015). *Unique DNA fingerprint patterns of Paenibacillus*. *Journal of Apicultural Research*, 273-280. Recuperado el 12 de febrero de 2018 de http://agris.fao.org/agris-search/search.do?request_locale=ar&recordID=GB1999010948
- Alippi, A., Reynaldi, F., López, A., DE Giusti, M., & Aguilar, M. (2004). *Molecular epidemiology of Paenibacillus*. *Journal of Apicultural Research*, 135-143
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00218839.2004.11101124>
- Almeida, E., Pie, M., Brady, S., & Danforth, B. (2007). *Biogeography and diversification of colletid bees (Hymenoptera:Colletidae):emerging patterns from the southern end of the world*. *Journal of Biogeography*, 4(2), 2-12.<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2699.2011.20624.x/abstract>
- Álvarez, S., & Roth, E. (2004). *Multiplex PCR in clinical microbiology*. *ELSEVIER*, 182-183. [https://doi:10.1016/S0213-005X\(04\)73059-1](https://doi:10.1016/S0213-005X(04)73059-1)
- Anido, M. (2013). Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay. Recuperado el 19 de Enero de 2018 de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/3996/1/uy24-16467.pdf> .
- Ansari, M., Ghamdi, A., & Nuru, A. (2016). *Survey and molecular detection of Melissococcus*. Recuperado el 25 de febrero de 2018 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X1630136X>
- Aronstein, K., & Murray, K. (2010). *Chalkbrood disease in honey bees*. Recuperado el 20 de febrero de 2018 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002220110900189X>
- Beeman, J. (2015). *THE DRONE KING*. Recuperado el 15 de octubre del 2015 de <http://lafamiliapicola.blogspot.com/2015/10/>

- Bolivar, A., Rojas, A., & Garcia, P. (2013). *PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol*. Recuperado el 15 de febrero de 2018 de <https://qbpatologica.files.wordpress.com/2015/07/2014-pcr-y-pcr-mc3baltiple-parc3a1metros-crc3adticos-y-protocolo-de-estandarizacic3b3n.pdf>
- Borracci, S., Chacana, P., & Palacio, A. (2004). Loque Americana de las abejas: Características y diagnóstico de la enfermedad. Recuperado el 15 de febrero de 2018 de <http://lafamiliapicola.blogspot.com/2011/01/loque-americana-de-las-abejas.html>
- Brodshneider, R., & Crailsheim, K. (2010). *Nutrition and health in honey bees*. Recuperado el 20 de octubre del 2017 de <http://ambienteonline.es/Ediciones%20de%20AMBIENT/AMBIENT%202011.pdf#page=9>
- Bradbear, N. (2005). *La apicultura y los medios de vida sostenible. Folleto de la FAO sobre diversificación*. Recuperado el 15 de octubre del 2017 de http://teca.fao.org/sites/default/files/resources/Apicultura%20y%20los%20medios%20de%20vida%20sostenibles_0.pdf
- Cabrera, J. (2012). *El Desarrollo de la Apicultura en el Ecuador*. Recuperado el 27 de Septiembre de 2017 de <https://apiterapia.com.ec/portal/noticias/El-Desarrollo-de-la-Apicultura-en-el-Ecuador>
- Cassidy, D., Goszczynska, T., & Burnet, J. (2015). *Determination of the status of the etiological. Journal of Apicultural Research*, 284-291. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.4.05>
- Carabajo, K. y Ortega, C. (2015). *Prevalencia del acaro varroa (Varroa sp.) en colmenares de las regiones norte y centro norte del Ecuador*. Recuperado el 27 de octubre del 2017 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6446>
- Chakravorty, S., Helb, D., & Alland, D. (2007). *A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria*. Recuperado el 27 de octubre del 2017 de

