

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinant factors of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Almudena Urbieto Magro

Directores

Raquel Martín Hernández
Mariano Higes Pascual
Aránzazu Meana Mañes

Madrid

© Almudena Urbieto Magro, 2019

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinant factors of nosemosis
in *Apis mellifera iberiensis*

Almudena Urbieto Magro

Dirigida por:

Dra. Raquel Martín Hernández

Dr. Mariano Higes Pascual

Profa. Dra. Aránzazu Meana Mañes



TESIS DOCTORAL
Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinant factors of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

TESIS DOCTORAL

Almudena Urbietta Magro

2019

Directora:

Dra. Raquel Martín Hernández

Co-directores:

Dr. Mariano Higes Pascual

Profª. Dra. Aránzazu Meana Mañes

Título

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*.

Memoria de Tesis Doctoral (UCM), Madrid, 2019.

Autora

Almudena Urbieto Magro

Agradecimientos

La autora agradece la supervisión de Profa. Dra. Aránzazu Meana, Dra. Raquel Martín Hernández y Dr. Mariano Higes;

la información, revisión y comentarios de Dra. Laura Barrios, Dra. Cristina Fernández Aragón, Dra. García-Palencia, Dra. Ana Lázaro, Txema Urbieto y Almudena Magro, y las imágenes de Javier Almagro, Jesús García y Susana Montesinos.

La autora agradece la ayuda económica de INIA-FEDER, IRIAF-JCCM y *COST-Action*.

Edita

Almudena Urbieto Magro

Diseño y maquetación

Almudena Urbieto Magro y Ana Lázaro Nogal

La autora agradece la reproducción y divulgación de los contenidos de esta memoria siempre que se cite la fuente.



Este documento está bajo una licencia Reconocimiento-No comercial-Compartir bajo la misma licencia 3.0 España de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Almudena Urbietta Magro,
estudiante en el Programa de Doctorado en Veterinaria,
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: Dra. Raquel Martín Hernández,
Dr. Mariano Higes Pascual y Profa. Dra. Aránzazu Meana Mañes

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 11 de septiembre de 2019

Fdo.: _____

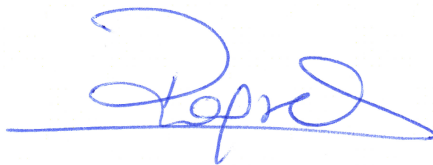
Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Dra. Aránzazu Meana Mañes, Catedrática de Parasitología y Enfermedades Parasitarias adscrita al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid; Dra. Raquel Martín Hernández, Investigadora del Laboratorio de Patología Apícola del Centro de Investigación Apícola y Agroambiental del Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (CIAPA-IRIAF) de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM); y Dr. Mariano Higes Pascual, Asesor Investigador Titular del Laboratorio de Patología Apícola, CIAPA-IRIAF (JCCM),

CERTIFICAN:

Que Almudena Urbieto Magro, Licenciada en Biología y Postgraduada en Agrobiología Ambiental, ha realizado bajo nuestra supervisión los trabajos de investigación desarrollados en la memoria de tesis doctoral titulada “Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*”, que consideramos reúne las condiciones de calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense, de Madrid.

Que, como resultado de este trabajo se han publicado hasta el momento, dos artículos en revistas del *Science Citation Index (International Journal for Parasitology y Veterinary Pathology*, y un tercero se enviará a *Insects*). Que, durante la realización de este trabajo, se han presentado seis posters y siete comunicaciones orales a congresos nacionales e internacionales.



VºBº Directora de Tesis
Dra. Raquel Martín Hernández



VºBº Director de Tesis
Dr. Mariano Higes Pascual



VºBº Directora de Tesis y Tutora
Profa. Dra. Aránzazu Meana Mañes

El trabajo presentado en esta memoria de Tesis Doctoral se ha realizado en el Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CIAPA), adscrito al Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF) de la Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural de la Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha, y en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), bajo la dirección de la Dra. Raquel Martín Hernández, el Dr. Mariano Higes Pascual y la Profa. Dra. Aránzazu Meana Mañes. Los análisis estadísticos se han llevado a cabo bajo la supervisión de la Dra. Laura Barrios Álvarez responsable del Área de Cálculo Científico de la unidad de estadística del SGAI-CSIC, de Madrid. La autora ha sido beneficiaria de la convocatoria FPI-INIA-2014, según la Resolución de 18 de marzo de 2015, por la que se publican las subvenciones concedidas para el año 2014, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, para la formación de personal investigador en agroalimentación en los centros de investigación agraria y alimentaria INIA-CC.AA. (FPI-INIA), en el marco del Subprograma Estatal de Formación del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 por la que se le concedió la titularidad del número de plaza 16 de la Línea de investigación RTA-2012-00076-C02-01. Asimismo, este trabajo contó con el apoyo de los fondos INIA-FEDER (Proyectos nacionales de investigación pública: RTA2012-00076-C02-01, RTA2013-00042-06 y RTA2015-00013-C03-01). Durante el desarrollo de la misma, la autora ha realizado una estancia en el *Laboratory of Molecular Entomology and Bee Pathology - Ghent University, (Krijgslaan 281 S2, B-9000 Ghent, Belgium)*, bajo la supervisión del Prof. Dr. Dirk C. de Graaf y ha disfrutado de una beca de intercambio científico (*Short-Term Scientific Missions*, STSM ref.: 38472; Título: *Training on next generation sequencing data analysis for an easy diagnostic of the colony health*) en el marco del programa europeo de cooperación científica y tecnológica, *COST -European Cooperation in Science & Technology - Super-B. Sustainable Pollination in Europe* (COST-Action ref.: FA1307). Las imágenes fotográficas que ilustran esta memoria han sido realizadas por Javier Almagro, Jesús García y Almudena Urbieta, y post-procesadas por José Ignacio Martín López, y las figuras iconográficas de las abejas por Susana Montesinos Núñez y Almudena Urbieta.

*A Txema y Almudena,
con toda mi admiración,
por vuestra educación, apoyo y amor*

*a Mayte e Ignacio,
mis alegres cómplices,
por vuestro compañerismo y amistad*

*a Alejandra, Álvaro y Andrea,
por recordarme cada día,
no olvidarme de jugar*

*y a todas ellas y ellos,
por un futuro dulce, diverso, colorido y comestible*

Prólogo

Las últimas estimaciones sugieren que, de un número aproximado en 8 millones de especies animales y plantas (75% de las cuales son insectos), alrededor de 1 millón están amenazadas de extinción¹. Esta es una de las conclusiones del informe, más exhaustivo hasta la fecha, realizado por la Plataforma Intergubernamental sobre Biodiversidad y los Servicios Ecosistémicos publicado en mayo en 2019. El investigador Lucas Garibaldi, experto en insectos polinizadores y co-coordinador del documento científico, afirma que “en 50 años se ha producido una fuerte disminución de la capacidad del planeta para sostener la vida humana”².

El 40% de las especies de insectos del planeta están amenazadas de extinción en los próximos 100 años³. En la última década, muchas poblaciones de insectos polinizadores están disminuyendo sustancialmente⁴⁻⁵. Cada año desaparecen un 2.5% de los insectos³.

El cambio de uso de la tierra, la intensificación agrícola, el uso de compuestos nitrogenados y otros fertilizantes y de plaguicidas nocivos, la pérdida de hábitats y la reducción de la conectividad funcional de los ecosistemas, son la principal causa que amenaza la extinción de los insectos en todo el planeta¹ y en Europa⁶. Asimismo, una de las principales amenazas para la biodiversidad global son las enfermedades emergentes⁷. Recientemente, un número sin precedentes de enfermedades fúngicas y de tipo fúngico (*like-fungy*) han causado algunas de las disminuciones y extinciones más graves jamás observadas en las especies silvestres⁸.

La supervivencia de las abejas, el sustento de aquellas personas que se benefician de su trabajo y el servicio de la polinización que proporcionan conservando gran parte de la biodiversidad terrestre, están bajo la amenaza de varios detractores de su salud⁹.

¹ IPBES (2019). *Media Release: Nature's Dangerous Decline 'Unprecedented'; Species Extinction Rates 'Accelerating'* | IPBES. <https://www.ipbes.net/news/Media-Release-Global-Assessment>

² Garibaldi, L. A. (2019). ENTREVISTA | Lucas Garibaldi, coordinador del informe IPBES. *eldiario.es BIODIVERSIDAD*. https://www.eldiario.es/ballenablanca/biodiversidad/producido-disminucion-capacidad-planeta-sostener_0_898360181.html

³ Sánchez-Bayo, F. y Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation* **232**, 8-27. doi: 10.1016/J.BIOCON.2019.01.020.

⁴ Nieto, *et al.*, (2014). *European Red List of Bees*. ed. Publications Office of the European Union IUCN Global Species Programme IUCN; European Union Representative Office, Luxembourg doi: 10.2779/77003.

⁵ Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., Stenmans, W., Müller, A., Sumser, H., Hörren, T., Goulson, D. y De Kroon, H. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS ONE* **12**. doi: 10.1371/journal.pone.0185809.

⁶ Habel, J. C., Samways, M. J. y Schmitt, T. (2019). Mitigating the precipitous decline of terrestrial European insects: Requirements for a new strategy. *Biodiversity and Conservation*. doi: 10.1007/s10531-019-01741-8.

⁷ Daszak, P., Cunningham, A. A. y Hyatt, A. D. (2000). Emerging Infectious Diseases of Wildlife-Threats to Biodiversity and Human Health.

⁸ Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. y Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186-194. doi: 10.1038/nature10947.

⁹ MAGRAMA (2018). Informe de resultados del programa de vigilancia 2016-2017 sobre las pérdidas de colonias de abejas. *Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España.*

La presencia de las abejas melíferas en nuestros paisajes ha invocado desde hace mucho tiempo imágenes de vitalidad, diligencia y cooperación¹⁰. Sin embargo, el estado actual de la salud de las abejas de la miel, como el de muchos otros insectos del planeta, presenta hoy “un panorama bastante devastador”³.

Aunque el número global de colmenas manejadas ha aumentado en un 45% en los últimos 60 años¹¹⁻¹², las colmenas de abejas melíferas en todo el mundo sufren las mismas amenazas y enfermedades y están disminuyendo a tasas similares (alrededor del 1% anual) en Norteamérica¹³, Europa¹¹ y Australia¹⁴.

Mientras que los parásitos y las enfermedades son los causantes próximos de las pérdidas actuales, los plaguicidas sintéticos han estado involucrados en las pérdidas desde su implantación en la agricultura moderna¹⁵.

El valor y la utilidad de los productos apícolas como la miel, el polen, los propóleos, la cera, la jalea real o el veneno de abeja, junto al papel crucial de la abeja melífera para la conservación de la agricultura y la biodiversidad silvestre, a través del servicio de la polinización, la convierten en una de las especies clave “en la preservación de la producción primaria, sobre la cual se sustenta la vida sobre este planeta”¹⁶. Su actividad productora y polinizadora convierte a la abeja melífera en uno de los insectos más provechosos para los ecosistemas, y para la humanidad.

La presente memoria ha sido realizada por Almudena Urbieto, Licenciada en Biología (UAM, 2003-2008), postgraduada con Máster de Investigación en Agrobiología Ambiental (UPV-EHU y UPNA/NUP, 2010-2011), y con experiencia de campo como productora agoecológica (*Cloughjordan Community Farm*, Irlanda, 2012-2014), que comenzó en 2015 su trabajo de investigación de tesis doctoral en el contexto actual sobre el declive de las colonias de abeja y la creciente preocupación social por la patología apícola, la conservación de la biodiversidad y los servicios de los ecosistemas. Basado en experiencia del Laboratorio de Patología Apícola del CIAPA (IRIAF-JCCM), el trabajo realizado por la novel investigadora aporta nuevo conocimiento sobre factores determinantes de las nosemosis en abejas melíferas, enfermedades de tipo fúngico que azotan la apicultura global desde principios del siglo XXI.

¹⁰ Botías Talamantes, C. (2013). Patrón epidemiológico y nuevos métodos de control de las nosemosis de *Apis mellifera* L. en España.

¹¹ Aizen, M. A. y Harder, L. D. (2009). The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Current Biology* **19**, 915-918. doi: 10.1016/j.cub.2009.03.071.

¹² vanEngelsdorp, D. y Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S80-S95. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.011.

¹³ Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. y Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.

¹⁴ Gibbs, J. (2013). Neonicotinoids in Australia. *The Australasian Beekeeper*. <http://www.theabk.com.au/articles/2016/8/4/neonicotinoids-in-australia>.

¹⁵ Ellis, J. (2012). The honey bee crisis the honey bee crisis. 5-10. doi: 10.1564/22feb10.

¹⁶ MITECO (2019). Borrador de Plan de Acción Nacional para la Conservación de los Polinizadores - Versión 1. 18 de enero de 2019. *Ministerio para La Transición Ecológica* **1**, 1-73.

*Lo diverso no es necesariamente desunido,
lo unificado no es necesariamente uniforme,
lo igual no es necesariamente idéntico,
lo diferente no es necesariamente inferior o superior.*

Boaventura de Sousa Santos, 2010

De las dualidades a las ecologías, 2012

Índice

1. INTRODUCCIÓN (p. 1)

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA (p.7)

2. NOSEMOSIS (p. 9)

2.1. ETIOLOGÍA (p. 9)

2.1.1. Morfología de *Nosema* spp. (p. 9)

2.1.2. Biología de *Nosema* spp. (p. 13)

2.1.3. Especificidad celular de *Nosema* spp. en el intestino medio de *A. mellifera* (p. 17)

2.1.4. Respuesta inmunitaria a la infección y factores relacionados (p. 18)

2.2. PATOLOGÍA (p. 23)

2.2.1. Efectos en la abeja individual (p. 24)

2.2.2. Efectos en la colonia de abejas (p. 28)

2.3. EPIDEMIOLOGÍA (p. 30)

2.4. CONTROL (p. 36)

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS (p. 41)

4. METODOLOGÍA GENERAL (p. 45)

CAPÍTULOS (p.53)

5. Infección natural de estadios inmaduros de abeja por *Nosema* spp. y su relación con la parasitación en abejas adultas (p. 55)

5.1. Resumen/ Summary (p. 56)

5.2. Antecedentes (p. 59)

5.3. Hipótesis (p. 59)

5.4. Materiales y métodos (p. 59)

5.5. Resultados (p. 69)

5.6. Discusión (p. 78)

6. La edad de las abejas obreras y el método experimental de infección con esporas de *Nosema ceranae* influyen en el desarrollo y curso de la enfermedad (p. 85)

6.1. Resumen / Summary (p. 87)

6.2. Antecedentes (p. 89)

6.3. Hipótesis (p. 89)

6.4. Materiales y métodos (p. 89)

6.5. Resultados (p. 95)

6.6. Discusión (p. 99)

7. Patogenia de la infección con dosis bajas de *N. ceranae* (p. 105)

7.1. Resumen / Summary (p. 107)

7.2. Antecedentes (p. 109)

7.3. Hipótesis (p. 109)

7.4. Materiales y métodos (p. 109)

7.5. Resultados (p. 115)

7.6. Discusión (p. 120)

8. Tropismo tisular de *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en abejas obreras (*Apis mellifera*) infectadas experimentalmente (p. 125)

8.1. Resumen / Summary (p. 127)

8.2. Antecedentes (p. 129)

8.3. Hipótesis (p. 129)

8.4. Materiales y métodos (p. 129)

8.5. Resultados (p. 133)

8.6. Discusión (p. 142)

9. DISCUSIÓN GENERAL (p. 147)

10. CONCLUSIONES (p. 159)

11. RESUMEN / SUMMARY (p. 165)

12. REFERENCIAS (p. 171)

13. APÉNDICES (p. 211)

Publicaciones (p. 213)

Afiliación de coautores (p. 257)

Agradecimientos (p. 259)

*Mucha gente pequeña,
en lugares pequeños,
haciendo cosas pequeñas,
pueden cambiar el mundo.*

Eduardo Galeano 1940-2015

Abreviaturas

AA: abejas adultas totales (INT + PEC).

ADNc: ADN complementario de primera cadena.

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.

AN: ácidos nucleicos totales (ADN + ARN).

ARNds: ARN bicatenario

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero.

BB: muestras de cría de abeja en diferentes estadios de desarrollo, por sus siglas en inglés *Bee Brood*.

bp: número de pares de bases del fragmento amplificado por PCR.

Cel: celdas donde se desarrolla la cría de abeja hasta su emergencia como abeja adulta.

CIAPA-IRIAF: Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo - Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal.

CIDE: Centro De Investigaciones Sobre Desertificación (Valencia).

CNME: Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

CO₂: gas dióxido de carbono empleado para anestésiar a las abejas durante su manejo.

COI: gen de la subunidad I de la *Citocromo Oxidasa* de *A. mellifera* utilizado como control interno de la PCR.

Cp: ciclo de amplificación en las rt-PCR que se corresponde al punto de corte con el umbral calculado a través del algoritmo estadístico de Máximo de la 2ª derivada, por sus siglas en inglés *Crossing point* (=Ct: *cycle threshold value*).

CREA: Centro de Investigación para la Agricultura y el Medio Ambiente.

CREA: Consejo de investigación en la agricultura y economía de Italia (*Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia*).

d.p.e.: días post-emergencia (edad de las abejas adultas).

d.p.i.: días después de la infección (inoculación o administración de esporas de *Nosema* spp.).

DI₅₀: Dosis Infecciva 50; dosis de esporas necesaria para infectar el 50% de las abejas.

DL₅₀: Dosis Letal 50; dosis de esporas necesaria para producir la muerte del 50% de las abejas.

EE.UU.: Estados Unidos de América del Norte.

EMA: Agencia Europea del Medicamento, por sus siglas en inglés *European Medicines Agency*.

ES: esporas vacías.

HE: tinción Hematoxilina-Eosina.

I: íleon.

INIA: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agroalimentaria.

INT: abejas adultas de interior (jóvenes).

IPC: control interno de la reacción de PCR, por sus siglas en inglés *Internal PCR Control*. En PCR convencional y rt-PCR, representa la detección de ADN de *A. mellifera*.

JCCM: Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha.

LMR: Límite de Residuos Máximos autorizados, por sus siglas en inglés (Reglamento de la Comisión UE no. 37/2010, 2010).

M: merontes.

MET: microscopía electrónica de transmisión.

min: minuto/s.

MO: microscopía de óptica.

MS: esporas maduras.

Mt: túbulos de Malpighi.

NA: *Nosema apis*.

NA-RPBI: gen que codifica la *subunidad mayor de la proteína ARN polimerasa II* de *N. apis* (rt-PCR).

NC: *Nosema ceranae*.

NC-PTP3: gen que codifica la *proteína del túbulo polar 3* de *N. ceranae* (rt-PCR).

NC-RPBI: gen que codifica la *subunidad mayor de la proteína ARN polimerasa II* de *N. ceranae* (rt-PCR).

nt: nucleótidos

NTCs: controles sin muestra en las reacciones de extracción de ácidos nucleicos, de retro-transcripción y de PCR y rt-PCR, por sus siglas en inglés *No Template Control*.

°C: grado Celsius (unidad termométrica).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*.

PCR-RFLP: técnica de PCR para la detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

PEC: abejas adultas pecoreadoras (las más maduras).

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, por sus siglas en inglés *Real-Time-quantitative PCR*.

RFU: unidad de fluorescencia relativa, medida utilizada en electroforesis.

rpm: revoluciones por minuto.

RTC: control de la reacción de retro-transcripción (síntesis de ADNc con muestra y sin enzima), por sus siglas en inglés *Retro-Transcription Control*. **rt-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, por sus siglas en inglés *Real-Time-PCR*.

SB: esporoblasto.

SGAI-CSIC: Área de Cálculo Científico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

smc: células musculares esqueléticas.

SP: esporonte.

tpo: tiempo post-operculación empleado en la clasificación de muestras de cría de abeja.

UCM: Universidad Complutense de Madrid.

UE: Unión Europea.

218MITOC: locus del gen *16S rRNA* de *N. ceranae* (PCR).

321APIS: locus del gen *16S rRNA* de *N. apis* (PCR).

ddH₂O: agua de destilación doble, calidad de PCR.

dH₂O: agua destilada, calidad de PCR.

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

- Tabla 2.1.** Características morfológicas de la espora de *Nosema* spp. en *A. mellifera*. El tamaño relativo entre especies hace referencia a sus dimensiones mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). La comparación entre especies facilita el diagnóstico en muestras de infecciones mixtas. Fuentes: (1): Fries et al., 1996; Chen et al., 2009; (2): Chen et al., 2013; (3): Fries et al., 1996; Higes et al., 2007; Chen et al., 2009; (4): Fries, 1989; (5): Chemurot et al., 2017. _____ 11
- Tabla 2.2.** Resumen de ensayos de mortalidad en laboratorio. Edad: días post-emergencia (p.e) de las abejas obreras en el momento de la inoculación de esporas. Método de infección: I= inoculación individual; C= inoculación colectiva con esporas suspendidas en el alimento. d.p.i.: días post-inoculación; tiempo al que se analiza la mortalidad. DL50: dosis de esporas de *N. ceranae* que produce la muerte del 50% de las abejas; del mismo modo DL11, DL100, etc. (dosis de esporas de *N. ceranae* que produce la muerte del 11% o del 100% de las abejas, respectivamente). DI50: dosis de esporas de *N. ceranae* que produce la infección del 50% de las abejas; del mismo modo DI16,5; DI100, etc. Dosis mínima: dosis de esporas de *N. ceranae* necesaria para infectar al menos a una abeja. _____ 25
- Tabla 2.3.** Lista de tratamientos estudiados para el control de la nosemosis tipo C. No existen sustancias autorizadas para el control de la nosemosis en la Unión Europea. Dada la estricta reglamentación sobre el uso de tratamientos en animales destinados a la producción de alimentos, se deben tomar precauciones en la interpretación de esta tabla que solo señala las líneas de investigación abiertas. "↑": aumento "↓": disminución. "↕" la mortalidad varió entre tratamientos y concentraciones ensayadas de un mismo producto o sustancia. Las métricas que no se midieron se indican como no aplicables (NA). Fuentes: 1 Rodríguez- García, 2017; 2 Botías et al., 2012e; 3 ver Burnham, 2019. _____ 37
- Tabla 5.1.** Diseño del muestreo. Meses en los que se tomaron muestras de cría de abeja (BB), abejas adultas de interior (INT) y pecoreadoras (PEC), y muestras de las celdas ocupadas previamente por las crías. _____ 60
- Tabla 5.2.** Número de muestras analizadas en el estudio. BB: muestras de cría en diferentes estadios de desarrollo; Celdas (Ensayo 2): celdas donde se desarrolla la cría de abeja hasta su emergencia como abeja adulta; INT: abejas adultas de interior (jóvenes); PEC: abejas adultas pecoreadoras (mayores); AA: abejas adultas totales (INT + PEC). _____ 60
- Tabla 5.3.** Clasificación de las muestras de cría según su etapa de desarrollo mediante reconocimiento visual y siguiendo las indicaciones de la guía COLOSS de Human et al. (2013). _____ 61
- Tabla 5.4.** Cebadores de la triplex-PCR en placas gelificadas Biotools®. Cebadores: 218MITOC (locus del gen 16S rRNA de *N. ceranae*); 321APIS (locus del gen 16S rRNA de *N. apis*) y COI (gen de la subunidad I de la Citocromo Oxidasa de *A. mellifera*) utilizado como control interno de la PCR (IPC). En cada par de cebadores: F –forward- y R –reverse-. 2007: Martín-Hernández et al., 2007. 2012: Martín-Hernández et al., 2012. Amplicón: tamaño del fragmento amplificado indicado en número de pares de bases (bp). _____ 65
- Tabla 5.5.** Cebadores y sondas de la rt-PCR utilizada. NC-PTP3: gen de la proteína del túbulo polar 3 de *N. ceranae*; NA-RPB1: gen de la subunidad mayor de la proteína ARN polimerasa II de *N. apis*. β -actina: [1] Martín-Hernández et al., 2017. Cebadores: F –forward- y R –reverse-; Sonda: P –probe-. Amplicón: tamaño del fragmento amplificado indicado en número de pares de bases (bp). _____ 67