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701207000565>

- Chomczynski, P., Mackey, K., & Drews, R. (1997). *DNAzol: A Reagent for the Rapid Isolation of*. Recuperado el 17 de octubre del 2017 de https://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00010/97223pf01_10690a.pdf
- Danforth, B., (2007). *Bees*. *Current biology*, 17(5), 156-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.025>
- De Graff, D., Antúnez, K., & Aronstein, K. (2015). *Standard methods for American foulbrood*. *Journal of Apicultural Research*, 2-20. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3896/IBRA.1.52.1.11>
- Engel, M. (1999). *The taxonomy of recent and fossil Honey bees*. Recuperado el 28 de octubre del 2017 de <https://kuscholarworks.ku.edu/handle/1808/16476>
- Evans, J., & Schwarz, R. (2011). Bees brought to their knees: microbes. *Trends in Microbiology*, 611-620. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.003>
- Evison, S. (2015). *Chalkbrood: epidemiological perspectives from the host-parasite relationship*. *ELSEVIER*, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.015>
- Fernández, A., Varela, E., Martínez, L., & Sierra, J. (2010). Evaluación de una PCR multiplex en tiempo real para la detección de patógenos en el tejido valvular de pacientes con endocarditis. *Revsita Española de Cardiología*, 1145-1153. [https://doi.org/10.1016/S03008932\(10\)70254-2](https://doi.org/10.1016/S03008932(10)70254-2)
- Fonta, C., Sun, X.-J., & Masson, C. (1993). *Morphology and spatial distribution of bee antennal lobe interneurons responsive to odours*. Recuperado el 26 de octubre del 2017 de https://search.yahoo.com/search?ei=utf-8&fr=tightropetb&p=Morphology+and+spatial+distribution+of+bee+antennal+lobe+interneurons+responsive+to+odours&type=80463_070317
- Forsgren, E. (2010). *European foulbrood in honey bees*. *Journal of Invertebrate Pathology*, S5-S9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>

- Forsgren, E., Lundhagen, A., & Imdorf, A. (2005). *Distribution of Melissococcus plutonius in Honeybee Colonies with and without Symptoms of European Foulbrood*. Recuperado el 27 de octubre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-004-0188-2>
- Garrido-Bailón, E., Higes, M., Martínez-Salvador, A., Antúnez, K., Botías, C., Meana, A., Prieto, L. and 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. *Microbial Biotechnology*, 6: 731–739. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.12070/full>
- Genersh, E. (2010). *American Foulbrood in honeybees and its causative agent, Paenibacillus larvae*. ELSEVIER, S10-S19. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015>
- Govan, V., Allsopp, H., & Davison, S. (1999). *PCR Detection Method for Rapid Identification*. <http://aem.asm.org/content/65/5/2243.full>
- Guo, J., Schnieder, F., & Abd-Elsalam, K. (2005). Rapid and efficient extraction of genomic DNA from different. *Springer*, 3(7), 3-6. <https://link.springer.com/article/doi/10.1007/s10529-004-6294-x>
- Guerra, A. (2013). Evaluación de cinco tratamientos para el control del acaro "Varroa destructor" en abejas (*Apis mellífera*). Recuperado el 17 de octubre del 2017 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/3129>
- Guimarães, L. (2016). *Simultaneous detection of Nosema spp., Ascosphaera apis and Paenibacillus larvae in honey bee products*. Recuperado el 29 de octubre del 2017 de <https://jhr.pensoft.net/articles.php?id=7061>
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., & Vogt, P. (1997). *Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol*. Recuperado el 30 de octubre del 2017 de https://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00011/97233rr01_11727a.pdf

- Hyndman, D. & Mitsuhashi, M. (2003). *PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology*, vol. 226: PCR Protocols. Totawa, NJ: Human Press Inc. 2da Edición. pp. 81-88. <https://doi:10.1385/1-59259-384-4:81>
- James, R., & Skinner, J. (2005). *PCR diagnostic methods for Ascosphaera infections in bees.* *ELSEVIER*, 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.08.004>
- Kauhausen, K., & Ruttner, L. (1997). *Morphometric studies on the microtaxonomy.* Recuperado el 28 de octubre del 2017 de https://www.researchgate.net/publication/248855345_Morphometric_studies_on_the_microtaxonomy_of_the_species_Apis_mellifera_L
- Ligozzi, M., & Fontana, R. (2003). Isolation of total DNA from bacteria and yeast. *African Journal of Biotechnology*, 251-253. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2003.000-1052>
- Linares, J., & Matínez, J. (2005). Antimicrobial resistance and bacterial virulence. *ELSEVIER*, 86-93. <https://europepmc.com/articledoi:10.1157/13071612>
- Lino, N., Báu, N., & Dolder, H. (2000). Sperm ultrastructure of the honey bee. *Tissue&Cell*, 322-327.
- Michelette, E., & Soares, A. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in. Recuperado el 17 de octubre del 2017 de https://www.researchgate.net/publication/248855229_Characterization_of_preimaginal_developmental_stages_in_Africanized_honey_bee_workers_Apis_mellifera_L
- Michener, C. (1980). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Missouri: Editorial JSTOR. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.818>
- Murray, T., Kulhmann, M., & Potts, S. (2009). Conservation ecology of bees: populations, species and communities. *Apidologie*, 211-236.
- Nates, G. (2005). Abejas silvestres y polinización. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 7-20. <https://rd.springer.com/article/doi/10.1051%2Fapido%2F2009015>
- NCBI-taxonomy, (2017). Bees taxonomy. Recuperado el 28 de Noviembre del 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=bees>

- Patiny, S., & Michez, D. (2007). Biogeography of bees (Hymenoptera, Apoidea) in Sahara. Recuperado el 28 de octubre del 2017 de https://www.researchgate.net/publication/228505333_Biogeography_of_bees_Hymenoptera_Apoidea_in_Sahara_and_the_Arabian_deserts
- Pemán, J., & Salavert, M. (2012). General epidemiology of invasive fungal disease. *ELSEVIER*, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.004>
- Pinnock, D., & Featherstone, N. (2015). Detection and Quantification of *Melissococcus Pluton* Infection in Honeybee Colonies by Means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Apicultural Research*, 168-170. <https://doi.org/10.1080/00218839.1984.11100627>
- Potts, S., Biesmeijer, J., & Kremen, C. (2010). Global pollinator declines: trends. *Trends in Ecology and Evolution*, 346-350. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Prost, P., & Le Conte, Y. (2007). *Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de la Colmena*. Recuperado el 11 de octubre del 2017 de <https://www.amazon.es/Apicultura-Conocimiento-abeja-colmena-edici%C3%B3n/dp/8484762041>
- Puker, A. (2011). PCR multiplex para detecção de patógenos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) em mel; PCR multiplex para detecção de patógenos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) em mel. Recuperado el 08 de octubre del 2017 de <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/3954>
- RAPAM. (2017). *Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México*. Recuperado el 20 de Diciembre del 2017 de file:///C:/Users/PC/Downloads/Los_Plaguicidas_Altamente_Peligrosos_en_Mexico.pdf
- Roetschi, A., Berthoud, H., & Kuhn, R. (2008). *Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary*

- sanitation*. Recuperado el 08 de octubre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1051%2Fapido%3A200819>
- Rosero, H. (2016). *Agrocalidad*. Retrieved from Direccion de Control Zoosanitario. Recuperado el 29 de Septiembre del 2017 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/resolucion-0106-programa-nacional-sanitario-apicola.pdf>
- Ruttner, F. (1991). *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Recuperado el 09 de octubre del 2017 de <http://www.springer.com/la/book/9783642726514>
- Ugajin, A., & Takayuki, W. (2016). Expression analysis of Egr-1 ortholog in metamorphic brain of. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1014-1019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.023>
- Vanbergen, A. (2013). Threats to an ecosystem service: pressures on. *Pressures on pollinators*, 251-258. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1890/120126/abstract>
- Vincens, N., & Bosch, J. (2000). Weather-Dependent Pollinator Activity in an Apple Orchard, with Special. *BioOne Research involved*, 414-419. <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1603/0046-225X-29.3.413>
- Waite, R; Thompson, H, Brown, M, Watkins, M, Bew, M., (2003). *Preliminary studies into novel detection methods for honey bee pathogens*. Recuperado el 15 de octubre del 2017 de https://www.researchgate.net/publication/242098272_PRALIMINARS_TUDIEN_UBER_NEUE_ENTDECKUNGSMETHODEN_DER_KRANKHEITSERREGER_DER_HONIGBIENE
- Walder, A., (1998). *The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields*. *Conserv. Biol.* 12:8–17 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1523-1739.1998.97154.x/abstract>
- Zarzoso, B., Belloch, C., & Uruburu. (1999). *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal*

transcribed spacers. Recuperado el 12 de octubre del 2017 de <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-1-329>