Tabla 5.6. Número de muestras positivas y porcentaje (entre paréntesis) de detección de *Nosema* spp. por PCR convencional y por PCR en tiempo real, según la fase de desarrollo de la cría de abeja. Co-detección y co-infección indican la detección simultánea de ADN o ADNc de *N. ceranae* y *N. apis* en una misma muestra según el método de amplificación utilizado PCR o rt-PCR, respectivamente. _____ 70

Tabla 5.7. Porcentaje de muestras de cría positivas a *Nosema* spp. detectadas por PCR convencional y por rt-PCR en cada temporada (pre-invernada y post-invernada) y año. NC: *N. ceranae*; NA: *N. apis*; NC&NA: co-detección simultánea de ADN o ADNc de *N. ceranae* y *N. apis* en una misma muestra según el método de amplificación utilizado PCR o rt-PCR, respectivamente. _____ 71

Tabla 5.8. Valores de Cp obtenidos del análisis de los genes *N. ceranae*-PTP3 y *N. apis*-RPB1 en muestras individuales de cría de abeja mediante rt-PCR. _____ 72

Tabla 5.9. Recogida de muestras y prevalencia de *Nosema* spp. en la cría de abeja (BB), abejas adultas de interior (INT) y pecoreadoras (PEC), y dentro de las celdas de la cría. Cada muestra incluyó 5 colmenas, excepto cuando no hubo abejas disponibles o cuando las colmenas murieron. Co-infección: muestras individuales infectadas simultáneamente por *N. ceranae* y *N. apis*. _____ 74

Tabla 5.10. Validación del ensayo de multiplicación de *N. ceranae* y *N. apis* por rt-PCR. El ADN y el ARN se extrajeron de esporas ambientales de *N. ceranae* y *N. apis*. Valores de Cp obtenidos para las muestras de ADN, ADNc y para los controles de retro-transcripción (RTC; ARNm sin enzima retro-transcriptasa). El valor de 0 indica la no detección de amplificación. Eficiencia del gen β -actina (91,4%) utilizando la metodología descrita anteriormente (Martín-Hernández et al., 2017). 77

Tabla 6.1. Número de abejas totales en cada cohorte y grupo de infección. Grupo A: abejas infectadas individualmente (n= 20 abejas x 3 jaulas). Grupo B: abejas infectadas colectivamente (n= 20 abejas x 1 jaula). T: testigo. -: grupo de abejas no disponible. Las abejas que murieron se sacaron del estudio. 92

Tabla 6.2. PTP3 Block® Gene Fragment. Fragmento del genoma de *N. ceranae* de 281 nucleótidos incluyendo las secuencias de las región de los cebadores NC-PTP3 subrayadas en rojo, y la secuencia de la sonda UPL#72 en azul. Posición del fragmento en 500-780 nt del gen gi|557790804|gb|KC520145.1| *Nosema ceranae* isolate 526 clone 11 polar tube protein 3 (PTP3) gene, partial cds sequence, del GenBank. Una única secuencia de hasta 276 coincidentes y disponibles en el GenBank tiene un solo desajuste (missmatch) en la posición prima reverse (0,3% no coincidente). _____ 94

Tabla 6.3. Número de abejas y porcentaje de abejas infectadas por *N. ceranae* a los 7 días post-inoculación (d.p.i.). Grupo A: abejas infectadas individualmente (n≈ 30 abejas/ cohorte de edad) con esporas de *N. ceranae*; (*) : n< 30 abejas debido a una alta mortalidad acumulada de las abejas a los 7 d.p.i. Grupo B: abejas infectadas colectivamente (n≈ 10 abejas/ cohorte de edad), con las mismas esporas. T: testigo. _____ 96

Tabla 7.1. Cebadores utilizados en las reacciones rt-qPCR con señal sonda que codifican para genes de *A. mellifera*. Nombre de los cebadores: primer/Locus y su identificación (Gen ID). Secuencia: cada par de cebadores (F –forward- y R –reverse-) y de la sonda (P –probe-) en sentido 5’ – 3’. Sondas TaqMan® - BHQ®. HK: gen de referencia. _____ 113

Tabla 8.1. Condiciones del ensayo y diseño del muestreo. Grupos de abejas de 5 días infectadas experimentalmente de manera individual por *N. apis* o *N. ceranae* con 5 o 10 x 10⁴ esporas purificadas (cuatro niveles: especie y dosis): A5, A10, C5, C10. Testigo no infectado: T0. Muestreo de abejas a los 7, 10 y 15 días post-infección (d.p.i). Análisis histopatológico de tejidos de las abejas infectadas por microscopía (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET). _____ 131

Figuras

Figura 2.1. Taxonomía de los microsporidios y otros grupos de hongos. Figura: detalle de James et al. (2013). _____ 9

Figura 2.2. Esporas de *Nosema* spp. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de una espora de *N. ceranae* (Izquierda), *N. apis* (centro) y *N. neumannii* (derecha). Fuente: Imágenes extraídas de Higes et al (2006); original del CIAPA; y Chemurot et al (2017), respectivamente de izquierda a derecha. ____ 12

Figura 2.3. Germinación de la espora de un microsporidio. La germinación tiene lugar debido a un aumento en la presión osmótica en el interior de la espora (Kudo, 1918; Xu y Weiss, 2005), que conduce a la entrada de agua en su interior y termina con la extrusión del filamento polar. En la espora latente (1) el polaroplasto y la vacuola posterior se hinchan rompiendo la parte anterior (2), por donde se libera el filamento polar (3) (Williams, 2009). Este forma un canal a través del cual el esporoplasma es forzado a salir (4). Tras su emergencia, el esporoplasma queda rodeado por una nueva membrana (5). Si la germinación tiene lugar en la proximidad de la célula hospedadora, el filamento polar se ancla a ella y actúa como puente a través del cual transfiere el esporoplasma a su interior (Xu y Weiss, 2005). Imagen original de Gómez-Moracho (2015), modificada a partir de Keeling y Fast (2002), con permiso de utilización. ____ 14

Figura 2.4. Esquema del ciclo biológico de *Nosema* spp. Tras la germinación de las esporas en el lumen del intestino medio (G1), y en contacto con las células ventriculares (Célula epitelial 1), se pueden distinguir dos etapas intracelulares: 1) merogonia (I-III), en la que se produce la división exponencial del parásito, y 2) la esporogonia (IV-IV), con la generación de esporas primarias infectivas. Los estadios celulares corresponden a: meronte (II), plasmodios multinucleados (III), esporonte (IV), esporoblastos (V), y esporas, que en ocasiones se diferencian en esporas primarias (VI) o en esporas maduras (I). G2: Germinación intracelular de una espora primaria que puede inyectar el esporoplasma en la célula adyacente

(Célula epitelial 2) o en la misma célula reinfectándola, quedando la espora vacía (VII). Célula epitelial X: eventualmente una célula infectada se lisa y las esporas maduras son liberadas a la luz del intestino, desde donde pueden infectar nuevas células epiteliales o ser expulsadas con las heces. Fuente: modificada de Gómez-Moracho (2015), con permiso de utilización y modificación. _____ 15

Figura 2.5. Esquema de la respuesta del sistema inmune innato de *A. mellifera*. _____ 19

Figura 2.6. Esquema de la respuesta eusocial de las colmenas de *A. mellifera*. La inmunidad social resulta en la prevención, el control o la eliminación de las infecciones transmisibles en el súper-organismo. Fuente: original. _____ 22

Figura 4.1. Estructura de una colonia de *Apis mellifera*. Derecha: castas sociales de abejas melíferas adultas: abeja obrera (hembra), abeja zángano (macho), y abeja reina (hembra fértil). Izquierda: ciclo biológico de una abeja obrera en días; 1: puesta del huevo; 4-9: larva; 9-21: cría operculada (larva y pupa); 21: emergencia de abeja adulta; 21-23: abeja limpiadora de celdas de cría; 23-31: abeja nodriza (cuidado de cría y producción de pan de abeja); 31-39: abeja de interior cerera y almacenadora de alimento (miel y polen); 39-42: abeja guardiana de la entrada de la colmena, 43+: abeja buscadora de alimento o pecoreadora. Fuentes: imagen derecha modificada con permiso de Ask A Biologist (<https://askabiologist.asu.edu/bee-colony-life/>); imagen izquierda original. _____ 49

Figura 4.2. Manejo de abejas en el laboratorio. . A: Incubadora a 34°C (±1°C) con cuadros de cría de abeja libres de *Nosema* spp. B: Abeja emergiendo de la celda y rodeada de cría operculada. C: Las abejas se mantienen en jaulas de malla de acero, alimentadas ad libitum con una solución azucarada y rica en aminoácidos y vitaminas. D: Las jaulas con abejas se mantienen en incubadoras, a temperatura y humedad controladas. E: Cámara de inducción de anestesia veterinaria con abejas en su interior y detalle de la bomba de CO₂. F: esporas en un gradiente de

- Percoll® isotónico al 95% (en dH₂O) a razón 1:9 y centrifugadas 40 min a 11.000g. G-H: recuento de esporas de *N. apis* (G) y *N. ceranae* (H) en un hemocitómetro Neubauer®, y observadas bajo un microscopio óptico en contraste de fase (x40 y Ph2); detalle de una microcuadrícula (1/60) de recuento. Fuente: original. _____ 51
- Figura 5.1.** Graphical abstract: The levels of natural *Nosema* spp. infection in *Apis mellifera iberiensis* brood stages _____ 58
- Figura 5.2.** Área de puesta de la abeja reina. Izquierda: la reina tiende a colocar la puesta de huevos siguiendo un patrón circular-ovalado, o lo que es lo mismo, siguiendo un patrón en elipse; comenzando desde el centro del cuadro de cría hacia fuera. Derecha: cuando las crías maduras emergen dejando las celdas vacías, la reina tiende a volver a utilizarlos, de modo que se pueden encontrar diferentes etapas de desarrollo a lo largo de la elipse en un mismo cuadro de cría. Los cuadros de cría se sitúan en el centro de la colmena, esta predilecta posición proporciona una temperatura constante más alta ($\pm 34^{\circ}\text{C}$) y protección para el correcto desarrollo de las abejas. Fuente: original. _____ 61
- Figura 5.3.** Clasificación de las muestras de cría según su etapa de desarrollo por reconocimiento visual. L: larvas post-operculación; P1-P6: pupas en diferentes etapas de desarrollo o tiempo post-operculación (tpo). Único ejemplar de P1 en la figura presenta restos de cera adheridos al cuerpo. Fuente: original. _____ 62
- Figura 5.4.** Porcentaje de celdas de cría positivas para *Nosema* spp. en relación a la detección de *Nosema* spp. en la cría de abejas. (+) indica un resultado positivo. (-) indica resultado negativo. Cría positiva: porcentaje de celdas negativas (Cel-) que estaban ocupadas con cría positiva (BB+) detectada por PCR o por rt-PCR. Celdas positivas: porcentaje de celdas de cría positivas (Cel+) que estaban ocupadas por muestras de cría negativas (BB-). _____ 75
- Figura 5.5.** Prevalencia de la infección por *N. ceranae* en abejas adultas comparando colmenas agrupadas en las que la cría de abejas fue positiva (BB+ en gris) o negativa (BB- en negro), por temporada apícola y antes, durante y después del muestreo de la cría de abeja. Arriba: pre-
 invernada. Abajo: post-invernada. Las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($P > 0,05$). #: colmenas no disponibles con BB infectada. _____ 76
- Figura 6.1.** Inoculación individual de abejas del Grupo A. Las abejas en ayunas (2 h) y anestesiadas (CO₂), se sujetaron delicadamente por las alas y al despertar, una gota de agua (2 μl) conteniendo 114.000 esporas de *N. ceranae* se aproximó a la boca de los insectos con una punta de micropipeta. Las abejas reaccionaron rápidamente al estímulo ingiriendo el inóculo de esporas, y en su defecto fueron descartadas. Las abejas testigo se alimentaron individualmente con 2 μl de agua sin esporas. Fuente: original. 92
- Figura 6.2.** Concentración media de ADN del gen *N. ceranae*-PTP3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a los 7 días tras la infección individual de las abejas del Grupo A. Las letras indican significancia estadística $P < 0,05$ (prueba de Mann-Whitney de una cola); *: casos extremos; °: casos muy poco probables. 97
- Figura 6.3.** Concentración media de ADN del gen *N. ceranae*-PTP3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a los 7 días tras la infección colectiva de las abejas del Grupo B. sd: sin datos; *: casos extremos; °: casos muy poco probables. _____ 98
- Figura 7.1.** Efecto de la alimentación con esporas de *N. ceranae* en la tasa de mortalidad (% de muerte acumulada) de abejas obreras adultas. Función de supervivencia de Kaplan Meier. _____ 116
- Figura 7.2.** Consumo medio diario por abeja. Cantidad de alimento consumido (mg) por abeja y día, y a lo largo del estudio. Se asume que la ingesta de alimento es homogénea entre todas las abejas de una misma jaula. _____ 117
- Figura 7.3.** Demanda nutricional de las abejas. Cantidad media de alimento consumido (mg) por abeja, desde el momento de la inoculación hasta el final del estudio. Se asume que la ingesta de alimento es homogénea entre todas las abejas enjauladas juntas. _____ 117
- Figura 7.4.** Modulación de genes en abejas infectadas por *N. ceranae* a lo largo del tiempo. Nivel de sobre-expresión (>1) o sub-expresión (<1) de los genes RING, E-cyclin; BIRC5 y Buffy corregidos con la eficiencia de cada reacción y normalizados con la expresión del gen EF1 en cada punto del muestreo (n=5 abejas

analizadas conjuntamente por grupo y punto de muestreo). *: regulación estadísticamente significativa ($P < 0,05$). sd: sin datos. _____ 119

Figura 8.1. Anatomía y disección de *A. mellifera*. A: Diagrama que ilustra la posición del cerebro y el cordón nervioso a lo largo de la cabeza, tórax y abdomen (verde); sistema circulatorio de la hemolinfa, corazón y la aorta (rojo); sistema digestivo (azul); y cuerpo graso del abdomen (marrón); túbulos de Malpighi (morado). Tre: trehalosa; Glu: glucosa. B: Disección de las muestras de abeja en cuatro secciones: tracto digestivo abdominal, cabeza, tórax y abdomen vaciado. C: Detalle de la posición del cerebro y los nervios principales de la cabeza, vista anterior. D: Cabeza, tórax y abdomen con detalle de las glándulas de la cabeza, órganos de los músculos de vuelo del tórax y los órganos subyacentes, y del tracto digestivo (estómago anterior, proventrículo, ventrículo con los tubos de Malpighi unidos, íleon y recto). E: Detalle de la posición de los nervios principales de la cabeza: vista dorsal con las glándulas removidas; tráquea torácica removida para exponer el sistema nervioso, el aparato urinario y el piso del abdomen. Fuente: original modificado de Carreck et al., 2013 (originales de C, D y E) y Even et al., 2012 (A modificado y detalle de B). _____ 132

Figura 8.2. Abeja infectada con 50.000 esporas de *N. ceranae* a los 15 d.p.i. Sección transversal a través del íleon rodeado de varios túbulos de Malpighi (Mt). Detalle de las células epiteliales eosinofílicas no infectadas (flecha) del íleon y de un gran número de esporas maduras en el lumen (asterisco). Una fina capa de células musculares esqueléticas (smc) es visible en la periferia. Aumento: 10x. _____ 135

Figura 8.3. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. apis* a los 10 d.p.i. Sección longitudinal del recto con algunos restos fecales que contienen numerosas esporas de *N. apis* (asterisco) rodeadas de la membrana peritrófica (flecha) y polen (punta de flecha). Aumento: 10x. _____ 135

Figura 8.4. Ventrículo de una abeja infectada con 50.000 esporas de *N. ceranae* a los 15 d.p.i. Células epiteliales intensamente infectadas con *N. ceranae*. En esta imagen son visibles algunas

membranas peritróficas (asterisco) en el lumen del intestino, así como los grupos de células regenerativas limitados dentro de los nichos de los pliegues epiteliales. Gotas citoplasmáticas llenas de esporas sobresalen en el lumen (flecha negra), con algunas células epiteliales mostrando una moderada vacuolización (flecha gris) y otras células presentan un núcleo apical desplazado (punta de flecha). En la periferia es visible una fina capa de miocitos, así como algunas tráqueas (t) y túbulos de Malpighi (Mt). Tinción: HE. Aumento: 20x. _____ 137

Figura 8.5. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. ceranae* a los 10 d.p.i. Tejido del ventrículo muy infectado. Esporas maduras basófilas en la región apical de las células epiteliales (flecha). Estructuras parasitadas más grandes, heterogéneas y teñidas en el fondo de los pliegues y de las células basales regenerativas, lo que sugiere diferentes etapas del ciclo biológico del microsporidio (punta de flecha). Tinción: Azul de metileno (de tipo básico no diferencial, aumento de contraste). Aumento: 20x. _____ 137

Figura 8.6. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. ceranae* a los 10 d.p.i. Región pilórica y de la apertura de los túbulos de Malpighi en el íleon donde las células epiteliales (flecha) y el lumen (asterisco) del ventrículo contienen esporas de *N. ceranae*. Las células epiteliales no infectadas pueden verse tanto en el íleon (I) como en los túbulos de Malpighi (Mt). Tinción: HE. Aumento: 20x. _____ 137

Figura 8.7. Ventrículo de una abeja infectada con 50.000 esporas de *N. apis* a los 10 d.p.i. Células epiteliales intensamente infectadas con diferentes estadios intracelulares del parásito y restos de membranas peritróficas (flecha) en el lumen. Tinción: HE. Aumento: 10x. _____ 137

Figura 8.8. Intestino de una abeja infectada con 100.000 esporas de *N. apis* a los 7 d.p.i. Numerosas células epiteliales y algunos grupos de células regenerativas (flechas) están infectadas con diferentes etapas de *N. apis*. Esporas maduras basofílicas en la región apical de las células epiteliales, y estructuras parasitarias heterogéneas y teñidas (inmaduras o vegetativas) en el fondo de los pliegues y en las

- células regenerativas. Tinción: Azul de metileno. Aumento: 20x. _____ 137
- Figura 8.9.** Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. apis* a los 10 d.p.i. En la apertura de los túbulos de Malpighi (Mt) en el íleon las esporas de *N. apis* pueden verse en las células epiteliales (flecha) del ventrículo, mientras que las células epiteliales no infectadas son evidentes tanto en el íleon (I) como en los túbulos de Malpighi (Mt). Tinción: HE. Aumento: 20x. _____ 137
- Figura 8.10.** Sección longitudinal del cerebro (punta de flecha) y sacos traqueales (flecha) de la cabeza. Aumento: 10x. _____ 139
- Figura 8.11.** Varios conductos glandulares (asteriscos), glándulas salivales (punta de flecha) y células musculares esqueléticas (flecha). Aumento: 20x. _____ 139
- Figura 8.12.** Glándulas salivales (asterisco) y células musculares esqueléticas (flecha) del tórax. Aumento: 10x. _____ 139
- Figura 8.13.** Ganglio torácico del sistema nervioso (asterisco). Se muestran las células musculares esqueléticas y glándulas salivales (punta de flecha) y los sacos traqueales (flecha) del tórax. Aumento: 10x. _____ 139
- Figura 8.14.** Tergitas con apodema (asterisco) y membrana intersegmental. Se muestran las células del cuerpo adiposo abdominal (células pericárdicas, flecha) entre el tegumento, así como las células musculares esqueléticas (punta de flecha) y los sacos traqueales. Aumento: 10x. _____ 139
- Figura 8.15.** Íleon con muchas esporas maduras de *N. apis* en el lumen (asterisco). En la periferia son visibles una fina capa de células musculares esqueléticas (flecha) y túbulos de Malpighi (MT). Detalle de una célula epitelial no infectada del íleon (punta de flecha). Aumento: 10x. _____ 139
- Figura 8.16.** Sección horizontal de la cabeza muestra las glándulas hipofaríngeas y salivales (puntas de flecha), y una sección del ojo compuesto (asterisco) y del cerebro (flecha). Aumento: 20x. _____ 139
- Figura 8.17.** Sección longitudinal del cerebro (flecha), la glándula hipofaríngea (punta de flecha) y las células musculares esqueléticas (asterisco). Aumento: 10x. _____ 139
- Figura 8.18.** Glándula hipofaríngea (asterisco) y sacos traqueales (punta de flecha) de la cabeza. Aumento: 20x. _____ 139
- Figura 8.19.** Glándulas salivales (asterisco), células musculares esqueléticas (flecha) y sacos traqueales (punta de flecha) del tórax. Aumento: 20x. _____ 139
- Figura 8.20.** Células adiposas abdominales (asterisco) y traqueolas delgadas (flecha). Aumento: 20x. _____ 139
- Figura 8.21.** El recto recubierto por un epitelio delgado está vacío y retraído. Tinción: HE. Aumento: 10x. _____ 139
- Figura 8.22.** Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. apis* a los 7 d.p.i. Imagen que muestra un grupo de células de los núcleos de regeneración junto a los pliegues basales parasitadas con diferentes estadios del ciclo biológico del microsporidio: merontes (M), esporonte (SP), esporoblasto (SB), esporas maduras (MS) y esporas vacías (ES). Aumento: 8.000x. _____ 141
- Figura 8.23.** Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. ceranae* a los 7 d.p.i. Detalle de una célula hospedadora que tiene un meronte con un núcleo diplocariótico (flecha), rodeada por el retículo endoplásmico rugoso y numerosas mitocondrias de la célula de la abeja (punta de flecha). Aumento: 30.000x. _____ 141
- Figura 8.24.** Abeja infectada con 50.000 esporas de *N. ceranae* a los 7 d.p.i. Detalle de una célula hospedadora con dos merontes (M), algunos esporontes (SP) y un esporoblasto (SB), rodeados por un retículo endoplásmico rugoso discontinuo y desorganizado (RER: flechas) y con algunos ribosomas sueltos. Se puede observar inflamación celular moderada y un lisosoma secundario (L). Aumento: 12.000x. _____ 141

INTRODUCCIÓN GENERAL

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinant factors of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las abejas melíferas, *Apis mellifera* Linneo 1758, son de gran relevancia para los ecosistemas terrestres debido a su papel fundamental como polinizadores de plantas silvestres y cultivos en todo el mundo. Se trata de la especie de abeja más ampliamente distribuida a nivel global, que gracias a su alta adaptabilidad y productividad ha sido introducida en todos los continentes. El valor y la utilidad de los productos derivados de la apicultura como la miel, el polen, los propóleos, la cera, la jalea real o el veneno de abejas (apitoxina), junto al servicio de la polinización en la agricultura (cuyo valor, únicamente referido a la producción de alimentos, se valora en 500.000 millones de dólares a nivel mundial), y su papel crucial para la conservación de la biodiversidad silvestre, la convierten en una especie clave para la preservación de la producción primaria global, sobre la que se sustenta la vida del planeta (MITECO, 2019). Su actividad productora y polinizadora convierten a la abeja melífera en uno de los insectos más provechosos para los ecosistemas, y para la humanidad.

La importancia de este insecto hace que sea prioritario mantener en buen estado la salud de sus poblaciones, y por tanto, de las colonias de abejas melíferas, que de forma principal se encuentran manejadas por apicultores. En el contexto actual de cambio global el bienestar de las poblaciones de abejas melíferas no puede entenderse sin tener en cuenta su diversidad genética, las plagas y enfermedades a las que se enfrentan, y otros aspectos con impacto más local, como las contaminaciones ambientales por la presencia de plaguicidas industriales, agrícolas o agropecuarios.

En las últimas décadas muchas poblaciones de abejas y otros insectos han disminuido de forma llamativa y acelerada. Los últimos estudios señalan a una disminución gradual en el número y abundancia de las especies de abejas, y a una tendencia creciente a la disminución de las colonias de abeja melífera al nivel mundial. En el caso específico de *A. mellifera*, es difícil estimar la cantidad de colonias que se pierden, si bien, hay distintas aproximaciones a nivel europeo y mundial para cuantificar dichas pérdidas. Gracias a esos estudios se ha determinado que anualmente se producen pérdidas elevadas, con la consecuente disminución de su productividad ganadera.

Parece poco probable que un solo factor sea el causante de todas las pérdidas masivas registradas desde principios del siglo XXI. Las hipótesis más recientes plantean la posibilidad de que varios factores, bióticos y abióticos, pueden estar produciéndose simultáneamente, o se influyan mutuamente. Los efectos negativos producidos por los parásitos más prevalentes como el ácaro *Varroa destructor*, los virus asociados y el microsporidio *Nosema ceranae*, así como la combinación de todos ellos, junto a la exposición crónica a plaguicidas de distinto origen, con especial predominancia de acaricidas e insecticidas, y deficiencias en la nutrición de las colmenas de abejas, se postulan como las causas más probables.

Desde finales de los años noventa, el sector profesional de la apicultura ibérica alertó del aumento inusual en la cantidad de colonias de abejas muertas sin causa conocida. Este fenómeno se

caracterizó por la progresiva disminución del número de abejas de una colonia y, al no poder mantener las abejas que sobreviven las tareas elementales dentro de la colmena, esta termina muriendo. Ya en aquellos años se observaron descensos evidentes de las producciones de miel y polen, que pusieron de manifiesto la aparición de colmenas vacías, sin abejas o con muy pocas, pero con suficientes reservas. En el año 2004 y coincidiendo con este fenómeno, el equipo del Laboratorio de Patología Apícola del CIAPA recibió un gran número de muestras de colonias de abejas afectadas, procedentes de todo el territorio español, para el análisis de patógenos, y se detectó una elevada e infrecuente prevalencia de muestras positivas a *Nosema* spp.

En aquel momento, tan solo el microsporidio *Nosema apis* estaba descrito en abejas europeas como el agente causal de la enfermedad de la nosemosis (actualmente nosemosis tipo A). Sin embargo, las manifestaciones clínicas del entonces denominado “Síndrome de despoblamiento de las colmenas” no coincidían con las de la nosemosis, ni con cualquier otra enfermedad conocida, o acción tóxica de plaguicidas. Las secuencias genéticas de las esporas de muchas de las muestras examinadas resultaron ser 100% homólogas a las de la especie *Nosema ceranae*, hasta entonces un endoparásito solo descrito en la especie asiática, *Apis cerana*, de la que recibe su nombre. A partir de su detección en Europa, y en tan solo dos años, se confirmó la presencia de *N. ceranae* en prácticamente todas las regiones del mundo en las que se practica la apicultura con *A. mellifera*.

Desde el año 2007, se ha generado un incremento en los estudios relacionados con la muerte de colonias, estimulados en gran parte por un grupo de trabajo transnacional reunido inicialmente para la “Prevención de las pérdidas de abejas melíferas” en la apicultura (*Preventing COLony LOSSes*, por sus siglas en inglés COLOSS), y en torno al primer programa paneuropeo armonizado de vigilancia epidemiológica activa de la mortalidad de las colonias de abejas melíferas (EPILOBEE 2012-2014). Todo ello ha permitido investigar las principales enfermedades de las abejas europeas, conocer el impacto de los patógenos que las causan, y la magnitud de la mortalidad de las colmenas a gran escala.

Gran parte del conocimiento que actualmente se tiene en la prevalencia de las patologías apícolas en nuestra región, y la influencia que estas tienen sobre la viabilidad de las colmenas de abejas ibéricas, y sobre sus producciones, son el resultado de los más de 20 años de investigación apícola desarrollados en el CIAPA de Marchamalo, que ha dado lugar a la producción de un amplio conocimiento científico sobre la salud de las abejas melíferas y las colmenas de *Apis mellifera iberiensis*.

Tras 13 años desde su descubrimiento en *A. m. iberiensis*, *N. ceranae* se ha revelado como uno de los patógenos más prevalentes a nivel mundial, y el principal objeto de estudio del equipo científico del CIAPA de Marchamalo. La categorización de la nosemosis tipo C, como la enfermedad producida por este agente nosógeno, ha permitido identificar un cuadro clínico característico, asociado a la alteración del polietismo normal de las abejas adultas, caracterizado por pasar desapercibido durante un largo periodo de incubación asintomático para el sector ganadero. El tropismo de *N. ceranae* por las

células del intestino medio de las abejas adultas (ventrículo) provoca daños tisulares, y puede desencadenar modificaciones en el metabolismo de los azúcares y los lípidos (estrés energético), sobre la respuesta celular e inmune del hospedador, e incluso alteraciones en el sistema neuronal, sensitivo y cognitivo de las abejas, y aunque no hay datos, probablemente también en otros polinizadores a los que afecta. Además, la ausencia de un tratamiento quimioterapéutico autorizado para la lucha y control de las nosemosis, ha llevado al mismo equipo de investigación a plantear métodos zootécnicos para el manejo de las colmenas y la aplicación de compuestos naturales como la mejor alternativa a día de hoy para esta ganadería.

Con todo, el alcance y la gravedad de la enfermedad generan ciertas discrepancias, habiendo señalado tanto a la mayor infectividad del patógeno como a la mayor susceptibilidad de ciertos linajes de abejas melíferas, especialmente en climas cálidos y mediterráneos, como determinantes de la enfermedad. En la actualidad, *N. ceranae* parece no tener la misma patogenicidad en todos los *Apidae* y ser igualmente virulento en todas las regiones climáticas.

A pesar del gran progreso en el conocimiento de la patología y de los muchos factores que influyen en la infección por *Nosema* spp., las nosemosis siguen siendo un reto para la comunidad científica que trabaja en la apicultura y la patología de los insectos.

A la luz del conocimiento actual, nos planteamos las siguientes preguntas todavía sin resolver:

1. ¿La parasitación natural de los microsporidios de las abejas son exclusivas de los individuos adultos de la colmena?
2. ¿Qué factores experimentales y/o biológicos determinan el curso y el desarrollo de la infección por *N. ceranae* en *A. m. iberiensis*?
3. ¿Cuáles son los efectos mantenidos de la infección por *N. ceranae* a lo largo de la infección?
4. ¿Qué tejidos de las abejas melíferas son realmente susceptibles de la infección por microsporidios?

La presente memoria de tesis doctoral incluye, en la primera parte, una revisión de la bibliografía actualizada que encuadra los trabajos desarrollados en los cuatro capítulos que la prosiguen. Al final de la memoria se adjuntan los artículos científicos generados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. NOSEMOSIS

2.1. ETIOLOGÍA (p. 9)

- 2.1.1. Morfología de *Nosema* spp. (p. 9)
- 2.1.2. Biología de *Nosema* spp. (p. 13)
- 2.1.3. Especificidad celular de *Nosema* spp. en el intestino medio de *A. mellifera* (p. 17)
- 2.1.4. Respuesta inmunitaria a la infección y factores relacionados (p. 18)

2.2. PATOLOGÍA (p. 23)

- 2.2.1. Efectos en la abeja individual (p. 24)
- 2.2.2. Efectos en la colonia de abejas (p. 28)

2.3. EPIDEMIOLOGÍA (p. 30)

2.4. CONTROL (p. 36)

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinant factors of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

2. NOSEMOSIS

Las nosemosis son un grupo de enfermedades de las abejas causadas por hongos Microsporidios del género *Nosema*. Hasta la fecha, se han descrito tres especies de microsporidios en *A. mellifera*: *Nosema apis* (Zander, 1909) y *Nosema ceranae* (Higes *et al.*, 2007), presentes en los 5 continentes, y *Nosema neumannii* (Chemurot *et al.*, 2017), descrita en Uganda. Debido a su identificación más reciente, actualmente se dispone de poca información acerca de los efectos de la infección por *N. neumannii*, mientras que las otras dos especies de *Nosema* (*N. apis* y *N. ceranae*) producen enfermedades conocidas como nosemosis tipo A y tipo C, respectivamente (COLOSS, 2009; Higes *et al.*, 2010c). Cada especie presenta un cuadro clínico diferente que afecta de una manera desigual a la viabilidad de las colonias de abejas y, según su grado de patogenicidad y frecuencia, tienen consecuencias de diferente gravedad para la viabilidad de las colmenas.

2.1. ETIOLOGÍA

2.1.1. Morfología de *Nosema* spp.

La clasificación taxonómica de los Microsporidios ha sido siempre muy discutida. Recientemente se incluyeron en el reino de los hongos (Adl *et al.*, 2005, 2012; Lee *et al.*, 2010); sin embargo, en los últimos 5 años han sido considerados un linaje verdaderamente diverso de parásitos relacionados con Rozellida (Rozellosporidia, Rozellomycota, Cryptomycota); un pequeño grupo de protistas opistocontos que divergen del reino de los hongos como una rama inferior ((**Figura 2.1.** James *et al.*, 2013; Bass *et al.*, 2018; Galindo *et al.*, 2018). En esta nueva clasificación el género *Nosema* se situaría dentro del clado Holomycota y del súper grupo Opisthokonta.

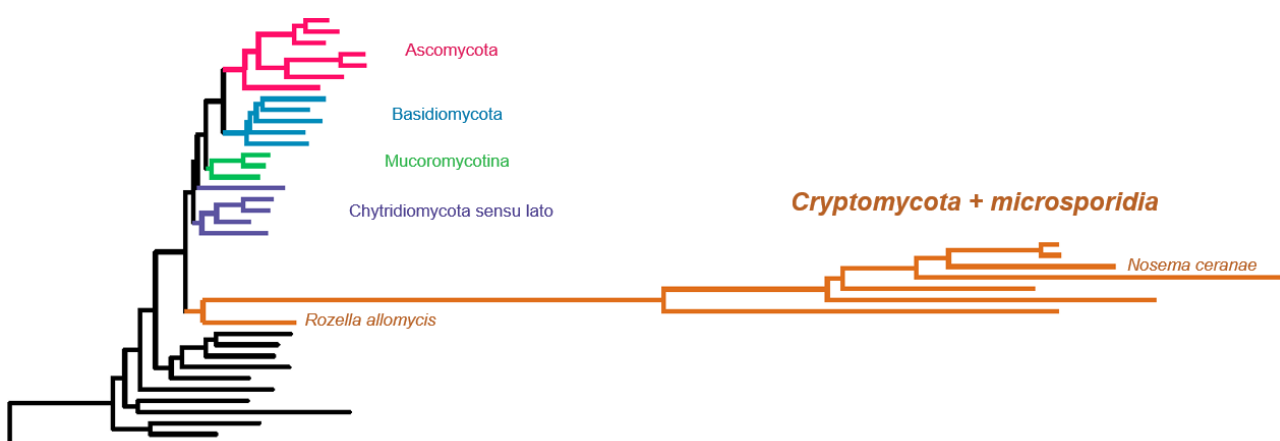


Figura 2.1. Taxonomía de los microsporidios y otros grupos de hongos. Figura: detalle de James *et al.* (2013).

Los Microsporidios son un Phylum de endoparásitos animales, unicelulares y formadores de esporas, que carecen de algunos orgánulos típicos de los eucariotas, tales como el aparato de Golgi, peroxisomas y mitocondrias estrictas; es por ello que necesitan tomar el ATP de su entorno para poder reproducirse rápidamente (Burri *et al.*, 2006; Cornman *et al.*, 2009). Esta característica convierte a los microsporidios en endoparásitos obligados con total dependencia de una célula hospedadora para desarrollar y completar su ciclo biológico (Wittner y Weiss, 1999), por ello se consideran particularmente propensos a causar daños en los tejidos infectados (Weidner *et al.*, 1999). Constituyen un grupo de organismos muy heterogéneo y en constante adaptación a nuevos entornos y hospedadores, contando actualmente con más de 1.500 especies descritas, distribuidas en 187 géneros (Stentiford *et al.*, 2013). Son capaces de infectar una amplia gama de vertebrados e invertebrados (Didier *et al.*, 2004), desde protozoos hasta seres humanos, aunque la mayoría son endoparásitos de invertebrados (Becnel y Andreadis, 1999). Se encuentran con frecuencia infectando órganos internos de hospedadores terrestres y acuáticos, causando en muchos de ellos verdaderas epizootias de consecuencias impredecibles, ya que muchos son cruciales para la estabilidad de la cadena alimentaria (Stentiford *et al.*, 2016). Esta gran diversidad de hospedadores y entornos externos donde existen los Microsporidios puede estar indicando procesos infecciosos específicos del hospedador.

Todos ellos tienen una fase de esporulación dentro de su ciclo biológico que les permite sobrevivir fuera de la célula hospedadora, necesaria para iniciar el proceso posterior de infección. En el momento de la infección, la inyección del contenido genético desde la espora al interior de la célula hospedadora se realiza a través de una estructura llamada filamento polar. Este orgánulo constituye la estructura funcional más significativa de los Microsporidios, y atendiendo a sus características morfológicas (número de vueltas alrededor de la espora) ha sido ampliamente utilizada para la clasificación de las diferentes especies de este grupo. En la última fase de su ciclo biológico producen esporas que son liberadas al medio ambiente (Gilliam y Shimanuki, 1967). Las esporas son, por tanto, las formas de resistencia encargadas de la transmisión de la enfermedad. En insectos económicamente relevantes como el gusano de seda (*Bombyx mori*) y las abejas de la familia *Apinae*, los microsporidios pueden causar enfermedades graves y, como resultado, importantes pérdidas económicas (Stentiford *et al.*, 2016). El género *Nosema* se restringe a la infección de insectos por lo que es considerado un género entomopatogénico (Huang *et al.*, 2005).

Nosema apis es el agente responsable de la nosemosis tipo A y parasita principalmente a la abeja europea (*Apis mellifera*; COLOSS, 2009), mientras que *N. ceranae* es el responsable de la nosemosis tipo C (Higes *et al.*, 2010c) y se describió inicialmente en la abeja asiática (*Apis cerana*; Fries *et al.*, 1996), aunque ambos microorganismos pueden parasitar ambas especies de abejas de la miel (Paxton *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Copley y Jabaji, 2012; Botías *et al.*, 2013a; Charbonneau *et al.*, 2016). Actualmente se encuentran en todos los continentes donde se realiza la apicultura con abejas del género *Apis* (Martín-Hernández *et al.*, 2018; Goblirsch, 2018).+

Nosema apis y *N. ceranae* difieren en la morfología de las esporas (Ptaszyńska *et al.*, 2016), en el tamaño del genoma (Cornman *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Pelin *et al.*, 2015), en la capacidad de adaptación a la temperatura, tanto en términos de producción de esporas (Higes *et al.*, 2010a) como de supervivencia (Higes *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Fries, 2010; Sánchez Collado *et al.*, 2014), y en los efectos que producen sobre el hospedador (COLOSS, 2009; Higes *et al.*, 2010c; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Van der Zee *et al.*, 2014; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Goblirsch, 2018). Los recientes hallazgos de *N. ceranae* en distintas especies del orden Hymenoptera sugieren una mayor distribución de las infecciones por este microsporidio, que parece ser menos específico de hospedador y más capaz de adaptarse a otras especies de familias y órdenes diferentes (Martín-Hernández *et al.*, 2018; Goblirsch, 2018).

Aunque la visualización de las esporas de *Nosema* spp. bajo el microscopio óptico es relativamente sencilla, discernir entre esporas de especies de *Nosema* requiere experiencia y se complica por el hecho de que ambas especies pueden aparecer en infecciones simples o mixtas (Chen *et al.*, 2009; Forsgren y Fries, 2010; Milbrath *et al.*, 2015). Por tanto, la mejor opción para confirmar las especies de *Nosema* es utilizar herramientas moleculares (Martín-Hernández *et al.*, 2018).

Morfología de las esporas		<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>	<i>N. neumannii</i>
Tamaño comparativo entre especies		Medio	Grande	Pequeño
Tamaño (μm)	Largo	3,6 - 5,5 ¹	5 - 7 ²	2,36 \pm 0,14 ⁵
	Ancho	2,3 - 3,0 ¹	3 - 4 ²	1,78 \pm 0,06 ⁵
Vueltas del filamento polar		18 - 23 ³	26 - 36 ⁴	10 - 12 ⁵
Espora ambiental (madura)	Exoespora	electrodensa	electrodensa	electrodensa
	Endospora	quitinosa y electrolúcida	quitinosa y electrolúcida	refrigente

Tabla 2.1. Características morfológicas de la espora de *Nosema* spp. en *A. mellifera*. El tamaño relativo entre especies hace referencia a sus dimensiones mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). La comparación entre especies facilita el diagnóstico en muestras de infecciones mixtas. Fuentes: (1): Fries *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009; (2): Chen *et al.*, 2013; (3): Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; (4): Fries, 1989; (5): Chemurot *et al.*, 2017.

Mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) es posible distinguir ambas especies fácilmente en función de las características morfológicas de la espora, y del número de vueltas de su filamento polar (**Tabla 2.1**). Las esporas maduras de las especies de *Nosema* constan de dos membranas: la más externa (exoespora) está formada por proteínas que no permiten el paso de la luz, mientras que la capa interna (endoespora) se compone de quitina y permite el paso de la luz. Ambas capas le confieren a

la espora una gran resistencia fuera del hospedador frente a condiciones climáticas adversas (**Figura 2.2**). En la parte anterior de la espora, se distinguen dos estructuras fundamentales para la infección; el disco de anclaje, donde comienza el tubo polar (más corto en *N. ceranae*), y el diplocarion o núcleo doble. En la parte posterior de las esporas se aprecia una vacuola con material floccular (no patógeno). Y finalmente, el material que envuelve ambas partes se denomina esporoplasma, y es considerado el material infectante.

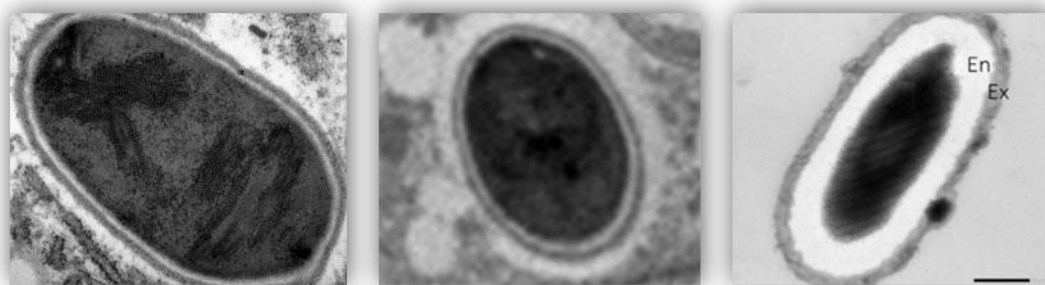


Figura 2.2. Esporas de *Nosema* spp. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de una espora de *N. ceranae* (Izquierda), *N. apis* (centro) y *N. neumannii* (derecha). Fuente: Imágenes extraídas de Higes *et al* (2006); original del CIAPA; y Chemurot *et al* (2017), respectivamente de izquierda a derecha.

La variabilidad genética de las poblaciones de *N. apis* y *N. ceranae* han sido estudiadas en relación a la distribución geográfica del hospedador *A. mellifera* y sus diferentes linajes, con el fin de identificar la especie presente y las diferencias en la patología y la prevalencia de ambas enfermedades (Maside *et al.*, 2015; Gómez-Moracho *et al.*, 2014; 2015).

Se han detectado múltiples haplotipos en aislados de *N. ceranae* de abejas individuales y de diferentes regiones geográficas (Williams *et al.*, 2008a; Gómez-Moracho *et al.*, 2014; Sagastume *et al.*, 2016), lo que inicialmente hizo sospechar de una mayor virulencia de los aislados de esporas de unas regiones geográficas a otras (Paxton *et al.*, 2010). Sin embargo, esta hipótesis no ha sido confirmada (Dussaubat *et al.*, 2013b). El alto grado de variabilidad genética, junto con el desequilibrio de ligamiento (frecuencia de recombinación menor del 50%), la diversidad genética, y la gran dificultad para elaborar filogenias moleculares, sugieren la existencia de recombinación, y por tanto, de la posibilidad de alguna etapa diploide en el ciclo celular de los microsporidios del género *Nosema*, o lo que es lo mismo, un proceso sexual oculto de este microsporidio (Sagastume *et al.*, 2011, 2016). Si llegara a confirmarse, supondría una ventaja evolutiva para los mismos (Sagastume *et al.*, 2016). En consecuencia, la detección diferencial de los genes que codifican para el ADN ribosomal (rDNA), que son genes altamente

conservados dentro de una especie pero que varían de una especie a otra, en este caso no son aconsejables para estudios filogenéticos y experimentos de cuantificación de la carga parasitaria con *Nosema* spp., sin un estudio previo de su variabilidad intraespecífica (Malone y Gatehouse, 1998; Chen *et al.*, 2009; Forsgren y Fries, 2010; Sagastume *et al.*, 2011, 2014, 2016; Hatjina *et al.*, 2011; Gómez-Moracho *et al.*, 2014, 2015; Krebes *et al.*, 2014).

La disponibilidad de genomas totalmente secuenciados para *N. apis* (Chen *et al.*, 2013) y *N. ceranae* (Cornman *et al.*, 2009), junto con la secuenciación de los productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés), son herramientas muy útiles para aspectos relacionados con la identificación y los haplotipos dentro de las poblaciones de las especies (Sagastume *et al.*, 2016; Martín-Hernández *et al.*, 2018 y Goblirsh *et al.*, 2018).

2.1.2. Biología de *Nosema* spp.

Todo parece señalar a la trofalaxia como la principal vía de transmisión de las esporas de *Nosema* spp. entre miembros de la misma colonia (Smith, 2012). Su ocurrencia y éxito dependen de factores biológicos inherentes a las mismas abejas melíferas que participan en el intercambio de alimento, tales como el sexo y la edad de las consumidoras y donantes, la disponibilidad y calidad de alimento, la hora del día, el clima y la estación del año (Crailsheim, 1998; De Marco, 2003).

Fieles a su género, *Nosema* spp. son parásitos que forma esporas ovales refrigentes (**Figura 2.2**) relativamente resistentes a las condiciones ambientales, son binucleados (diplocarióticos) durante todo su ciclo biológico y se desarrollan en contacto directo con el citoplasma del hospedador, en el interior de las células del ventrículo (aparato digestivo) de la abeja. Se transmiten de unas abejas a otras de forma horizontal (por contacto), y principalmente por la vía fecal-oral (Smith, 2012). No obstante, se han sugerido otras vías de transmisión que se revisarán más adelante.

La infección de las abejas melíferas por *Nosema* spp. es muy similar para las dos especies descritas del género, y comienza cuando las abejas adultas ingieren esporas viables en la alimentación (Bailey y Ball, 1991; Webster, 1993; Higes *et al.*, 2018c), a través del intercambio de alimento o trofalaxia (Webster, 1993), mientras realizan tareas de limpieza de la colmena (Fries, 1989; Webster, 1993), o a través del agua (L'Arrivée, 1963).

A partir de su ingestión se diferencian tres fases principales en su ciclo reproductivo: 1) la fase de germinación de las esporas, con la extrusión del filamento polar y la transferencia del esporoplasma a una célula hospedadora; 2) la fase de merogonia (etapa proliferativa), que consiste en la fisión binaria repetida de células parasitarias; y 3) la fase de esporogonia, que da lugar a nuevas esporas que pueden infectar la misma célula o células adyacentes (esporas primarias), o bien pueden ser liberadas a la luz del ventrículo (esporas ambientales) en el aparato digestivo.

La fase de germinación de una espora (**Figura 2.3**) comienza poco después de entrar en el tracto digestivo de la abeja (Fries, 1988; Higes *et al.*, 2007; Smith, 2012), cuando llega al lumen del ventrículo y, respondiendo a señales aún desconocidas, germina (Bailey, 1955; Higes *et al.*, 2007; Huang y Solter, 2013). Todavía no se conocen con exactitud las señales que estimulan la germinación de *Nosema* spp., las cuales varían considerablemente entre los diferentes microsporidios y, en algunos casos, han mostrado una evolución común con sus hospedadores respondiendo a señales de germinación especie-específicas (Smith, 2012). En los microsporidios de abejas, existen indicios de que el desplazamiento del calcio intracelular y posterior anclaje calcio/calmodulina en la superficie de las esporas podría comenzar una cascada de señales que contribuirían al proceso de hinchamiento y turgencia de la espora latente, o polaroplasto (Weidner y Byrd, 1982). La presión osmótica hace que estas esporas inicien una rápida extrusión del filamento polar largo, que permanece unido a la espora a través del disco de anclaje (Xu y Weiss, 2005). El filamento polar extruido de la espora germinada penetra en una célula hospedadora, facilitando un conducto hueco para la transferencia del esporoplasma binucleado a su interior (Texier *et al.*, 2010; Gisder *et al.*, 2011). Como ya se ha mencionado, este orgánulo de invasión es único en Microsporidia.

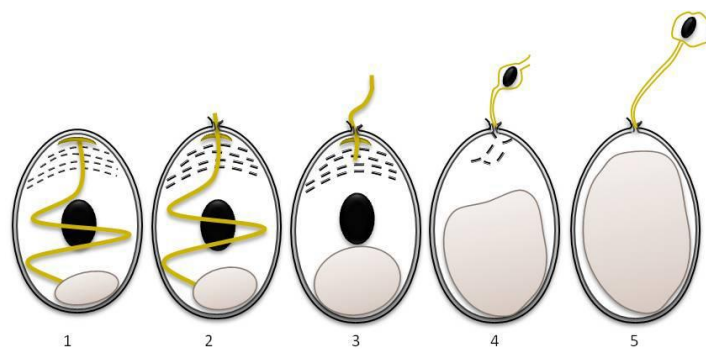


Figura 2.3. Germinación de la espora de un microsporidio. La germinación tiene lugar debido a un aumento en la presión osmótica en el interior de la espora (Kudo, 1918; Xu y Weiss, 2005), que conduce a la entrada de agua en su interior y termina con la extrusión del filamento polar. En la espora latente (1) el polaroplasto y la vacuola posterior se hinchan rompiendo la parte anterior (2), por donde se libera el filamento polar (3) (Williams, 2009). Este forma un canal a través del cual el esporoplasma es forzado a salir (4). Tras su emergencia, el esporoplasma queda rodeado por una nueva membrana (5). Si la germinación tiene lugar en la proximidad de la célula hospedadora, el filamento polar se ancla a ella y actúa como puente a través del cual transfiere el esporoplasma a su interior (Xu y Weiss, 2005). Imagen original de Gómez-Moracho (2015), modificada a partir de Keeling y Fast (2002), con permiso de utilización.

La fase de merogonia comienza tras la inyección del esporoplasma en la célula hospedadora, aproximadamente a las 8-24 horas tras la infección (Rodríguez García, 2017). El esporoplasma crece en tamaño y madura para convertirse en la fase vegetativa o meronte, que queda rodeado por una nueva membrana y presenta una gran región nuclear y orgánulos muy poco desarrollados (Wittner y Weiss,

1999). La merogonia prolifera a través de un número variable de divisiones binarias de los merontes binucleados, lo que implica un incremento exponencial del número de parásitos intracelulares (**Figuras 2.4**). En *N. apis* y *N. ceranae* esta proliferación en ocasiones produce estructuras celulares multinucleadas (plasmidios), con hasta cuatro pares de núcleos (Gray *et al.*, 1969; Higes *et al.*, 2007). Se han observado numerosas mitocondrias y ribosomas libres alrededor del plasmalema de los merontes de *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2007). Los merontes de *N. apis* y *N. ceranae* carecen de vacuola parasitaria típica de otros microsporidios como estrategia para una mayor captación de ATP desde la célula hospedadora (Hacker *et al.*, 2014). En cambio tienen una sola membrana plasmática delgada que permanece en contacto directo con el citoplasma de la célula infectada y podría presentar transportadores de nucleótidos incrustados para obtener un suministro continuo de ATP del hospedador (Tsaousis *et al.*, 2008).

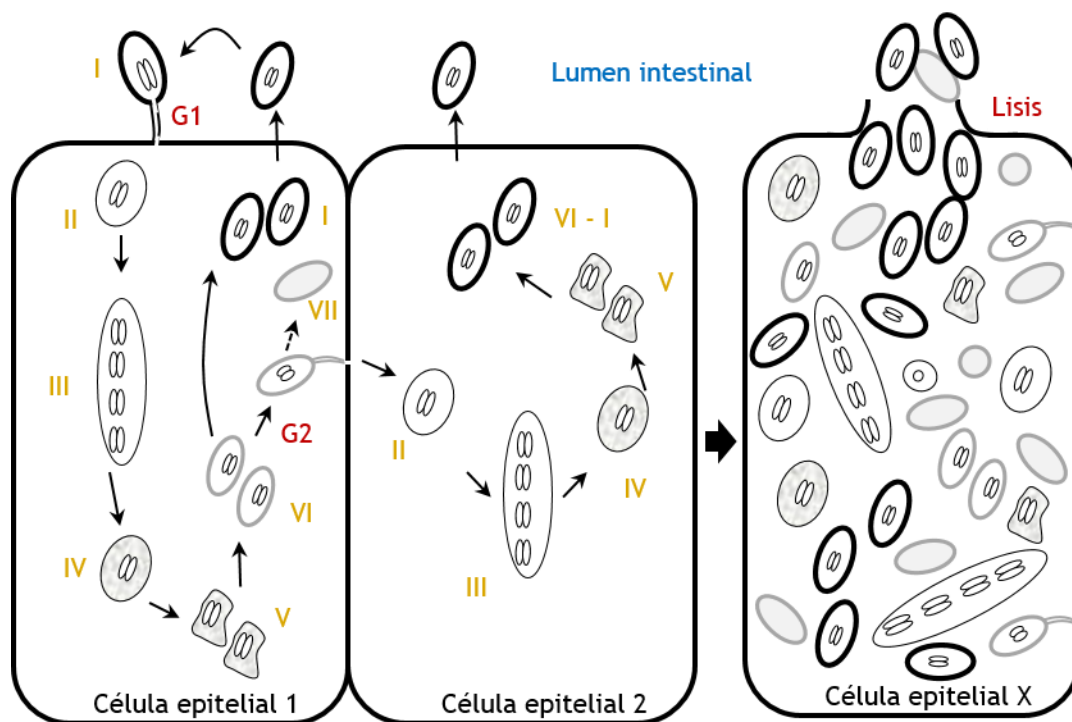


Figura 2.4. Esquema del ciclo biológico de *Nosema* spp. Tras la germinación de las esporas en el lumen del intestino medio (G1), y en contacto con las células ventriculares (Célula epitelial 1), se pueden distinguir dos etapas intracelulares: 1) merogonia (I-III), en la que se produce la división exponencial del parásito, y 2) la esporogonia (IV-IV), con la generación de esporas primarias infectivas. Los estadios celulares corresponden a: meronte (II), plasmidios multinucleados (III), esporonte (IV), esporoblastos (V), y esporas, que en ocasiones se diferencian en esporas primarias (VI) o en esporas maduras (I). G2: Germinación intracelular de una espora primaria que puede inyectar el esporoplasma en la célula adyacente (Célula epitelial 2) o en la misma célula reinfectándola, quedando la espora vacía (VII). Célula epitelial X: eventualmente una célula infectada se lisa y las esporas maduras son liberadas a la luz del intestino, desde donde pueden infectar nuevas células epiteliales o ser expulsadas con las heces. Fuente: modificada de Gómez-Moracho (2015), con permiso de utilización y modificación.

A continuación se desarrolla la esporogonia (**Figuras 2.4**). Los merontes maduran a esporontes caracterizados por el engrosamiento del plasmalema, las deposiciones de material electrodensito que formarán la futura exospora y un aumento del retículo endoplasmico y los ribosomas. Inmediatamente después, vuelven a dividirse por fisión binaria, una sola vez, para formar dos esporoblastos, y a partir de ellos se forma una primera generación de esporas primarias binucleadas (Bigliardi y Sacchi, 2001). En esta fase se forman el túbulo polar y la endospora, que se va constituyendo por la acumulación de quitina entre el plasmalema y la exospora (Bigliardi y Sacchi, 2001), alcanzándose tan solo entre las 36-96 horas después de la infección (Fries, 1988; De Graaf *et al.*, 1994; Higes *et al.*, 2007; García-Palencia *et al.*, 2010b; Rodríguez García, 2017).

En las infecciones por *N. ceranae*, como en las de su homóloga *N. apis* (Fries *et al.*, 1992), es posible observar dentro de una misma célula diferentes estadios parasitarios (**Figuras 2.4**), incluyendo esporas tanto maduras como vacías o germinadas, lo que sugiere que ambas especies son capaces de germinar intracelularmente y transmitirse a las células adyacentes (Higes *et al.*, 2007; Gisder *et al.*, 2011).

Esta germinación intracelular es llevada a cabo por las esporas primarias (primera generación de esporas), que se caracterizan por presentar una endospora fina y un filamento polar corto. Nuevamente, a partir del esporoplasma inyectado en la célula adyacente (o liberado en el citoplasma de la misma célula hospedadora), se obtiene una segunda generación de merontes que, tras múltiples divisiones, da lugar a una segunda secuencia de esporulación. De este modo, los esporontes diplocarióticos resultantes se dividen para dar lugar a dos esporoblastos, que evolucionarán para convertirse en esporas secundarias o ambientales (Gisder *et al.*, 2011). En este caso, la endospora es mucho más gruesa que la de la espora primaria y el filamento polar mucho más largo (**Figuras 2.4**). El grosor de la pared de las esporas y la longitud de su filamento polar son, por tanto, las mayores diferencias en el desarrollo y morfología entre la espora primaria y la espora ambiental (Becnel y Andreadis, 1999). Es probable, además, que las esporas primarias y ambientales requieran de condiciones diferentes para activarse y completar su germinación (Goblirsch, 2018).

En última instancia, una célula infectada se llena de parásitos, lo que conduce a su ruptura y a la liberación de las esporas secundarias (ambientales) a luz del tubo digestivo, finalizando así el ciclo reproductivo de la fase intracelular (Gisder *et al.*, 2011; Huang y Solter, 2013; Rodríguez García, 2017). Estas esporas ambientales pueden acumularse en el recto hasta ser expulsadas con las heces (Lotmar, 1944). La presencia de esporas vacías dentro de las células epiteliales indica que el patógeno completa su ciclo reproductivo dentro del hospedador (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2009b, 2010b). En un tiempo medio de 2 semanas, la infección se habrá extendido por todo el epitelio (Rodríguez García, 2017), comenzando desde la parte posterior y extendiéndose hacia la parte anterior del ventrículo (Fries, 1988, Higes *et al.*, 2007).

2.1.3. Especificidad celular de *Nosema* spp. en el intestino medio de *A. mellifera*

Las primeras descripciones de las fases intracelulares del ciclo biológico de *N. ceranae* incluían las esporas y los estadios inmaduros en el interior de las células epiteliales del ventrículo (intestino medio) en *A. cerana* (Fries *et al.*, 1996), y posteriormente en *A. m. iberiensis* (Higes *et al.*, 2007; García-Palencia *et al.*, 2010b). Dado que no se encontraron esporas en el epitelio de los túbulos de Malpighi, el intestino delgado, o el recto, la infección se consideró como específica del tejido, en similitud con la de *N. apis* (Fries, 1988).

Las células dañadas en contacto directo con el lumen del intestino son reemplazadas por las células regenerativas (en la parte basal del tejido). Sin embargo, no se observó un índice mitótico más alto en dichas células, que sería normal en casos de destrucción tisular, lo que supone que tras la infección hay una baja capacidad regenerativa epitelial pudiendo perjudicar la función digestiva de este órgano diana (Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al.*, 2018). La última etapa de liberación de esporas implica la ruptura de las células epiteliales y el daño evidente del ventrículo por la baja regeneración celular, mientras que el tejido muscular circundante permanece sin alteraciones ni inflamación (Higes *et al.*, 2007; García-Palencia *et al.*, 2010b).

Utilizando técnicas moleculares (PCR), *N. apis* y *N. ceranae* han sido detectados en las glándulas hipofaríngeas y salivales, en el cuerpo graso y en los túbulos de Malpighi, pero no en el cerebro o en el músculo de diferentes subespecies de abejas melíferas (Chen *et al.*, 2009; Gisder *et al.*, 2010; Copley *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013). A pesar de ello, la infección de estos órganos no se ha confirmado por técnicas histopatológicas (Higes *et al.*, 2007). Aunque un amplio rango de órganos, diferentes al ventrículo medio, se han sugerido como órganos diana del patógeno (Chen *et al.*, 2009; Gisder *et al.*, 2010; Copley *et al.*, 2012), esta hipótesis todavía no se ha confirmado.

También se ha descrito la presencia de esporas de *N. apis* en la hemolinfa de larvas de abejas (Gilliam y Shimanuki, 1967), y esporas ambientales de *N. apis* y *N. ceranae* en el aparato bucal de abejas obreras y en el semen de los zánganos, señalando posibles mecanismos de transmisión horizontal mediante la trofalaxia (Smith, 2012; Huang *et al.*, 2013), y vertical mediante contacto sexual (Peng *et al.*, 2015; Roberts y Hughes, 2015), respectivamente.

Dado que el tejido diana se encuentra plenamente desarrollado en abejas adultas (Human *et al.*, 2013), las nosemosis son enfermedades tradicionalmente consideradas de abejas maduras; sin embargo la detección de esporas viables en la cera de las celdillas (MacInnis, 2017), y del ADN del microsporidio en la jalea real (Cox-Foster *et al.*, 2007; Traver y Fell, 2012), han generado la hipótesis de la exposición de los estadios inmaduros a los microsporidios a través de su alimentación (Traver y Fell, 2012; Goblirsch, 2018). Aunque un estudio antiguo no tuvo éxito en la infección de larvas con *N. apis* (Hassanein, 1953), estudios más recientes de infecciones experimentales con esporas de *N. ceranae* han demostrado el desarrollo de las mismas infectando el intestino medio de pupas alimentadas previamente

durante su estadio larval (Eiri *et al.*, 2015) demostrando, además, que la infección en el estadio larvario puede producir una serie de repercusiones patológicas en los adultos resultantes, acortando su vida, retrasando el polietismo de edad normal (determinadas tareas atribuidas a una edad específica de la abeja) y, consecuentemente, alterando el equilibrio de la colmena (Eiri *et al.*, 2015; Benvau y Nieh, 2017). La naturaleza de la infección de la cría es de interés veterinario, y requiere determinar si la infección de los estudios inmaduros de las abejas (huevo, larva y pupa) se producen bajo condiciones naturales de campo, así como el análisis de su efecto en la epidemiología de la enfermedad y en la evolución de las colonias melíferas.

Por lo tanto, la observación de la infección en tejidos diferentes al intestino medio (estrictamente formado en abejas adultas emergidas; Human *et al.*, 2013), así como en estadios inmaduros de forma natural, siguen siendo lagunas de conocimiento acerca del desarrollo y curso de la nosemosis tipo C, con un cuadro clínico diferente y de mayor virulencia que el producido por la nosemosis tipo A (COLOSS, 2009; Higes *et al.*, 2010c; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Goblirsch, 2018).

2.1.4. Respuesta inmunitaria a la infección y factores relacionados

Los conocimientos sobre la inmunidad innata de las abejas melíferas reflejan la necesidad de abordar su estudio y comprensión básica en relación a las múltiples alteraciones inherentes al desarrollo biológico de las mismas, y a su interacción con el medio ambiente (Buchon *et al.*, 2014; Hillyer, 2016). La edad de un individuo (abeja) influye en la respuesta inmune a los patógenos. Se sabe que las abejas más jóvenes tienen una mayor cantidad de hemolinfa y hemocitos, mientras que las abejas maduras tienen mayores niveles de profenoloxidasa (PPO; Schmid *et al.*, 2008).

Además, la dinámica de la actividad de la PPO es específica del sexo y la casta (Schmid *et al.*, 2008). Entre las vías de señalización inmunológica se encuentran las vías Toll, Imd, Jak/Stat, JNK e insulina. La activación de estas, y otras vías, conduce a la eliminación de patógenos mediante fagocitosis, melanización, encapsulación celular, nodulación, lisis, destrucción de virus mediada por el RNAi, autofagia y apoptosis (**Figura 2.5**). La respuesta humoral, mediada por péptidos antimicrobianos, está íntimamente relacionada con la respuesta celular, llevada a cabo por las células inmunes o hemocitos, que los liberan (**Figura 2.5**). Los tipos celulares de la respuesta inmune varían entre insectos, y hasta la fecha no se conoce con detalle la hematopoyesis en abejas melíferas debido, fundamentalmente, a la dificultad para obtener muestras de hemolinfa y hemocitos íntegros y en cantidades suficientes para su estudio (Borsuk *et al.*, 2017; y observaciones personales de la autora).

La complejidad de las respuestas a agentes bióticos y abióticos, actuando individualmente o, como es más realista, conjuntamente e interaccionando entre ellos, dificulta la comprensión, interpretación y comparación de los resultados en la literatura científica. Los mecanismos de defensa

anti-microsporidios están mediados por los receptores de reconocimiento del patrón a patógenos (**Figura 2.5**), la transducción de señales y cascadas y la síntesis de péptidos antimicrobianos y de especies reactivas de oxígeno (Evans, 2006; Martín-Hernández *et al.*, 2018; y Goblirsch, 2018). Los mecanismos de defensa antiviral incluyen la interferencia del ARN (ARNi), los receptores de reconocimiento del patrón a patógenos, la transducción de señales y cascadas, y la generación de especies reactivas de oxígeno (Brutscher y Flenniken, 2015). El efecto de los plaguicidas en la inmunidad de los insectos ha demostrado tener consecuencias (según el mecanismo de acción de las materias activas) sobre la diferenciación de hemocitos (y la fagocitosis), la cascada de profenoloxidasas (melanización), el aumento del estrés oxidativo y la producción de péptidos antimicrobianos (James y Xu, 2012).

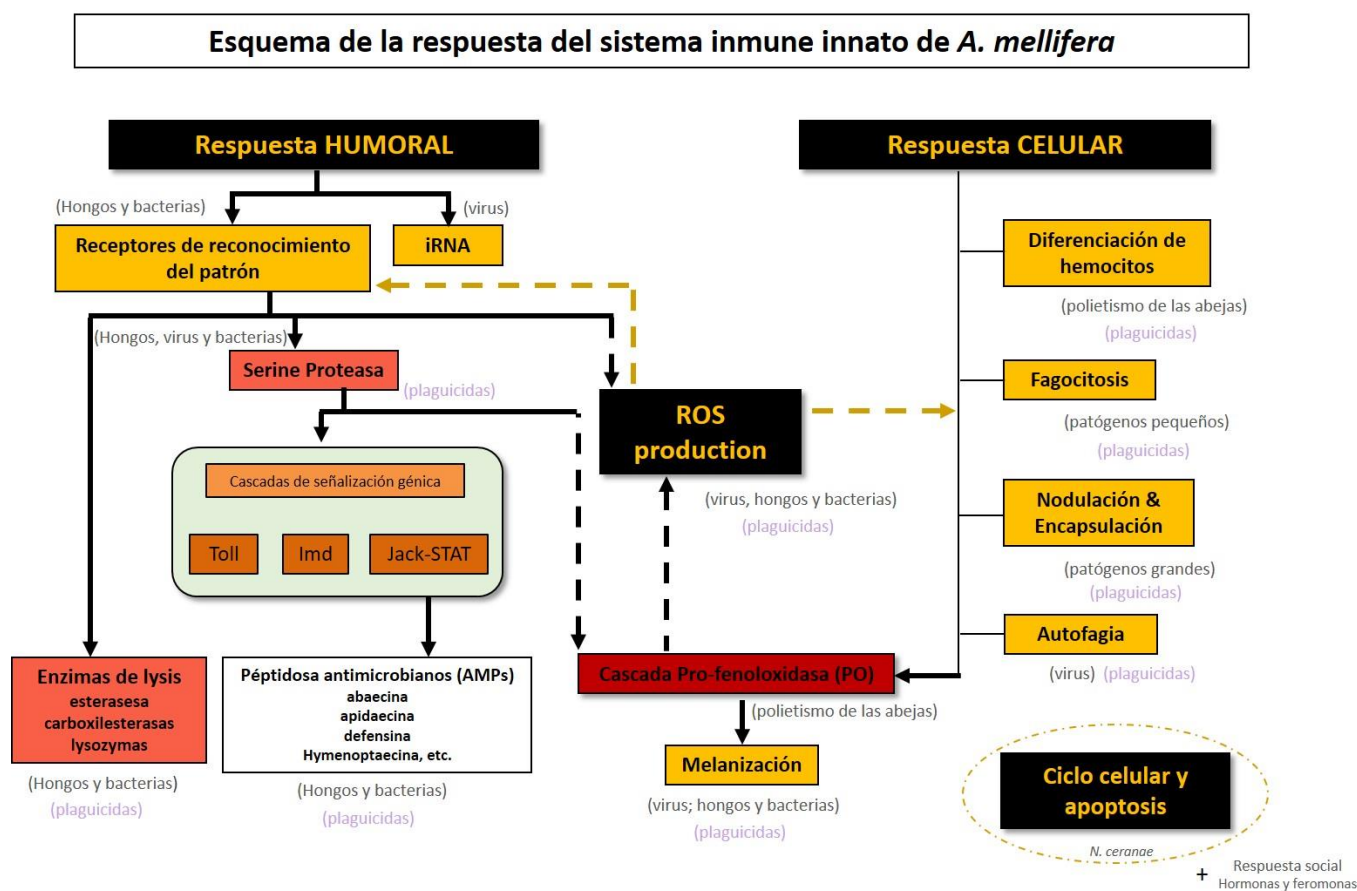


Figura 2.5. Esquema de la respuesta del sistema inmune innato de *A. mellifera*.

Fuente: original, basado en James y Xu (2012) y ampliado con Martín-Hernández *et al.*, 2017 y con las revisiones de: Evans, 2006; Buchon *et al.*, 2014; Schwarz *et al.*, 2015; Brutscher y Flenniken, 2015; Engle *et al.*, 2016; Hillier, 2016; Goblirsch, 2018 y Martín-Hernández *et al.*, 2018.

A su vez, otros estudios recientes han concluido que algunos factores biológicos como la edad de la abeja y su dieta, determinan las características del ecosistema microbiano en el lumen del intestino medio de las abejas (Powell *et al.*, 2014; Engel *et al.*, 2015; Anderson *et al.*, 2016), donde germinan las esporas de los microsporidios. Éste alberga una microbiota co-evolucionada y muy específica de cada edad y tarea asociada (Jones *et al.*, 2018b), y muy implicada en la función inmunitaria y en la nutrición de las abejas. Una miríada de patógenos (patósfera) infecta a las abejas y constituye una red genómica adicional que desafía a las abejas en todo momento y en una multitud de combinaciones. Para recoger esta perspectiva más amplia, la teoría del hologenoma sostiene que tanto el genoma del hospedador como el de la microbiota asociada se adaptan y evolucionan juntos como una unidad de selección en respuesta a los patógenos y otros factores ambientales, determinando tanto el fenotipo como el bienestar general de las abejas. Esto induce a pensar que la microbiota de las abejas sea un factor crucial que afecte a la salud del hospedador (Engel *et al.*, 2015). Por tanto, la salud de las abejas melíferas debería ser considerada bajo un concepto holístico que incluya el genoma de la abeja en el contexto de los genomas de sus simbioses microbianos beneficiosos (la microbiota).

Investigaciones recientes han proporcionado una visión holística a nivel del genoma de la diversidad de las poblaciones mundiales de abejas melíferas y de la microbiota intestinal que reside en ellas en cada momento de su desarrollo cronológico, así como de la creciente patosfera a la que se enfrentan las abejas (Schwarz *et al.*, 2015; Engel *et al.*, 2016). Las diferentes combinaciones de complejos genómicos abeja/microbiota/patosfera pueden explicar la variación regional en la productividad y mortalidad en la apicultura. El enfoque del paradigma hologenómico explica que la respuesta de las abejas melíferas está determinada por los genomas compuestos de la abeja y la microbiota (por ejemplo intestinal) y propone que solo considerando la totalidad se podrían interpretar y tratar los impactos de la patosfera, los pesticidas, las toxinas, la nutrición, el clima y otros factores estresantes que afectan a la salud de las abejas (Schwarz *et al.*, 2015; Engel *et al.*, 2016).

La diversidad ambiental a la que están expuestas las abejas se ha asociado con la abundancia relativa de algunas bacterias de esta comunidad microbiana intestinal (Jones *et al.*, 2018a), que pueden perturbar o promover el ciclo biológico de los microsporidios (Maes *et al.*, 2016; Anderson y Ricigliano, 2017; Regan *et al.*, 2018), e incluso la intensidad de la infección (Rubanov *et al.*, 2019). Además, hay nuevas pruebas que demuestran que la destrucción de las bacterias intestinales mediante un tratamiento antibiótico (por ejemplo para el control de *Paenibacillus larvae*), aumenta la vulnerabilidad de las abejas a la infección por *Nosema* spp. (Li *et al.*, 2017a). En un estudio de campo, la abundancia y diversidad de la microbiota intestinal de abejas naturalmente infectadas por *Nosema* spp. se vio alterada directamente por dicha infección (Ptaszyńska *et al.*, 2016). Estos hechos demuestran la importancia de la comunidad bacteriana en la infección por microsporidios. Esta alteración de la homeostasis intestinal junto con una baja renovación del epitelio intestinal promovida por *N. ceranae*, han sido relacionadas con la menor longevidad de abejas infectadas por microsporidios, así como con un aumento en la

susceptibilidad de las abejas a *N. ceranae* debido a una disminución de la capacidad de las abejas para reparar el daño epitelial del ventrículo (Panek *et al.*, 2018).

Pero no solo el estado inmunitario y la microbiota afectan a la evolución de la infección por *Nosema* spp. Dado que cada fase de desarrollo de las abejas obreras está asociada a una determinada alimentación, el acceso a una nutrición variada y de calidad también influyen en el comportamiento normal de las abejas (Nilsen *et al.*, 2011), así como en la respuesta de cada abeja a la infección por microsporidios (Di Prisco *et al.*, 2013; Tritschler *et al.*, 2017). Asimismo, el polietismo temporal de las abejas y las naturales variaciones en su comportamiento, como la trofalaxia o la limpieza de la colmena, dependen de la edad de las mismas, y se rigen por modificaciones endocrinas e inmunitarias inherentes a la edad y envejecimiento de las mismas (**Figura 2.5**). Por ello, tanto la edad como la nutrición son factores biológicos que también influyen en el éxito de la infección del tejido ventricular de las abejas contaminadas.

Cabe destacar que, de manera general, la edad de un insecto también afecta a la respuesta inmunitaria a las infecciones (Hillyer, 2016; **Figura 2.5**). En insectos adultos, la observación general es de inmunosenescencia, donde la respuesta inmune disminuye con la edad. A menudo, la senescencia se refiere a una disminución en la potencia de una respuesta inmunitaria (ya sea celular -encapsulación, nodulación o melanización- o humoral - síntesis de péptidos antimicrobianos y respuesta oxidativa-), y a menudo resulta en un aumento de la intensidad de la infección en los insectos más envejecidos. Esto puede ir acompañado de un aumento (Roberts y Hughes, 2014) o una disminución (Hillyer *et al.*, 2004) de la supervivencia, por lo que la relación entre inmunidad, tolerancia y envejecimiento es compleja (Hillyer, 2016). Por otra parte, no está claro que la respuesta humoral innata de las abejas melíferas en respuesta a patógenos invasores (**Figura 2.5**), mediante la activación y la síntesis rápida y masiva de péptidos antimicrobianos (AMPs: abaecina, apidaecina, defensina, hymenoptaecina, etc.), y a través de las cascadas de señalización química (Toll e Imd) sea específica del patógeno (Lourenço *et al.*, 2013). De cualquier manera, aunque estas respuestas sean generalizadas ante la invasión de cualquier patógeno, las infecciones por *Nosema* spp. han demostrado producir alteraciones significativas en todas ellas, tanto a nivel de la expresión génica, como transcriptómico y proteómico.

Tras la infección por *N. ceranae* en la abeja individual (ver apartado 2.2.1) se han observado alteraciones en las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos, en la expresión génica de los péptidos antimicrobianos y en especies reactivas de oxígeno (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012; Badaoui *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017b). En su conjunto, estas alteraciones sugieren que la infección por el microsporidio suprime los mecanismos de defensa inmunitaria en las abejas melíferas. Por otro lado, no parece que haya un mecanismo único por el que lo hace, si no que hay más de uno y que además es un proceso dinámico en el tiempo (Schwarz y Evans, 2013; Li *et al.*, 2018), ya que queda sujeto a la edad del hospedador (Alaux *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013), a la casta o el sexo (Schmid *et al.*,

2008; Anderson *et al.*, 2018), así como a la calidad y diversidad de los alimentos (Porrini *et al.*, 2011a; Di Pasquale *et al.*, 2013; Basualdo *et al.*, 2014; Jack *et al.*, 2016a; Tritschler *et al.*, 2017) y también, a la microbiota intestinal asociada (Jones *et al.*, 2018b).

En cuanto a otras moléculas relacionadas con la respuesta inmunitaria de las abejas melíferas caben destacar la hormona vitelogenina (Vg), la hormona juvenil (JH) y la feromona etil oleato (EO), con funciones fisiológicas importantes tanto en la cría de abeja (larvas y pupas), en las abejas obreras, y en la abeja reina. Estas hormonas juegan un papel fundamental en el sistema inmune innato (**Figura 2.5**) y social (**Figura 2.6**) de las abejas melíferas, pero también en el polietismo temporal, y por tanto sobre la homeóstasis de la misma. Las concentraciones de estas hormonas (Vg y JH) se modifican en las abejas infectadas por *N. ceranae*, por lo que tienden a madurar precozmente (Antúñez *et al.*, 2009, 2013; Benvau y Nieh, 2017; Li *et al.*, 2019). También se ha observado que la feromona EO aumenta en abejas infectadas, retrasando la maduración de sus compañeras de nido (abejas nodrizas) sin infectar (Dussaubat *et al.*, 2010; Alaux *et al.*, 2014). Todos estos cambios hormonales de las abejas individuales llevan al desequilibrio del super-organismo, en el número de abejas de diferentes edades presentes en la colonia al mismo tiempo (ver más adelante).

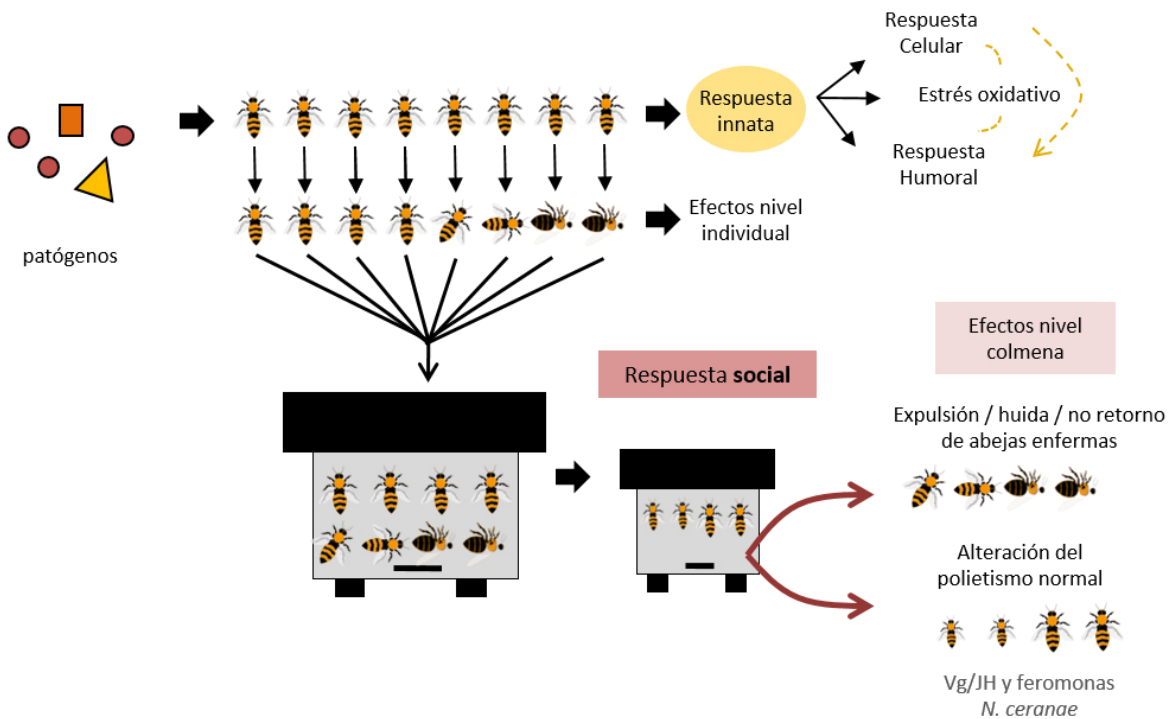


Figura 2.6. Esquema de la respuesta eusocial de las colmenas de *A. mellifera*. La inmunidad social resulta en la prevención, el control o la eliminación de las infecciones transmisibles en el súper-organismo. Fuente: original.

Las abejas melíferas son altamente sensibles a los agentes estresantes comparándolas con otros insectos, esto es debido a que tienen una notable deficiencia en el número de genes que codifican enzimas relacionadas con la inmunidad innata (**Figura 2.5**) y la detoxificación (Claudianos *et al.*, 2006; Cremer *et al.*, 2007). En posible compensación, se ha descrito la acción colectiva o los comportamientos altruistas de las abejas que resultan en la prevención, el control o la eliminación de las infecciones parasitarias (Cremer *et al.*, 2007), y que se denomina inmunidad social (Hillyer, 2016. **Figura 2.6**).

La interacción regulatoria entre hormonas (vitelogenina y hormona juvenil, entre otras) proporciona una explicación de cómo las abejas melíferas eusociales expresan la secuencia de comportamientos homólogos a los cuidados reproductivos. Ciertos patógenos pueden alterar el polietismo normal de las abejas incidiendo directamente sobre la inmunidad social (**Figura 2.6**). Se ha observado repetidamente que en abejas infectadas por *N. ceranae* se altera el polietismo temporal: se desencadena una actividad de búsqueda prematura de alimento y un acortamiento de la vida de las abejas obreras infectadas (p. ej.: Ares *et al.*, 2012; Dussaubat *et al.*, 2013a; Goblirsch *et al.*, 2013). De hecho, la infección por *N. ceranae* acelera el desarrollo del comportamiento de las abejas melíferas (Higes *et al.*, 2008a; Bordier *et al.*, 2017), como se detallará más adelante (apartado 2.2.2).

2.2. PATOLOGÍA

Tanto la nosemosis tipo A como la tipo C han demostrado ser extremadamente dañinas para las colonias de abejas melíferas (COLOSS, 2009). Si bien, la patogenia de las nosemosis es el punto más controvertido de ambas enfermedades. Se han publicado trabajos aparentemente contradictorios, que se irán revisando a continuación.

Las manifestaciones más evidentes de la nosemosis tipo A son la inusual presencia de heces y abejas muertas alrededor de las colmenas infectadas, el aumento de tamaño del abdomen de los insectos afectados y su estacionalidad, con picos de infección en primavera y otoño (Fries, 1993). Por el contrario, la nosemosis tipo C se considera asintomática (colmenas sin manifestaciones evidentes), al menos, durante un largo periodo inicial de incubación de la infección, que junto al desequilibrio del polietismo que provoca en las abejas, acelerando el inicio de la pecorea a edades tempranas, han favorecido su relación con el declive de las colmenas de abejas (Higes *et al.*, 2008a; Klee *et al.*, 2007; COLOSS, 2009; Higes *et al.*, 2010c; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Meana *et al.*, 2017; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Goblirsch, 2018), y en particular con el Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas, más conocido como CCD (*Colony Collapse Disorder*, por sus siglas en inglés), en diferentes regiones del mundo (Cox-Foster *et al.*, 2007; Van der Zee *et al.*, 2014; Goblirsch, 2018).

La diferente patogenicidad de las nosemosis se ha relacionado con la respuesta del hospedador a la carga de esporas administradas a las abejas en infecciones experimentales. Normalmente, a mayor dosis de infección, mayores son los efectos sobre la fecundidad y supervivencia del hospedador (Goblirsch, 2018). Este fenómeno ha sido confirmado en infecciones experimentales por *N. apis* y *N. ceranae*, donde las abejas infectadas con mayores dosis presentaron una mayor mortalidad y un mayor consumo de azúcares (Martín-Hernández *et al.*, 2012).

Existen claras evidencias de que *N. ceranae* afecta a varios aspectos de la fisiología individual (metabolismo y respuesta inmunitaria), la morfología y el comportamiento de las abejas infectadas (Antúnez *et al.*, 2009; Kralj y Fuchs, 2009; Naug y Gibbs, 2009; Mayack y Naug, 2010; Aliferis *et al.*, 2012; Chaimanee *et al.*, 2012; Goblirsch *et al.*, 2013; Holt *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2014; Benvau y Nieh, 2017; Martín-Hernández *et al.*, 2017). Por todo ello, la infección afecta desfavorablemente en la viabilidad y supervivencia de las abejas, y compromete la salud de las colmenas disminuyendo la productividad de las mismas (Botías *et al.*, 2013a; Bravo *et al.*, 2014; Simeunovic *et al.*, 2014).

A continuación, se detallan los efectos conocidos sobre la abeja individual y sobre la colonia de abejas melíferas.

2.2.1. Efectos en la abeja individual

La mayoría de los estudios realizados en laboratorio se desarrollan con abejas obreras jóvenes donde la infección experimental con esporas de *N. ceranae* ha demostrado tener efectos negativos. Numerosos estudios concluyen que este parásito acorta la vida de las abejas enjauladas (Williams *et al.*, 2008b; Mayack y Naug, 2009; Alaux *et al.*, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012; Schwarz y Evans, 2013; Goblirsch *et al.*, 2013; Roberts y Hughes, 2015; Basualdo *et al.*, 2014; Roberts y Hughes, 2014; Aufauvre *et al.*, 2014; Doublet *et al.*, 2015b; Huang *et al.*, 2015), y solo unos pocos experimentos de laboratorio discrepan (Milbrath *et al.*, 2013; Retschnig *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2016; Badaoui *et al.*, 2017).

La **Tabla 2.2** muestra un ejemplo de 10 trabajos experimentales de patogenicidad de *N. ceranae* en abejas obreras infectadas a diferentes edades a través de la administración de esporas de manera individual o colectiva, y detalla la variabilidad de los métodos empleados y de los resultados obtenidos con respecto a la supervivencia de las abejas (evaluada como dosis letal de esporas –DL- a un tiempo determinado después de la infección –d.p.i-), y la infectividad de las esporas (evaluada como la dosis de esporas necesarias para infectar un determinado porcentaje de abejas -DI-).

Lugar	Edad	Método de infección	d.p.i.	Dosis letal (DL) Dosis infecciosa (DI)	Fuente
España (Guadalajara)	5 días p.e.	I (10 µl en sacarosa 50%)	8	125.000 >DL100	<i>Higes et al., 2007</i>
Suecia (Uppsala)	2 semanas	I (10 µl en sacarosa 50%)	14	DI50: 50-85 DI100: 10.000	<i>Forsgren y Fries, 2010</i>
España (Guadalajara)	5 días p.e.	I (10 µl en sacarosa 50%)	7	DL11: 1.000 DL20: 10.000 DL67: 50.000 DL93: 100.000	<i>Martín-Hernández et al., 2011</i>
Argentina (Mar de Plata)	7 días p.e.	I (10 ml en sacarosa 60%)	9	4.600 ≈DI100	<i>Porrini et al., 2011</i>
EE.UU. (Illinois)	5 días p.e.	I (2µl en sacarosa 50%)	24h 5 14	DI50: 10.053 DI100: 500.000 DI50: 3.217 DI100: 50.000 DI50: 5.009 DI100: 50.000	<i>Huang et al., 2014</i>
EE.UU. (Texas)	2 días p.e.	C (sacarosa y polen durante 24h)	24 30 35	DL50: 5.000-50.000 DL50: 500 DL50: 50	<i>Huang et al., 2014</i>
EE.UU. (Ingham)	0 días p.e.	I (2µl en sacarosa 50%)	20	DL50: 30.000	<i>Milbrath et al., 2015</i>
Canadá (Guelph)	0 días p.e.	I (10 µl sacarosa 50%)	18	Dosis mínima: 1.28 DI50: 149 DI100 ≥ 4.000- 20.000 (93%-98%)	<i>McGowan et al., 2016</i>
EE.UU. (California)	1-2 días p.e.	C (1 ml sacarosa al 50% durante 4 días aprox.)	15	30.000 ≈DI78	<i>Lecqoc et al., 2016</i>
Francia (Luz Saint Sauveur)	1-2 días p.e.	C (2 ml sacarosa al 66% hasta agotarse)	5	86.000 >DL17	<i>Badaoui et al., 2017</i>

Tabla 2.2. Resumen de ensayos de mortalidad en laboratorio. Edad: días post-emergencia (p.e) de las abejas obreras en el momento de la inoculación de esporas. Método de infección: I= inoculación individual; C= inoculación colectiva con esporas suspendidas en el alimento. d.p.i.: días post-inoculación; tiempo al que se analiza la mortalidad. DL50: dosis de esporas de *N. ceranae* que produce la muerte del 50% de las abejas; del mismo modo DL11, DL100, etc. (dosis de esporas de *N. ceranae* que produce la muerte del 11% o del 100% de las abejas, respectivamente). DI50: dosis de esporas de *N. ceranae* que produce la infección del 50% de las abejas; del mismo modo DI16,5; DI100, etc. Dosis mínima: dosis de esporas de *N. ceranae* necesaria para infectar al menos a una abeja.

Junto a las consecuencias derivadas de la lisis de las células epiteliales del ventrículo infectadas, la infección por *N. ceranae* reduce la apoptosis de estas células en las abejas adultas (Higes *et al.*, 2013; Martín-Hernández *et al.*, 2017), reduciendo la respuesta innata en etapas específicas durante el desarrollo del parásito (Gregorc *et al.*, 2016). Al evitar la muerte programada de las células infectadas, el parásito puede multiplicarse más. Con el mismo objetivo es capaz de inhibir genes implicados en la

señalización celular y en la autorrenovación de las células intestinales (Dussaubat *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016; Panek *et al.*, 2018).

En abejas infectadas por *N. ceranae* se observan con frecuencia alteraciones en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos, lo que también sugiere una actividad de manipulación del patógeno para asegurar la disponibilidad de nutrientes para su propio beneficio (Mayack y Naug, 2010; Aliferis *et al.*, 2012; Vidau *et al.*, 2014), que no ha sido observada en las abejas tolerantes al microsporidio (Kurze *et al.*, 2016a; b). La infección por microsporidios también afecta negativamente al desarrollo de las glándulas hipofaríngeas en abejas infectadas (Wang y Moeller, 1971; Alaux *et al.*, 2010; Jack *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019), de especial importancia en la nutrición y homeostasis fisiológica en las abejas sociales. El mayor consumo de alimento en abejas infectadas, puede ser un síntoma del estrés energético directamente relacionado con la dependencia del microsporidio por la energía del hospedador (Mayack y Naug, 2009; Alaux *et al.*, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Vidau *et al.*, 2011), aunque no siempre se ha observado (Aufauvre *et al.*, 2012, 2014). También puede verse reflejado por una mayor búsqueda de alimento (Mayack y Naug, 2013), por la disminución en la hemolinfa de la mayoría de los carbohidratos y aminoácidos implicados en diversas vías bioquímicas, como la fructosa, la prolina L, el sorbitol y el glicerol (Aliferis *et al.*, 2012), por la pérdida acelerada de lípidos (Li *et al.*, 2018) y de proteínas (Li *et al.*, 2019), o por signos de inanición en otros tejidos del aparato digestivo (Vidau *et al.*, 2014). Esta pérdida acelerada de lípidos y proteínas en las abejas obreras infectadas con *N. ceranae* podría causar un efecto en cascada en la fisiología individual de la abeja y conducir a la búsqueda de alimento precoz (Li *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019), que explicaría por qué las abejas infectadas comienzan a pecorear antes.

Recientemente, se ha demostrado que las secreciones de enzimas hexoquinasas por *N. ceranae* (y *Nosema bombycis*) tienen la capacidad de fosforilar la glucosa de las células infectadas (Dolgikh *et al.*, 2019). Este hecho apoya otros hallazgos anteriores (Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al.*, 2018), en los que se sugiere que la infección por *N. ceranae* actúa directamente sobre el metabolismo celular del hospedador.

Este efecto de *N. ceranae* sobre el metabolismo de abejas infectadas también se ha confirmado a nivel genético (Szumowski y Troemel, 2015). La manipulación genética se puede reflejar tanto en la modificación de la expresión de genes implicados en el metabolismo y transporte de la glucosa y la trehalosa (la principal molécula de almacenamiento de energía de carbohidratos en los insectos; Dussaubat *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014), como en la menor producción de proteínas involucradas en el suministro de energía (Vidau *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019). Además, las abejas infectadas han mostrado una respuesta de estrés oxidativo (Vidau *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012). Esta respuesta de tipo sistémico se ha relacionado con alteraciones metabólicas y fisiológicas severas en otros órganos vitales como el cerebro, las glándulas hipofaríngeas o la cutícula externa del insecto, tejidos donde se

han encontrado alteraciones a nivel transcripcional y proteómico derivados del estrés oxidativo (McDonnell *et al.*, 2013; Aufauvre *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019). Estos cambios podrían explicar la muerte prematura de las abejas infectadas (Vidau *et al.*, 2014; Aufauvre *et al.*, 2014).

Todas las castas de *A. mellifera* (obreras, reinas y zánganos) son susceptibles a la infección por *Nosema* spp. (Higes *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009c; Traver y Fell, 2011; Martín-Hernández *et al.*, 2012; Traver y Fell, 2012), aunque el mayor conocimiento se tiene de las abejas obreras de diferentes edades, dado su uso en estudios experimentales.

Los zánganos adultos pueden infectarse de forma natural por *N. ceranae*, y el ADN del microsporidio ha sido detectado en pupas de zánganos en condiciones naturales (Traver y Fell, 2011). Sin embargo, pocos estudios han examinado el coste de la infección en zánganos para determinar si *Nosema* afecta de manera similar al estado energético y a la maduración sexual de los machos (Holt *et al.*, 2018). Algunos trabajos demuestran que la susceptibilidad a la infección por *N. ceranae* es mayor en zánganos que en abejas obreras (mayor mortalidad y pérdida de peso), sugiriendo por tanto cierta especificidad patogénica dependiente del sexo del individuo (Retschnig *et al.*, 2014). Sin embargo, también se ha informado de la capacidad de los zánganos para tolerar mejor las infecciones por *Nosema* spp. (Huang *et al.*, 2012), por lo que existe cierta controversia en cuanto a su susceptibilidad sexo-específica.

Por otro lado, se ha propuesto a los zánganos como grandes dispersores de la enfermedad entre las colmenas, ya que suelen frecuentar varias colonias diferentes. Por un lado, los zánganos son más longevos, con un efecto directo en la duración e intensidad de la infección, de forma similar a lo que ocurre con las abejas pecoreadoras que son las que presentan mayor carga parasitaria (Higes *et al.*, 2008a; Meana *et al.*, 2010; Smart y Sheppard, 2012; Li *et al.*, 2017b), y por otro lado, los zánganos más maduros sobreviven mejor a la infección que los más jóvenes (Roberts y Hughes, 2014), lo que ha llevado a sugerir su papel súper-diseminador.

Además, *N. ceranae* podría disminuir la viabilidad de los espermatozoides, tal y como ha sido observado en infecciones por *N. apis* (Peng *et al.*, 2015), lo que podría suponer una grave pérdida de diversidad genética para las especies de abejas afectadas. Un estudio reciente con zánganos recién nacidos y experimentalmente infectados por *N. ceranae* relaciona la muerte prematura de los machos con el estrés energético (Holt *et al.*, 2018). La infección no afectó al número de espermatozoides de los machos y, sin embargo, alteró las tasas de maduración sexual y la actividad de vuelo en el campo (Holt *et al.*, 2018).

Las reinas son, asimismo, susceptibles a la infección a través de la transmisión horizontal de esporas (Higes *et al.*, 2009c), siendo las más jóvenes más susceptibles a la infección, y pudiendo desarrollar la enfermedad con mayor intensidad (Chaimanee *et al.*, 2014). Además, la infección de la

única hembra fértil de la colmena conlleva importantes cambios en factores relacionados con la capacidad reproductora del súper-organismo y los niveles hormonales en la reina (Alaux *et al.*, 2011).

2.2.2. Efectos en la colonia de abejas

Como ya se ha mencionado en el apartado 2.1.4, la infección por *N. ceranae* puede alterar la regulación fisiológica del polietismo normal de las abejas melíferas (cambio de tareas según la edad de las abejas obreras).

En abejas infectadas se han visto disminuidos los niveles de Vg (Ares *et al.*, 2012; Dussaubat *et al.*, 2013a; Goblirsch *et al.*, 2013), y aumentados los niveles de JH y EO (Dussaubat *et al.*, 2010; Goblirsch *et al.*, 2013). Estos cambios hormonales promueven la búsqueda de alimento y la inhibición del comportamiento de las nodrizas, lo que en definitiva promueve una aceleración al comportamiento de la pecorea (Higes *et al.*, 2008b; Goblirsch *et al.*, 2013; Holt *et al.*, 2013; Lecocq *et al.*, 2016; Fleites-Ayil *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019), acompañado además de un acortamiento de la vida de las abejas obreras infectadas (Goblirsch *et al.*, 2013; Bordier *et al.*, 2017). De hecho, la infección por *N. ceranae* perturba los fundamentos básicos del polietismo temporal (Higes *et al.*, 2008a), produciendo un efecto demográfico directo ya que las abejas infectadas realizan una actividad de vuelo más precoz y más intensa que las abejas sanas y, con ello, se ocasiona una disminución del tiempo dedicado al cuidado de la cría. Al mismo tiempo, las abejas infectadas ejercen una presión de feromonas por tener aumentada la EO que produce sobre las abejas sanas un retraso de su maduración, mientras la muerte de las abejas infectadas provoca una fuerte disminución en el tamaño de la población (Alaux *et al.*, 2014), que en última instancia lleva a la muerte de la colmena (Higes *et al.*, 2008a; Dussaubat *et al.*, 2013a; Goblirsch *et al.*, 2013). Sin embargo, no todos los estudios han demostrado una mayor mortalidad de las abejas infectadas por *N. ceranae* o alteraciones en su comportamiento, especialmente a corto plazo y en las abejas más jóvenes (Retschnig *et al.*, 2015; Charbonneau *et al.*, 2016; Piironen *et al.*, 2016).

El comportamiento de la pecorea en las abejas infectadas también se ve alterado: hacen viajes de búsqueda más largos y pasan menos tiempo en la colmena entre viajes sucesivos (Lecocq *et al.*, 2016; Jack *et al.*, 2016b), transportando menos alimento en cada viaje (Alaux *et al.*, 2014; Naug, 2014), e incluso pueden perder la orientación (Wolf *et al.*, 2014), y la memoria y el aprendizaje olfativo (Gage *et al.*, 2018). Esta alteración de búsqueda de alimento, descrita por la mayoría de los trabajos, se apoya en fenómenos de deterioro cognitivo de las abejas (Higes *et al.*, 2008a; b; Kralj y Fuchs, 2009; McDonnell *et al.*, 2013), aunque no se ha observado en abejas poco infectadas y asintomáticas (Wolf *et al.*, 2016).

Otros trabajos han mostrado que, la infección por *N. ceranae* puede promover el comportamiento juvenil en abejas nodrizas previamente infectadas durante su estadio larvario, las cuales

permanecen más tiempo al cuidado de la cría (Benvau y Nieh, 2017), lo que podría favorecer la infección de otras abejas jóvenes en el interior de la colmena, e incluso la infección de la reina (Benvau y Nieh, 2017; Biganski *et al.*, 2017), que a su vez tendría graves consecuencias sobre la salud y supervivencia de la colonia (Higes *et al.*, 2008a; Chaimanee *et al.*, 2014).

Todas estas observaciones, apoyan el hecho de que las colmenas enfermas por nosemosis tipo C se caracterizan por contener un mayor número de abejas pecoreadoras (típicamente más mayores) infectadas y más intensamente que las jóvenes (Higes *et al.*, 2008b, 2009a; Meana *et al.*, 2010; Botías *et al.*, 2012a; b; Smart y Sheppard, 2012; Bravo *et al.*, 2014; Cepero *et al.*, 2014; Lodesani *et al.*, 2014; Simeunovic *et al.*, 2014; Bekele *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017b; Meana *et al.*, 2017; OIE, 2018), mientras que las abejas más jóvenes (típicamente abejas de interior) tienen una carga media menor de esporas (Meana *et al.*, 2010), y una prevalencia también menor de la infección, por ello generalmente las abejas recién emergidas se encuentran sin infección (Smart y Sheppard, 2012; Jack *et al.*, 2016b; Li *et al.*, 2017b).

Algunos trabajos han observado una fase subclínica que se podría detectar a través de una serie de signos muy sutiles como la puesta de la reina en los meses invernales, una mayor proporción de cría respecto a abejas obreras en los meses templados (comparado con colonias no infectadas), y sobre todo un descenso en la producción de miel prolongado antes de la muerte (Higes *et al.*, 2008a; Botías *et al.*, 2013a). Además, a largo plazo se produce una reducción alta del número de abejas y de la puesta de la cría en la colmena y la colmena muere en invierno o llega muy debilitada al inicio de la primavera (Higes *et al.*, 2010c; Botías *et al.*, 2013a;; Higes *et al.*, 2013). El aumento de la cantidad de abejas jóvenes al inicio de la primavera diluye el porcentaje de parasitación en la colmena, lo que lleva a una aparente recuperación y un retraso en la muerte de la colonia infectada (Higes *et al.*, 2009a).

Varios modelos matemáticos han explorado el proceso de colapso de la colonia (Khoury *et al.*, 2011, 2013; Russell *et al.*, 2013; Betti *et al.*, 2014; Perry *et al.*, 2015) y demuestran que, cuando un agente nosógeno produce un estrés mantenido en el tiempo sobre una colonia de abejas melíferas, como es la reducción de la esperanza de vida de las abejas infectadas por *N. ceranae* (Perry *et al.*, 2015), las abejas nodrizas comienzan a pecorear precozmente para restaurar la proporción de pecoreo en la población, reduciendo el tiempo que cada abeja contribuye al crecimiento de la colonia y a la producción de la cría (Khoury *et al.*, 2011), así como del alimento que entra en la colmena (Khoury *et al.*, 2013). En estas condiciones la colonia desaparece, pero el alimento residual permanece. Además, si ocurre un aumento de la tasa de transmisión de la enfermedad (Betti *et al.*, 2014), por ejemplo durante el confinamiento invernal o poco antes, y una mayor tasa de trofalaxia con abejas infectadas en edad temprana, el efecto nocivo acelera la muerte de las colmenas, tal y como se ha descrito en condiciones de campo (Higes *et al.*, 2008a).

2.3. EPIDEMIOLOGÍA

Todavía se desconoce cuál es el hospedador original de *N. ceranae*, pero probablemente evolucionó con *Apis cerana* (Fries *et al.*, 1996; Botías *et al.*, 2012c). La primera descripción de *N. ceranae* en la abeja asiática se localizó cerca de Beijing (China), y no incluyó información sobre su impacto en la salud de las colonias (Fries *et al.*, 1996), probablemente debido a que se trata de una especie de abeja poco relevante económicamente en el mundo de la apicultura, y a que el patógeno no mostró una especial virulencia a pesar de confirmarse su carácter infeccioso. Desde entonces, y hasta su detección en *A. mellifera* simultáneamente en apiarios de España y Taiwán en el año 2005 (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007), esta especie de microsporidio pasó desapercibida.

En tan solo dos años, se encontró *N. ceranae* en EE.UU., Brasil, China, Vietnam y otros ocho países de la UE (Cox-Foster *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007). El análisis tanto de muestras frescas de abejas como de muestras históricas indica que *N. ceranae* tenía un rango geográfico y de hospedadores muy amplio, y expandido décadas antes de sus primeras detecciones en infecciones naturales en Europa, Asia y América del Norte (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2006; Cox-Foster *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007). En uno de esos estudios, las muestras antiguas de abejas europeas recogidas en Finlandia entre 1986 y 2006 se examinaron mediante análisis molecular, y se encontró *N. ceranae* en abejas obreras de *A. mellifera* desde 1998 (Paxton *et al.*, 2007). Del mismo modo, en un estudio reciente de muestras antiguas del género *Apis* de diferentes partes del mundo, *N. ceranae* fue encontrado en *Apis cerana* y *Apis dorsata* en muestras de 1968 en Vietnam (Traver y Fell, 2015) y en *A. mellifera* en los EE.UU. desde 1975 (Traver y Fell, 2015). Asimismo, se detectó la presencia del microsporidio en Uruguay en una abeja adulta de *A. mellifera* recolectada antes de 1990 (Invernizzi *et al.*, 2009), en Italia en muestras de 1993 (Ferroglio *et al.*, 2013), en Canadá en especímenes de 1994 (Currie *et al.*, 2010), y en México en muestras de 1995 (Guerrero-Molina *et al.*, 2016). Si bien, el sistema de conservación de las muestras podría haber influido en la detección molecular.

Durante los últimos diez años la pandemia de la nosemosis tipo C ha sido confirmada en colonias de *A. mellifera* en países tan separados geográficamente como Australia (Giersch *et al.*, 2009), Japón (Yoshiyama y Kimura, 2011), Chile (Martínez *et al.*, 2012), Jordania (Haddad, 2014), Arabia Saudita (Ansari *et al.*, 2017), o Siberia (Tokarev *et al.*, 2018). Asimismo, se ha encontrado en otras especies de abeja melífera asiáticas, incluyendo *Apis florea*, *A. dorsata* (Chaimanee *et al.*, 2010) y *Apis koschevnikovi* (Botías *et al.*, 2012c).

El área de su distribución geográfica actual cubre una gran parte de la diversidad de los cuatro linajes evolutivos principales de *A. mellifera* (A: africano; M: europeo occidental; C: europeo oriental; y O: de Oriente Medio. Ruttner, 1988; De la Rúa *et al.*, 2009), con 14 subespecies como potenciales hospedadores a la infección. Al igual que con la dispersión de muchos otros microorganismos infecciosos, cuya propagación se está produciendo a niveles sin precedentes a través de la red mundial

de transporte (Wilson *et al.*, 2009), la rápida dispersión de *N. ceranae* en los últimos años, a lo largo y ancho de todo el globo terráqueo y en diferentes especies de abejas, se ha visto favorecida, muy probablemente, por el aumento del comercio internacional. De hecho, la globalización ha brindado oportunidades para que este y otros parásitos crucen las fronteras geográficas y se expandan a nuevos hospedadores en la apicultura (Chen *et al.*, 2009; Chen y Huang, 2010; Li *et al.*, 2012; Vanbergen *et al.*, 2013). Aunque el momento de la introducción de *N. ceranae* como patógeno de *A. mellifera* sigue siendo a día de hoy incierto, puede haber coincidido con la propagación del parásito del ácaro *Varroa destructor* (Smirnov, 1978).

En un principio, se propuso el desplazamiento de *N. apis* por *N. ceranae* (Fries *et al.*, 2010), sin embargo esta hipótesis ya ha sido descartada en muchas regiones del mundo, incluida la mediterránea (Roudel *et al.*, 2013; Gómez-Moracho *et al.*, 2014; 2015a; van der Zee *et al.*, 2014; Pelin *et al.*, 2015). En línea con estas observaciones, *N. apis* presenta una variabilidad genética considerablemente diferente entre las abejas melíferas del linaje de África y la Península Ibérica (linaje A), y las subespecies de *A. mellifera* distribuidas por el sudeste de Europa o por Europa occidental y septentrional (linajes C o M, respectivamente). Por el contrario y hasta donde se sabe, *N. ceranae* no presenta estas variaciones genéticas en diferentes linajes de *A. mellifera*. Por lo tanto, la estructura poblacional de ambas especies en la abeja melífera sugiere que la relación entre *A. mellifera* y *N. apis* es mucho más antigua que la que existe entre *A. mellifera* y *N. ceranae* (Maside *et al.*, 2015). Respecto a la Península Ibérica, en la actualidad, tanto *N. apis* como *N. ceranae* están presentes.

Por otro lado, y en la misma línea científica, el genotipo de las abejas ha sido postulado como un factor determinante de la desigual virulencia de *N. ceranae* en distintas áreas geográficas, siendo posible que diferentes subespecies varíen en su capacidad para contrarrestar la infección. Sin embargo, no se ha probado en los linajes de *A. m. iberiensis* (Jara Nicolás, 2012). Por el contrario, la variación genética entre abejas individuales o colonias dentro de un mismo linaje, y no entre linajes, parece ser un mejor predictor de la respuesta de las colmenas a *N. ceranae* (Fontbonne *et al.*, 2013). Su aplicación está siendo utilizada en un programa de cría en Dinamarca donde se seleccionan las colmenas menos parasitadas (Traynor y Traynor, 2008). Sin embargo, no todos los estudios ofrecen apoyo para que la cepa de la abeja contribuya a la virulencia diferencial (ver Martín-Hernández *et al.*, 2018).

Hoy en día y a pesar de su posterior descripción, *N. ceranae* no solo está más extendida respecto a *N. apis*, sino que incluso predomina en muchas regiones del planeta (Klee *et al.*, 2007; Giersch *et al.*, 2009; Invernizzi *et al.*, 2009; Fries, 2010; Porrini *et al.*, 2011b; Traver y Fell, 2012; Khezri *et al.*, 2018; Tokarev *et al.*, 2018).

En la última década, la detección de la infección por *N. ceranae* en las abejas melíferas ha aumentado en todo el mundo y más específicamente en los países del sur de Europa (Stevanovic *et al.*, 2011). Por el contrario, en los países del norte de Europa, *N. apis* sigue siendo predominante sobre *N.*

ceranae (Gisder *et al.*, 2010; Forsgren y Fries, 2013; Blažytė-Čereškienė *et al.*, 2014, 2016), aunque existe cierta controversia al respecto que puede deberse a la diferente metodología empleada para la detección de ambas especies de microsporidios (Gisder y Genersh, 2013; Duquesne *et al.*, 2018).

Por ello, *N. ceranae* se considera ahora un agente patógeno predominante de *A. mellifera* que está relacionado con las altas pérdidas de colonias en los países mediterráneos (Klee *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008a; Bacandritsos *et al.*, 2010; Soroker *et al.*, 2011; Hatjina *et al.*, 2011; Botías *et al.*, 2012d; Lodesani *et al.*, 2014). La prevalencia del patógeno va en aumento en muchos países independientemente de sus latitudes (Klee *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2009a; Martín-Hernández *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2013a; Lodesani *et al.*, 2014; Emsen *et al.*, 2016; Ghoyouchi *et al.*, 2017; Ostroverkhova *et al.*, 2019), siendo por tanto emergente en algunas regiones.

Este amplio rango de temperaturas puede estar no solo relacionado con diferencias epidemiológicas entre las dos especies de *Nosema*, sino también con la mayor infectividad de *N. ceranae*. Las señales de germinación a las que responden las esporas de ambos microsporidios todavía no han sido aclaradas (Goblirsch, 2018), y se ha sugerido que la temperatura ambiental pueda ser también determinante en la germinación (Smith, 2012). Se han propuesto algunos factores ambientales en detrimento de la viabilidad de las esporas de *Nosema* spp. al reducir o inhibir su germinación y determinar la propagación de la enfermedad en la abeja y en la colonia, tales como la radiación, la fumigación química o la exposición a bajas temperaturas y el secado (Malone *et al.*, 2001; Fenoy *et al.*, 2009; Gisder *et al.*, 2010; Pernal *et al.*, 2010; Sánchez Collado *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014). Las esporas de *N. ceranae* son tolerantes a temperaturas de hasta 60°C y pueden sobrevivir a la desecación (Fenoy *et al.*, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2009). Por el contrario, son sensibles a las bajas temperaturas y a la congelación bajo condiciones experimentales (Fries, 2010; Gisder *et al.*, 2010; Sánchez Collado *et al.*, 2014).

Las abejas pueden recuperarse de la infección por *N. apis* cuando se mantienen a una temperatura moderadamente elevada de 37°C (Lotmar, 1943). Aunque la temperatura de las abejas melíferas durante el vuelo y los escalofríos endotérmicos pueden ser bastante elevados, el aumento del calor se localiza predominantemente en el tórax, y el abdomen, que contiene el ventrículo infectado, no experimenta temperaturas drásticamente más altas (Stabentheiner *et al.*, 2010). Si bien, parece que el aumento de temperatura que normalmente experimentan las abejas en dichas situaciones son suficientes para afectar la infección por *N. apis* (Bailey, 1959). Se sabe que las abejas tienen hipertermia en algunas infecciones micóticas (Starks *et al.*, 2000) y prefieren temperaturas más cálidas cuando se infectan con *N. ceranae* (Campbell *et al.*, 2010). A pesar de su genoma reducido, *N. ceranae* es sorprendentemente termotolerante, creciendo óptimamente a la temperatura de la colonia de 35°C, y muestra un fuerte aumento en la regulación de los genes que quedan después un choque térmico (McNamara-Bordewick

et al., 2019), lo que sugiere un nuevo sistema de regulación térmica aun por dilucidar. Por lo tanto, sería interesante determinar si estos comportamientos influyen en la infección por *Nosema* spp.

Un estudio realizado en Lituania en 2013, sitúa a *N. ceranae* en las regiones más al sur y al este, no detectándose en las más frías del norte (Blažytė-Čereškienė *et al.*, 2014). Recientemente, dos estudios desarrollados en la región del distrito federal de Siberia (Rusia), en una de las regiones habitadas más frías del globo con un clima subártico donde históricamente la media de temperatura anual es de -10,6°C, revelan un pronunciado aumento de la infección por *N. ceranae*, y describen cómo las colonias de abejas han pasado de la infección por microsporidios del 0% en 2012 a alrededor del 80% en 2016-2017. En 2013-2014, el 60% de todos los colmenares infectados eran positivos a *N. apis*; sin embargo, en 2015-2017, la mayoría de los colmenares infectados (52,2%) fueron positivos a la co-infección por *N. apis* y *N. ceranae* (Ostroverkhova *et al.*, 2019). Estos datos sugieren que *N. ceranae* también se está extendiendo por el suroeste de Siberia y que, junto con *N. apis*, pueden persistir en regiones con temperaturas medias por debajo de -18°C (Tokarev *et al.*, 2018). No obstante, la temperatura dentro de la colmena nunca llegará a niveles tan bajos y, por lo tanto, las esporas en su interior junto con la prevalencia de abejas infectadas pueden mantener la infección en el interior de una colmena, incluso en ambientes externos extremadamente fríos. Sin embargo, aunque pueda realizar su ciclo biológico parece que los climas más fríos como Alemania, los países balcánicos, Suiza y el norte de Grecia no cumplen las condiciones específicas (prácticas climáticas y/o apícolas) para que *N. ceranae* comprometa la supervivencia de las colonias (Gisder *et al.*, 2010; Hedtke *et al.*, 2011; Stevanovic *et al.*, 2011; Dainat *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2014).

La transmisión de *N. ceranae* es principalmente directa de abeja a abeja, pero puede ocurrir por rutas aún no aclaradas completamente. Se sabe que otros himenópteros y aves insectívoras pueden estar implicadas en la diseminación de esporas en el medio ambiente (Valera *et al.*, 2011, 2017; Plischuk *et al.*, 2017). Las flores pueden contaminarse con patógenos de abejas a través de la visita de diferentes especies de polinizadores que pueden servir de fuente de esporas (Graystock *et al.*, 2014, 2015; Müller *et al.*, 2019). Una diferencia clara con respecto a *N. apis* es que *N. ceranae* es capaz de infectar diferentes especies de polinizadores silvestres, como abejorros del género *Bombus* spp. que, en un estudio realizado en China, demostraron transmitir la infección a abejas melíferas (Li *et al.*, 2012). No obstante, hasta la fecha se tiene muy poca información acerca de su acción patógena en especies de abejas silvestres, solitarias o sociales, que pueden infectarse en presencia de abejas melíferas infectadas (Müller *et al.*, 2019). De esta manera, mediante el intercambio de los recursos florales disponibles, es posible que un patógeno pueda tener acceso a nuevos hospedadores coexistentes.

En una revisión reciente, Martín-Hernández *et al.* (2018) detallan la multitud de especies susceptibles a la infección por *N. ceranae* que, con un rango de hospedadores cada vez más amplio, denota una baja especificidad y una capacidad de adaptación alta a nuevos hospedadores. *Nosema*

ceranae no solo se ha extendido por todo el mundo (excepto en la Antártida), sino que además ha saltado a través de numerosas especies de ápidos (*Apidae*), una amplia familia de himenópteros apócritos, con abejas tanto sociales como solitarias, incluyendo los géneros *Apis* (Tribu Apini, verdaderas abejas sociales de la miel) *Bombus* (único género de la Tribu Bombini; abejorros sociales de distribución en climas templados y altitudes generalmente elevadas), *Osmia* (Tribu Osmiini; abejas solitarias albañiles con amplia distribución geográfica), *Andrena* (Familia Andrenidae; abejas solitarias de la arena, uno de los géneros más numerosos y de distribución casi mundial, a excepción de Sudamérica y Oceanía) y *Melipona*, *Tetragonisca* y *Scaptotrigona* (de la Tribu Meliponi; abejas sociales sin aguijón de América Central y Sudamérica). Con este carácter eurixeno su impacto es mayor al infectar más especies ampliamente utilizadas en la agricultura para la polinización de los cultivos, e incluso para el aprovechamiento de su miel.

Este notable rango de hospedadores y su correspondiente distribución global, también representa una amplia variedad de climas, desde el tipo mediterráneo en España (Higes *et al.*, 2006), templado en Canadá (Williams *et al.*, 2008a), tropical en México (Guerrero-Molina *et al.*, 2016), árido caliente en Arabia Saudita (Ansari *et al.*, 2017) y hasta el subártico en Siberia (Tokarev *et al.*, 2018). A pesar de esta gran distribución geográfica e interespecífica, no está claro si *N. ceranae* es virulento para todos los *Apidae*, dado que la mayoría de los estudios experimentales se han limitado al estudio de su patogenicidad en *A. cerana* (Suwannapong *et al.*, 2011) y, en gran medida, en *A. mellifera* (Higes *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Mayack y Naug, 2009; Forsgren y Fries, 2010; Chaimanee *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015; Mayack *et al.*, 2015; Milbrath *et al.*, 2015; Natsopoulou *et al.*, 2015), siendo escasos los estudios patológicos en otras especies que se reducen a *A. florea* (Suwannapong *et al.*, 2011, 2018), abejas del género *Bombus* spp. (Graystock *et al.*, 2013) y *Osmia bicornis* (Müller *et al.*, 2019).

El primer paso para comprender los efectos de *N. ceranae* es la capacidad de detectar este patógeno y diagnosticar la enfermedad. Recientemente, mediante técnicas moleculares de PCR ha sido detectado en Argentina en individuos adultos de la avispa social *Polybia scutellaris* (familia Vespidae), que son comúnmente conocidas como avispas amigables (sus picaduras no producen alergia) y se alimentan del polen y el néctar almacenado en grandes nidos que cuelgan de los árboles, por lo que pueden compartir recursos florales con otras especies polinizadoras y hospedadoras de *N. ceranae* en la región (Porrini *et al.*, 2017). De hecho, en el estudio se describe la presencia del microsporidio en siete de las ocho especies de *Meliponini* analizadas y, la presencia de la avispa en panales vacíos de abejas melíferas en las épocas de cosecha y alrededor de nidos destruidos de las abejas sin aguijón de las que, en ambos casos, aprovecha los restos miel.

Por otra parte, infecciones experimentales con esporas frescas de *A. mellifera* fueron exitosas en larvas de la mariposa nocturna *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Crambidae; Malysh *et al.*, 2018).

Este hallazgo demuestra un salto en el orden del hospedador, pero también añade apoyo a la capacidad de *N. ceranae* de infectar no solo individuos adultos, sino también estadios inmaduros de sus hospedadores, como también ha sido demostrado bajo condiciones controladas en *A. mellifera* (Eiri *et al.*, 2015; Benvau y Nieh, 2017). Asimismo, las larvas de una plaga común de las abejas melíferas, la polilla *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), recogidas en el interior de colmenas de Turquía naturalmente infectadas fueron positivas a la detección del ADN de *N. apis* y *N. ceranae* (Ozgor *et al.*, 2017).

El pequeño escarabajo de la colmena, *Aethina tumida* (Murray 1867, más conocido por sus siglas en inglés, SHB), es una reciente plaga invasora de *A. mellifera*, actualmente distribuida en todos los continentes excepto en la Antártida (Neumann *et al.*, 2016; Al Toufailia *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017) y originaria del África subsahariana (Lundie, 1940; Schmoke, 1974), que se está expandiendo por Europa (da Silva, 2014; Palmeri *et al.*, 2015; Granato *et al.*, 2017). Esta especie ecológicamente generalista es capaz de crear poblaciones persistentes con baja densidad de abejas melíferas (Arbogast *et al.*, 2009). *Nosema ceranae* ha sido detectado en el 70% de los especímenes de SHB recogidos del interior de colmenas, sin signos clínicos de nosemosis, en la Universidad de Gainesville (Florida, Cilia *et al.*, 2018), en los que, sin embargo, se detectó *N. ceranae* mediante técnicas moleculares y por microscopía. Por ello, el pequeño coleóptero además de ser una plaga emergente de colmenas de abejas en muchas regiones del mundo, puede tener un papel determinante como vector de transmisión de la nosemosis y sobre la mortalidad de las colonias.

Además, esporas viables de *N. ceranae* con capacidad de infectar *A. m. iberiensis* se encontraron en las egagrópilas regurgitadas del abejaruco, *Merops apiaster* en España (Higes *et al.*, 2008b). Los abejarucos son aves insectívoras cuya presa predominante es la abeja melífera, por lo que sus egagrópilas se componen mayoritariamente de los exoesqueletos de las abejas previamente ingeridas, fundamentalmente pecoreadoras. Dada la etología del ave migratoria entre el continente africano y el europeo, y atendiendo a la resistencia de las esporas de los microsporidios a las condiciones ambientales, el papel de las egagrópilas se presenta como un reservorio y fuente de transmisión de los mismos pudiendo representar un factor clave en la dinámica de propagación de las nosemosis entre los continentes europeo y africano.

También, esporas de *N. ceranae* (no de *N. apis*) han sido detectadas en varios fórmidos depredadores aviares de abejas en Taiwán (Valera *et al.*, 2017), así como en el abejaruco coliazul *Merops philippinus*, un ave migratoria cuya distribución a lo largo del sureste asiático se solapa con la distribución original de *N. ceranae* (Valera *et al.*, 2017), hallazgo que apoya el potencial diseminador de estas aves migratorias en todo el mundo (Higes *et al.*, 2008b; Valera *et al.*, 2017).

2.4. CONTROL

Aislada por primera vez en 1949 del hongo *Aspergillus fumigatus*, la fumagilina (diclohexilamonio) se ha utilizado para tratar la nosemosis inducida por *N. apis* en abejas melíferas durante varias décadas (van den Heever *et al.*, 2014), y posteriormente se utilizó también para tratar las infecciones por *N. ceranae*. En España, la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) autorizó el uso del único medicamento comercializado para el control de la nosemosis (Fumidil-b) en 1993, y hasta mediados de 2008 concedió varias autorizaciones excepcionales. En 2008, la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por sus siglas en inglés) prohibió su uso en ausencia de un límite de residuos máximos autorizado en miel (LMR, Reglamento de la Comisión UE no. 37/2010, 2010), y por dudas acerca de su toxicidad. El medicamento se mantuvo en suspensión temporal hasta su anulación definitiva en diciembre de 2017.

Por otro lado, varios estudios muestran que este antibiótico poliénico es eficaz solo temporalmente contra las infecciones por *N. ceranae* (Williams *et al.*, 2008b; Mendoza *et al.*, 2016). La fumagilina es tóxica y causa aberraciones cromosómicas, carcinogenicidad en cultivos celulares humanos y alteraciones en la ultraestructura de las glándulas hipofaríngeas de las abejas (van den Heever *et al.*, 2014).

En la búsqueda de alternativas para el control de las nosemosis se han realizado numerosos avances científicos en métodos biotécnicos, eficacia de desinfectantes, técnicas moleculares y hallazgos de tratamientos fitoterapéuticos o de suplementos alimenticios, que se resumen de forma esquemática en la **Tabla 2.3**.

Tipo de tratamiento	Manejo/ sustancia / producto /moléculas	Carga de esporas abejas	Supervivencia abejas	Carga de esporas colmena	Otros efectos
DESINFECCIÓN DE MATERIAL APÍCOLA ¹	Lejía y amoniaco (no combinados)	↓	No probado	No probado	Testado en superficies de acero
MANEJO ZOOTÉCNICO ²	Cambio de reina	↓	↑	↓	↑ fortaleza colmena / ↑ supervivencia colmena
PEQUEÑAS MOLÉCULAS ³	Metronidazol; Tinidazol; Porfirinas; Fumagillin análoga; Fumagillol; Aspirina semisintética; Enilconazol; Piperonil análogo; Timol; Ácido fórmico; Ácido oxálico; Resveratrol	↓ / Ningún efecto / NA	↑ / ↑ / NA / Ninguno	NA / ↓	↓ espora viabilidad / NA / ↑ supervivencia colmena
EXTRACTOS Y SUPLEMENTOS ³	Extractos de polisacáridos; Pentadecapeptide BPC 157; Extracto de EtOH <i>L. nobilis</i> ; Extracto de EO de <i>C. alba</i> ; Extracto de MeOH <i>A. chilensis</i> ; Extracto de MeOH <i>U. molinae</i> ; Extracto de MeOH <i>G. avellanana</i> ; Extracto de propóleos de MeOH; Extracto de propóleos EtOH; BEEWELL AminoPlus; Nozevit; HiveAlive	↓ / NA	↑ / NA / Ningún efecto	NA / ↓	NA / ↓ lesiones en intestino abejas/ ↑ fortaleza colmena / ↑ expresión inmune
SUPLEMENTOS MICROBIANOS ³	Superficie bacteriana; Metabolitos de <i>L. johnsonii</i> ; Bifidobacterias; <i>Lactobacilos</i> ; <i>P. apium</i> ; <i>Bacillus sp.</i> ; <i>Bactocélula</i> ; <i>Levucell SB</i>	↓ / NA / Ningún efecto	↑ / NA	NA / ↓	↓ viabilidad esporas / ↑ cuerpo graso abeja/ ↑ fortaleza colmena / NA
INTERFERENCIA DEL ARN ³	Transportador ADP/ATP RNAi; <i>ptp3</i> RNAi; <i>nk4</i> RNAi	↓	↑ / NA	NA	↑ rresponde del azúcar / ↑ expresión inmune

Tabla 2.3. Lista de tratamientos estudiados para el control de la nosemosis tipo C. No existen sustancias autorizadas para el control de la nosemosis en la Unión Europea. Dada la estricta reglamentación sobre el uso de tratamientos en animales destinados a la producción de alimentos, se deben tomar precauciones en la interpretación de esta tabla que solo señala las líneas de investigación abiertas. "↑": aumento "↓": disminución. "↕" la mortalidad varió entre tratamientos y concentraciones ensayadas de un mismo producto o sustancia. Las métricas que no se midieron se indican como no aplicables (NA). Fuentes: ¹ Rodríguez-García, 2017; ² Botías *et al.*, 2012e; ³ ver Burnham, 2019.

Como método de control zootécnico eficaz se ha demostrado que la sustitución anual de la reina consigue una mayor supervivencia de colmenas y de producción de miel (Botías *et al.*, 2012e), que el tratamiento de las colmenas con la propia fumagilina.

La desinfección del material apícola con productos de uso habitual como la lejía y el amoníaco tiene una alta eficacia esporicida (Rodríguez García, 2017). La aplicación de compuestos naturales (fenólicos y ácidos orgánicos) se ha considerado por el mismo equipo de investigación como la mejor alternativa quimioterapéutica frente a la nosemosis. Tanto el ácido tánico, como el resveratrol y el toltrazuril, en un solo tratamiento otoñal, mantuvieron la parasitación de *N. ceranae* en niveles bajos, de manera que permitieron a la colmena llegar en mejores condiciones a la primavera que las del grupo control (Rodríguez García, 2017).

La terapia con otros compuestos aromáticos, como las porfirinas, también se ha propuesto como tratamiento para el control de la nosemosis, y se resumen en la **Tabla 2.3** (Burnham, 2019). Sin embargo, ninguno de los compuestos ensayados ha sido tan efectivo como la fumagilina para eliminar las infecciones por *N. ceranae*.

Otros sustancias naturales como los ácidos oxálico y fórmico, que se emplean principalmente como acaricidas para el control de la varroosis producida por *V. destructor* (AEMP, 2019), han mostrado una reducción de la carga parasitaria de abejas infectadas por *N. ceranae*, tanto en ensayos de laboratorio como de campo (Underwood y Currie, 2009; Nanetti *et al.*, 2015).

Recientemente se han estudiado los efectos de nuevos complementos fitoquímicos (cafeína, ácido gálico, kaempferol y ácido p-cumárico). Las abejas experimentalmente infectadas por *N. ceranae* y alimentadas con estos complementos dietéticos mostraron una mayor supervivencia, especialmente a las concentraciones más bajas estudiadas (Bernklau *et al.*, 2019).

No obstante, la eficacia de productos comerciales como suplementos fitofarmacológicos, tanto naturales como sintéticos, ha generado cierta controversia en cuanto su acción biocida en condiciones de campo, y respecto a su rentabilidad y practicidad a nivel de la apicultura (Botías *et al.*, 2013c; Rodríguez García, 2017; Burnham, 2019). Nuevos hallazgos apoyan las bases químicas de las interacciones co-evolutivas y reiteran la importancia de la diversidad en las fuentes de nutrición floral para mantener poblaciones saludables de abejas melíferas mediante el fortalecimiento de las relaciones mutualistas naturales (Bernklau *et al.*, 2019).

La investigación del ARN de interferencia (ARNi) está siendo impulsada para el desarrollo de nuevos métodos de control de las infecciones por *N. ceranae* de las abejas melíferas. El ARNi es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional impulsado por el ARN bicatenario (ARNds), que se une a secuencias de transcripción homólogas de un gen diana impidiendo que funcione, y un mecanismo natural anti-infeccioso de la respuesta inmunitaria en las abejas melíferas (**Figura 2.4**). La

administración de ARNds a abejas enjauladas disminuyó significativamente el porcentaje de parasitación por *N. ceranae*, independientemente de la especificidad del ARNds (Rodríguez García, 2017; Rodríguez-García *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayor parte de la investigación en el tratamiento de la nosemosis mediante el silenciamiento génico se ha enfocado a la administración de ARNi de genes de *Nosema* spp. que codifican para proteínas transportadoras de ATP/ADP, para la proteína 3 del tubo polar (PTP3) y para una proteína de la cutícula (*nkd*) del insecto (Paldi *et al.*, 2010; Rodríguez-García *et al.*, 2018). Estos ARNi redujeron la carga de esporas en el hospedador, y aumentaron la respuesta inmune de las abejas (de péptidos antimicrobianos como abaecina, apidaecina, himenoptaecina, etc). Conscientes de que la administración oral de ARNi a las abejas puede disminuir su eficiencia y estabilidad, ya que las enzimas digestivas y el pH intestinal pueden metabolizar y alterar rápidamente la secuencia del medicamento antes del silenciamiento del ARNm objetivo (Burnham, 2019), por lo que todavía no se recomienda la utilización de estos tratamiento de forma conclusiva antes de ser valorados tanto sobre la respuesta de la abeja como sobre la del microsporidio (Rodríguez García, 2017), siendo actualmente tratamientos que probablemente se desarrollarán en el futuro.

Además, otras investigaciones han ido encaminadas a la utilización de sustancias antibióticas o de inhibidores microbianos (por ejemplo MeHO en **Tabla 2.3**). Dada la estricta reglamentación sobre el uso de antibióticos en animales destinados a la producción de alimentos, se deben tomar precauciones en el desarrollo y la aprobación de estos productos para la medicina apícola (Burnham, 2019). Asimismo, la aplicación de cualquier compuesto biocida en medicina apícola deberá demostrar el cribado de *N. ceranae* sin ser tóxico para las abejas, ni en el medio ambiente y, tanto su uso, como el límite de residuos (LMR) deberán estar establecidos y autorizados para el tratamiento específico de esta ganadería.

Por otra parte, se ha informado de que *N. apis* y *N. ceranae* presentan cierta vulnerabilidad al choque térmico (Woyciechowski y Czekonska, 1999; Martín-Hernández *et al.*, 2009; Higes *et al.*, 2010a), y recientemente se ha descrito que este puede desencadenar un estrés proteotóxico que actúa desnaturalizando las proteínas del citoplasma (McNamara-Bordewick *et al.*, 2019). Una mayor comprensión de la sensibilidad de los microsporidios a este estrés podría identificar nuevas estrategias de tratamiento para el control de las nosemosis en abejas melíferas (McNamara-Bordewick *et al.*, 2019).

La identificación temprana de colmenas infectadas puede ayudar a controlar la difusión de la enfermedad entre colmenas de un mismo apiario, evitando el contacto e intercambio de materiales entre ellas. Recientemente, se ha descrito una relación lineal entre las abejas infectadas por microsporidios y las esporas encontradas en la miel de las mismas colmenas durante la primavera, el otoño y en la época de cosecha (Sarıbıyık y Özkırım, 2019). Este resultado sugiere que el muestreo de la miel se puede utilizar para estimar el nivel de infección en colmenas naturalmente infectadas. Otros modelos recientes están abriendo líneas de diagnóstico de las enfermedades basadas en la tecnología de teléfonos móviles

inteligentes, capaces de detectar y cuantificar las esporas de *Nosema* spp. en las abejas a pie de colmena (Snow *et al.*, 2019). Este método es potencialmente adaptable para la detección de la infección *in situ* en entornos rurales con recursos limitados, tales como los montes donde se practica la apicultura.

También cabe destacar que, la salud de las colonias de abejas melíferas está íntimamente relacionada al ambiente de búsqueda de alimento (Ricigliano *et al.*, 2019). Varios estudio destacan el potencial de los terrenos protegidos y forestales para mejorar la salud (nutrición, resistencia al estrés oxidativo y respuesta inmune) de las colonias de abejas melíferas (Kohl y Rutschmann, 2018; Ricigliano *et al.*, 2019). Por otra parte, se predice que bajo ciertas condiciones, las poblaciones de abejas melíferas naturales (Kohl y Rutschmann, 2018) o no tratadas (Neumann y Blacquièrè, 2017) desarrollarán a largo plazo mecanismos de resistencia contra los patógenos a través de la selección natural.

Por todo ello, asegurar el buen estado sanitario de las colonias, situando las colmenas en emplazamientos potencialmente beneficiosos para su bienestar y nutrición, junto con el replazo periódico de la reina (Botías *et al.*, 2012e) y la desinfección del material apícola (Rodríguez García, 2017) son, hasta la fecha, las prácticas más recomendables, y las únicas legales en Europa, para el control de la nosemosis.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinant factors of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Esta tesis se apoya en la experiencia previa del equipo de investigación del CIAPA con el objetivo principal de analizar los efectos de algunos factores bióticos, así como sus interacciones, en el curso y desarrollo de las infecciones por microsporidios, especialmente de *N. ceranae* en abejas melíferas ibéricas (*Apis mellifera iberiensis*).

A pesar del gran avance en el conocimiento de las nosemosis de las abejas, siguen existiendo retos en la investigación de los factores que determinan la infección y sus consecuencias.

Entre estos aspectos es necesario determinar si la infección natural ocurre en los estadios inmaduros de las abejas, y el tropismo tisular real de los microsporidios en abejas adultas. El resultado de estos estudios, epidemiológico y del ciclo biológico de las especies de *Nosema*, allanaría el camino para nuevas hipótesis sobre la patogénesis diferencial de los agentes infecciosos.

Otros aspectos importantes surgen del hecho de que la mayoría de los estudios patológicos se realizan *in vitro*, con abejas enjauladas fuera del súper-organismo biológico (colonia de abejas). Ello conlleva un intensivo manejo de las abejas y de las esporas de los microsporidios, que varía considerablemente de unos trabajos a otros y puede dar lugar a resultados aparentemente contradictorios.

Por ello, es imprescindible conocer el efecto de la edad de las abejas infectadas, del método de infección, y la respuesta del hospedador a lo largo de la infección en el desarrollo de las infecciones experimentales y en los resultados publicados sobre la acción patógena de *N. ceranae*.

Por todo ello, en esta tesis se han estudiado factores dependientes del parásito y del hospedador, con el fin de estimar el origen de las variaciones individuales en el desarrollo de la enfermedad a nivel de abeja adulta y fases de desarrollo, y explicar algunas de las diferencias en el curso de las nosemosis en los diferentes individuos de las colonias infectadas.

Para ello, hemos abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Relacionados con el hospedador:
 - a. Conocer la prevalencia de la infección por microsporidios en las fases de desarrollo de las abejas en colmenas naturalmente infectadas, y su efecto en la epidemiología de la enfermedad (Capítulo I).
 - b. Evaluar la susceptibilidad de abejas adultas en relación con la edad de infección y el método de infección (Capítulo II).
 - c. Analizar variaciones de la respuesta inmune y celular, y el estrés energético, a lo largo del tiempo en abejas adultas infectadas por *N. ceranae* (Capítulo III).

2. Relacionados con el parásito:

- a. Evaluar el efecto patógeno en el órgano diana y diferencias entre las especies de *Nosema* (Capítulo IV).

METODOLOGÍA GENERAL

4. METODOLOGÍA GENERAL

4.1. DECLARACIÓN ÉTICA (p. 47)

4.2. ESPECIE UTILIZADA (p. 47)

4.3. MANEJO DE COLMENAS *in vivo* (p. 49)

4.4. MANEJO DE ABEJAS *in vitro* (p. 50)

4.4.1. Muestreo de abejas adultas (p. 50)

4.4.2. Mantenimiento de las abejas enjauladas (p. 52)

4.5. CARACTERÍSTICAS SINGULARES DE LA

REGIÓN APÍCOLA DE MESTREO (p. 52)

4. METODOLOGÍA GENERAL

Para el desarrollo de los objetivos de esta tesis se requirió de un trabajo multidisciplinar, donde se integraran ensayos experimentales realizados *in vivo*, con colmenas manejadas, e *in vitro*, con abejas enjauladas bajo condiciones controladas y técnicas de biología molecular. De esta forma, el estudio de factores determinantes de la infección por *N. apis* y *N. ceranae* en la subespecie *A. mellifera iberiensis*, se ha desarrollado integrando aspectos epidemiológicos, patológicos, fisiológicos, histológicos y genéticos, que permiten abordar el impacto de las nosemosis, y particularmente de la nosemosis tipo C, desde distintas perspectivas.

Para entender la base y el contexto de los diseños experimentales planteados, se incluye este apartado donde se describen de manera sintética la especie utilizada, la metodología general en la experimentación con colmenas de abejas melíferas y abejas enjauladas y algunas características singulares de la zona de muestreo. No obstante, en cada uno de los capítulos que prosiguen a esta memoria se desarrollan en profundidad los materiales, la metodología y los análisis estadísticos empleados para la consecución de los objetivos planteados en cada uno de ellos.

4.1. DECLARACIÓN ÉTICA

En Europa la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos establece el marco ético para la utilización de animales en experimentos científicos. El ámbito de aplicación de esta Directiva se extiende a especies específicas de invertebrados (como cefalópodos), pero no a los insectos. Por lo tanto, de acuerdo con la legislación europea, no se necesitaron permisos específicos para los estudios realizados.

4.2. ESPECIE UTILIZADA

Apis mellifera Linneo 1758

La abeja europea (*Apis mellifera*), también conocida como abeja doméstica o abeja melífera, es una especie de himenóptero apócrito de la familia *Apidae*. Dada su alta adaptabilidad, las poblaciones nativas de *A. mellifera* se extienden por todo el hemisferio occidental (Europa, África y parte de Asia). Su deliberada introducción como especie ganadera en América y Oceanía la convierte en la especie de abeja con mayor distribución en el mundo (Crane, 1999). Según algunos datos recientes esta especie apareció en África hace unos dos millones de años, y desde aquí se dispersó por Europa y Oriente Medio dando

lugar a cinco linajes evolutivos diferentes: africano (A), europeo occidental (M) y oriental (C), de Oriente Medio (O), y de Etiopía (Y), que se originaron a partir de sucesivas colonizaciones, y se caracterizan en base a estudios morfométricos, moleculares, ecológicos, etológicos y fisiológicos (De la Rúa *et al.*, 2009).

Se trata de una especie que, por su interés ganadero, ha sido manejada durante siglos, tanto para la producción de miel y cera como para la polinización de los cultivos. El manejo humano de una especie a menudo trae consigo profundos cambios en los niveles de variación genética, fenómeno que se conoce como el “cuello de botella de la domesticación” (Wright *et al.*, 2005; Zayed, 2009). No obstante, cabe mencionar que la abeja de la miel, en contraste con otras especies de ganado, no está completamente domesticada ya que el apareamiento de las abejas reinas se produce de forma natural, por lo que sería más correcto considerar a la abeja como un animal semi-domesticado o silvestre, que se puede mantener y utilizar mientras tenga acceso a los recursos necesarios (Moritz, 2005). Sin embargo, al menos desde los años 40 existen programas de cría de reinas e inseminación artificial, encaminadas a conseguir un capital genético homogéneo cuyo principal objetivo es obtener abejas altamente productivas con un comportamiento que facilite su manejo: abejas mansas, poco propolizadoras (excepto para la producción de propóleos), poco enjambradoras, que permanezcan sobre los cuadros cuando se manipulan, con poca puesta (si prima la producción de miel), o al contrario, mucha cría (para la producción de jalea real), y más recientemente también se seleccionan reinas, zánganos y colmenas resistentes a los patógenos que las amenazan (Holt y Grozinger 2016; Huang *et al.* 2012, 2014; Roberts y Hughes 2014; Kurze *et al.*, 2016a; 2016b).

En la naturaleza las reinas son fecundadas por entre 8-18 zánganos procedentes de diferentes colmenas, el aumento de la diversidad genética gracias a esta poliandria dentro de una misma colonia ha demostrado mejorar su resistencia a una amplia gama de enfermedades, y esta hipótesis ha sido demostrada en el caso de las infecciones por *N. ceranae*, con niveles de prevalencia significativamente más altos en colonias genéticamente similares en comparación con las colonias genéticamente diversas (Desai y Currie, 2015).

En esta memoria se han utilizado colmenas de la subespecie de abeja ibérica, *Apis mellifera iberiensis* (Engel 1999). Esta especie es el resultado de una amplia integración entre abejas del linaje M y del linaje A. La estructura poblacional de la abeja ibérica refleja, no solo su historia evolutiva, sino también diferentes adaptaciones a las condiciones locales, y podría haberse visto modificada por las prácticas apícolas de los últimos 20 años, la trashumancia y la pérdida masiva de colmenas por la expansión de enfermedades como la varroosis y la noseosis, y el reemplazo de estas colmenas en las explotaciones apícolas por colonias de otras regiones (De la Rúa *et al.*, 2009; Jara Nicolás, 2012).

En la presente memoria se utilizaron crías de abeja, desde larva recién operculada a pupa pre-emergente, abejas de interior (nodrizas) y pecoreadoras (buscadoras de alimento), en el trabajo

desarrollado en el Capítulo I. Se emplearon abejas obreras de cero a 16 días post-emergencia en los trabajos desarrollados en los Capítulos II, III y IV (**Figura 4.1**).

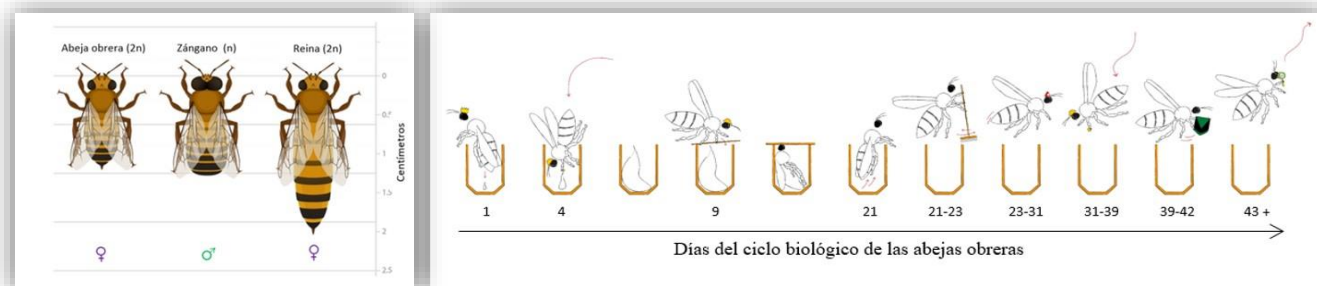


Figura 4.1. Estructura de una colonia de *Apis mellifera*. **Derecha:** castas sociales de abejas melíferas adultas: abeja obrera (hembra), abeja zángano (macho), y abeja reina (hembra fértil). **Izquierda:** ciclo biológico de una abeja obrera en días; 1: puesta del huevo; 4-9: larva; 9-21: cría operculada (larva y pupa); 21: emergencia de abeja adulta; 21-23: abeja limpiadora de celdas de cría; 23-31: abeja nodriza (cuidado de cría y producción de pan de abeja); 31-39: abeja de interior cerera y almacenadora de alimento (miel y polen); 39-42: abeja guardiana de la entrada de la colmena, 43+: abeja buscadora de alimento o pecoreadora. Fuentes: imagen derecha modificada con permiso de Ask A Biologist (<https://askabiologist.asu.edu/bee-colony-life>); imagen izquierda original.

4.3. MANEJO DE COLMENAS *in vivo*

En este trabajo se utilizaron colmenas experimentales del Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA-IRIAF, JCCM), que cuenta con al menos 8 apiarios experimentales (varía a lo largo de los años), con cerca de 300 colmenas de *A. m. iberiensis*. Dada la alta prevalencia de las nosemosis en la Península, la mayor parte de las colmenas están infectadas por *N. ceranae*. Sin embargo, dos apiarios situados a 16 km de Marchamalo, en la localidad de Valdeavero (40°38'30,88"N 3°22'4,15"W y 40°39'2,02"N 3°21'4,37W), se mantienen libres de microsporidios y se utilizaron como fuente de cuadros de cría de abejas no infectadas para los ensayos de laboratorio.

Estos apiarios se mantienen bajo un minucioso control sanitario, y son monitorizados periódicamente para mantenerlos libres de los principales patógenos que pueden afectar a las abejas melíferas, como *N. ceranae* y el ácaro *Varroa destructor*. Además se mantienen aislados de otros colmenares no controlados por el equipo científico del CIAPA, y que pudieran ser fuente de infección. Para el control de las nosemosis estos apiarios fueron tratados con anterioridad con fumagilina, y tras su prohibición se mantienen actualmente libres de las infecciones por *Nosema* spp. aplicando medidas zootécnicas para el control de la nosemosis (Rodríguez-García, 2017).

El control de la varroosis se realiza anualmente en todas las colmenas, independientemente del apiario, aplicando al menos un tratamiento en otoño, tal y como establece el Real Decreto 608/2006, de obligado cumplimiento en España.

4.4. MANEJO DE ABEJAS *in vitro*

Las abejas utilizadas para los ensayos desarrollados en laboratorio tuvieron tres objetivos principales:

1. Toma de muestras de abejas de diferentes edades para el estudio de la prevalencia de *Nosema* spp.,
2. Fueron requeridas para la obtención de esporas de *N. ceranae*, para lo cual se muestrearon abejas pecoreadoras altamente infectadas de forma natural,
3. En otro caso, fueron requeridas para ser infectadas experimentalmente bajo condiciones homogéneas y controladas, por lo que se muestrearon cuadros de cría de abeja de colmenas libres de microsporidios.

4.4.1. Muestreo de abejas adultas

Las abejas de interior se muestrearon de la cámara de cría (del primer cuadro sin cría), descartando las abejas de los cuadros más externos, mientras que las pecoreadoras se recogieron en la entrada de la colmena (piquera) al mediodía. Para ello, la entrada de la piquera se cerró temporalmente con una pieza de madera durante aproximadamente 15 minutos, de manera que las abejas se amontonaron en la entrada, y se barrieron con un cepillo apicultor al interior de una caja de cartón (Meana *et al.*, 2010). Las abejas se sacrificaron en el laboratorio con CO₂ (≥ 3 minutos), para ello las cajas de cartón (con las abejas en su interior) se introdujeron directamente en una cámara de inducción de anestesia veterinaria (**Figura 4.2**).

Las abejas pecoreadoras naturalmente infectadas para la obtención de esporas, se sacrificaron inmediatamente con CO₂ para proceder a la extracción y purificación de esporas de microsporidios en gradiente isotónico de Percoll[®] al 95% (Taupin *et al.*, 2006a; Higes *et al.*, 2008b; Martín-Hernández *et al.*, 2009. **Figura 4.2**).

Para la obtención de abejas libres de *Nosema* spp. de edad conocida, los cuadros de cría fueron mantenidos en el laboratorio en una incubadora (Memmert, UNB400) a la temperatura constante de 34°C \pm 1°C (**Figura 4.2**), que permite completar la metamorfosis de las pupas operculadas, y la emergencia de las abejas adultas. En todos los ensayos se utilizaron al menos 3 cuadros de cría de colmenas diferentes. A continuación, se siguió la metodología descrita por Higes *et al.* (2007) para manejo de abejas en laboratorio. Brevemente, las abejas recién nacidas (± 24 h) fueron extraídas de los

cuadros de cría proporcionando un golpe seco en el lateral del marco de manera, que facilita que las abejas se precipiten al interior de un recipiente, a partir del cual se repartieron una a una y aleatoriamente en jaulas específicas conteniendo entre 20-25 abejas, según el experimento.

Para facilitar el manejo de las abejas durante la inoculación de esporas de *Nosema* spp. (para su infección), previamente todas las abejas se anestesiaron con CO₂ durante un máximo de 90 segundos.

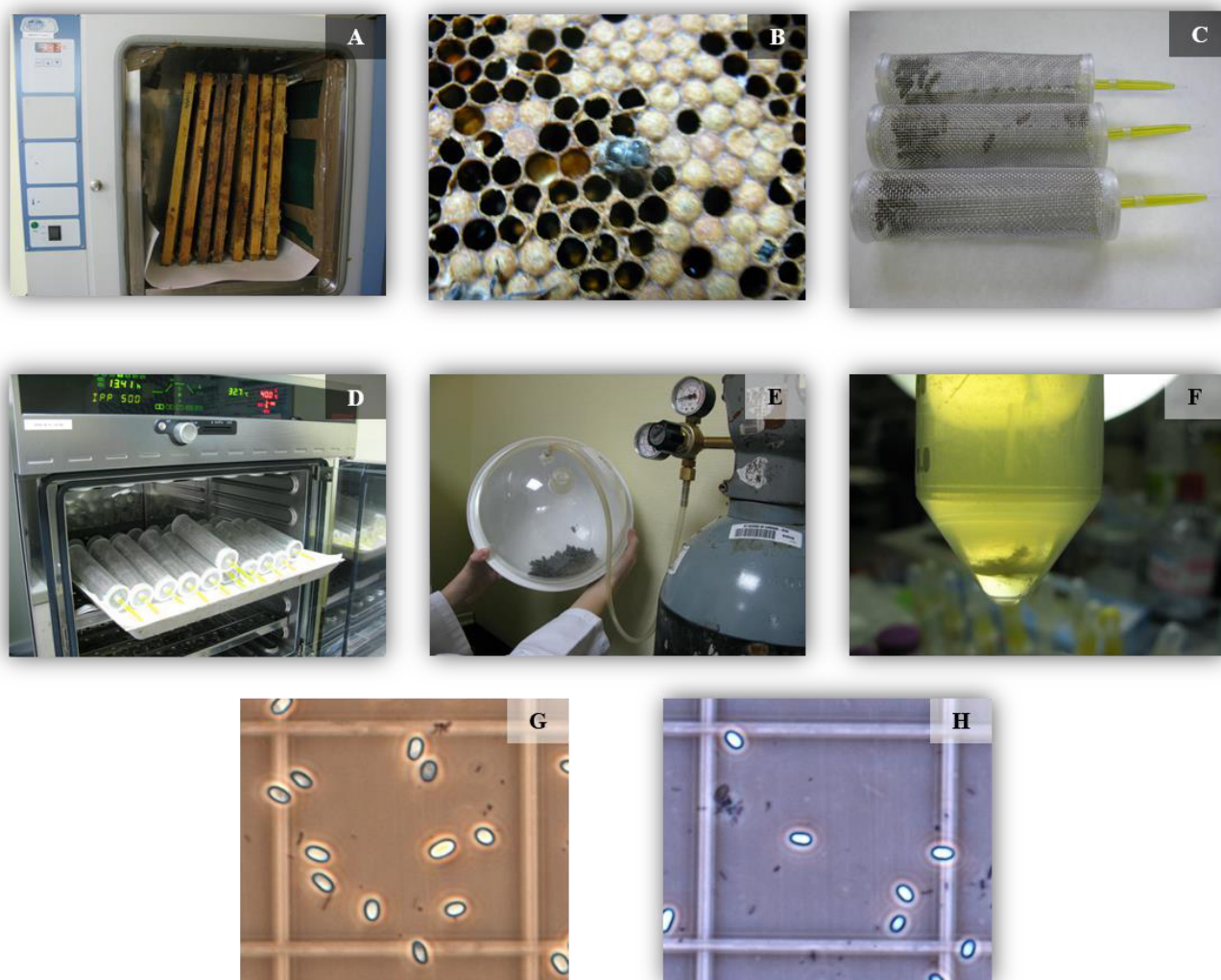


Figura 4.2. Manejo de abejas en el laboratorio. **A:** Incubadora a 34°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) con cuadros de cría de abejas libres de *Nosema* spp. **B:** Abeja emergiendo de la celda y rodeada de cría operculada. **C:** Las abejas se mantienen en jaulas de malla de acero, alimentadas *ad libitum* con una solución azucarada y rica en aminoácidos y vitaminas. **D:** Las jaulas con abejas se mantienen en incubadoras, a temperatura y humedad controladas. **E:** Cámara de inducción de anestesia veterinaria con abejas en su interior y detalle de la bomba de CO₂. **F:** esporas en un gradiente de Percoll[®] isotónico al 95% (en dH₂O) a razón 1:9 y centrifugadas 40 min a 11.000 g. **G-H:** recuento de esporas de *N. apis* (G) y *N. ceranae* (H) en un hemocitómetro Neubauer[®] y observadas bajo un microscopio óptico en contraste de fase (x40 y Ph2); detalle de una microcuadrícula (1/60) de recuento. Fuente: original.

4.4.2. Mantenimiento de las abejas enjauladas

Las jaulas fueron diseñadas para el mantenimiento de abejas vivas en laboratorio (**Figura 4.2**), son cilíndricas, de malla de acero (175 mm largo, 45 mm diámetro), con una tapa circular de metacrilato a cada lado (Martín-Hernández *et al.*, 2011). Las abejas enjauladas se mantuvieron en incubadoras a 33°C a lo largo de los ensayos.

El alimento se administró *ad libitum* en una punta de pipeta de 1 ml sellada por calor en uno de sus extremos, conteniendo una solución azucarada (50% azúcar + 50% agua) enriquecida con aminoácidos y vitaminas (2% Promotor L[®] -Calier Lab.; mezcla comercial de aminoácidos y vitaminas testada previamente en abejas) como sustitutivos de miel y polen.

Antes de cada ensayo, todo el material de cría de abejas en laboratorio, desde las incubadoras a las jaulas, se desinfectó previamente con alcohol al 70% y Extran[®] AP 12 (Merck Millipore, No. 107563).

4.5. CARACTERÍSTICAS SINGULARES DE LA REGIÓN APÍCOLA DE MESTREO

Todas las colmenas y abejas examinadas en la presente tesis se emplazaron en la comarca agraria de La Alcarria, una región Mediterránea, según la clasificación bioclimática de Rivas-Martínez (1987), situadas en localidades de los municipios de Marchamalo (40°40'50,40''N 3°12'31,05''W) y, en menor medida de Valdeavero, ambos en la provincia de Guadalajara (Castilla-La Mancha, España).

La región de Marchamalo, enclave del centro de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral (CIAPA, antiguo Centro Apícola Regional de Castilla- La Mancha), se encuentra catalogada dentro de la zona con alta tradición apícola de la Comarca de La Alcarria (Guadalajara-Cuenca), de atractivo internacional y reconocida como región característica del sector apícola desde el Siglo XVII (BOE-A-2010-19035, 2010).

CAPÍTULOS

5. Capítulo I - Chapter 1

Infección natural de estadios inmaduros de abeja por *Nosema* spp. y su relación con la parasitación en abejas adultas (p. 55)

The levels of natural Nosema spp. infection in Apis mellifera iberiensis brood stages. DOI: 10.1016/j.ijpara.2019.04.002.

6. Capítulo II - Chapter 2

La edad de las abejas obreras y el método experimental de infección con esporas de *Nosema ceranae* influyen en el desarrollo y curso de la enfermedad (p. 85)

Age and method matter when studying experimentally infected Nosema ceranae worker honey bees (Apis mellifera). Manuscript ID: insects-574839.

7. Capítulo III - Chapter 3

Patogenia de la infección con dosis bajas de *N. ceranae* (p. 105)

Pathogenesis of infection with low doses of N. ceranae: What are the effects over the course of the infection?. (Manuscript in prep.)

8. Capítulo IV - Chapter 4

Tropismo tisular de *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en abejas obreras (*Apis mellifera*) infectadas experimentalmente (p. 125)

Tissue tropism of Nosema apis and Nosema ceranae in experimentally infected worker honey bees (Apis mellifera). DOI: 10.1177/0300985819864302.



Chapter 1

Capítulo I

Infección natural de estadios inmaduros de abeja por *Nosema* spp. y su relación con la parasitación en abejas adultas

¿La parasitación natural de los microsporidios presentes en la Península Ibérica, afecta solo a los individuos adultos de la colmena?

Publicado en la revista "International Journal for Parasitology"

Aceptado: 10 abril 2019; DOI: 10.1016/j.ijpara.2019.04.002

Published in the International Journal for Parasitology

Accepted: 10.04.2019; DOI: 10.1016/j.ijpara.2019.04.002

*The levels of natural *Nosema* spp. infection in *Apis mellifera iberiensis* brood stages*

Co-authors: Urbieto-Magro A., Higes M., Meana A., Gómez-Moracho T., Rodríguez-García C., Barrios L., Martín-Hernández R.

Key words: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Microsporidia*, epidemiology, brood infection.

5.1. RESUMEN

Nosema ceranae es el endoparásito más prevalente de *Apis mellifera iberiensis* y representa un importante problema de salud para las abejas en todo el mundo. La capacidad infectiva de *N. ceranae* se ha demostrado experimentalmente en la cría de abeja melífera. Sin embargo, hasta el momento no se disponen de datos sobre su prevalencia en condiciones naturales de campo.

En este estudio se han analizado los cuadros de cría de diez colmenas diferentes durante dos años consecutivos, tomándose muestras en dos momentos importantes del calendario apícola: antes y después de la invernada. Se analizaron individualmente un total de 1.433 estadios inmaduros (larvas/pupas). Una primera detección molecular de los microsporidios en las muestras de cría de abeja mediante PCR convencional mostró que *N. ceranae* fue el agente más frecuentemente detectado con una prevalencia de 3,53% a lo largo del estudio, mientras que *N. apis* tuvo una prevalencia individual de 0,42% y fue detectado con mayor frecuencia en muestras que presentaban ambos microsporidios (co-detección) con una prevalencia de 0,71%. La multiplicación activa de los patógenos se analizó en las muestras positivas por PCR mediante PCR en tiempo real. Para ello se analizó la expresión del gen de la *proteína del tubo polar 3* de *N. ceranae* y/o del gen de la *proteína ARN polimerasa II* de *N. apis*. Lo que representaba el 24% de las muestras de cría previamente positivas para *Nosema* spp. La multiplicación de *N. ceranae* se confirmó en el 1,06% de las muestras, mientras que la multiplicación de *N. apis* solo se confirmó en co-infección con *N. ceranae* (0,07%).

Con el fin de analizar las posibles vías naturales de infección de los estadios inmaduros, durante el segundo año de estudio, se analizaron las celdas de cera que alojaban a las muestras de cría para detectar la presencia de *Nosema* spp. en el ambiente inmediato donde se desarrollan. En todos los casos estudiados las muestras de cría infectadas por *Nosema* spp. se encontraron en celdas en las que no se detectaron microsporidios, mientras que las celdas que fueron positivas para *N. ceranae* albergaron fases de cría que no estaban aparentemente infectadas, lo que indica que es poco probable que esta sea la vía principal de infección. Finalmente, se analizó la relación de la prevalencia de cría infectada con la de las abejas adultas en las mismas colmenas. Las colmenas con cría infectada por *N. ceranae* mostraron niveles más altos de abejas adultas infectadas, aunque las diferencias no fueron significativas antes ($P=0,260$), durante ($P=0,055$) o después ($P=0,056$) del muestreo de los estadios inmaduros.

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que *N. ceranae* y *N. apis* son parásitos no solo de todas las castas de abejas adultas, sino que también son capaces de infectar cría en diferentes estados de desarrollo. Estos resultados son de un gran interés veterinario y deben tenerse en cuenta a la hora de estudiar la epidemiología de la enfermedad y sus métodos de control.

SUMMARY

Nosema ceranae is the most prevalent endoparasite of *Apis mellifera iberiensis* and it is a major health problem for bees worldwide. The infective capacity of *N. ceranae* has been demonstrated experimentally in honey bee brood, yet no data are available about its prevalence in brood under natural conditions. Thus, brood combs from ten different hives were analyzed over two consecutive years, taking samples before and after winter. A total of 1,433 larvae/pupae were analyzed individually and *N. ceranae* (3.53%) was the microsporidia most frequently detected, as opposed to *N. apis* (0.42%) that was more frequently detected in conjunction with *N. ceranae* (0.71%).

The active multiplication of both microsporidia was confirmed by the expression (rt-PCR) of the *N. ceranae polar tube protein 3* gene and/or the *N. apis RNA polymerase II* gene in 24% of the brood samples positive for *Nosema* spp., both genes related to microsporidia multiplication. As such, *N. ceranae* multiplication was confirmed in 1.06% of the samples, while *N. apis* multiplication was only observed in co-infection with *N. ceranae* (0.07%). Brood-cells were analyzed for the presence of *Nosema* spp. as the immediate environment where the brood stages develop. The brood samples infected by *Nosema* spp. were in brood-cells in which that microsporidia was not detected, while brood-cells positive for *N. ceranae* hosted brood stages that were not apparently infected, indicating that this is unlikely to be the main pathway of infection.

Finally, the colonies with brood infected by *N. ceranae* showed a higher level of adult bees infected although the differences were not significant nor before ($P= 0.260$), during ($P= 0.055$) neither after ($P= 0.056$) brood sampling. These results show that *N. ceranae* is a bee parasite ubiquitous to all members of the colony, irrespective of the age of the bee. It is also of veterinary interest and it should be considered when studying the epidemiology of the disease.

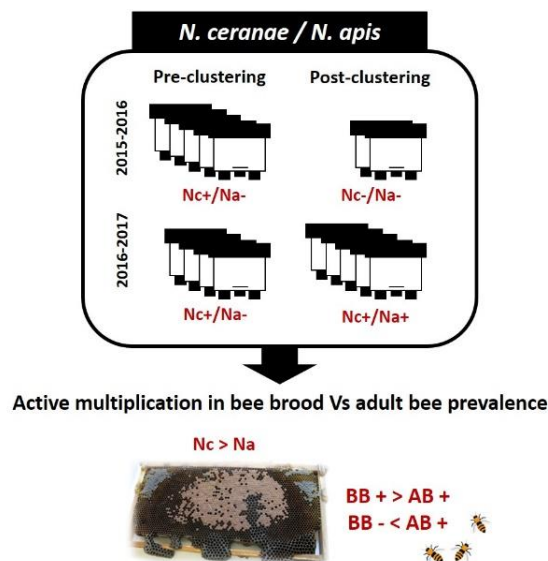


Figura 5.1. Graphical abstract: *The levels of natural Nosema spp. infection in Apis mellifera iberiensis brood stages*

5.2. ANTECEDENTES

Las nosemosis se consideran enfermedades de abejas adultas. No obstante, la detección de esporas y de ADN de microsporidios en la cera y la jalea real (Cox-Foster *et al.* 2007; Traver y Fell, 2012; MacInnis, 2017) apoyan la posibilidad de que los individuos inmaduros estén expuestos a los microsporidios través de su alimentación.

Estudios experimentales recientes en condiciones de laboratorio, han demostrado que *N. ceranae* puede multiplicarse en pupas inoculadas previamente durante el estadio larvario (Eiri *et al.*, 2015), demostrando que, además, la infección puede producir una serie de problemas patológicos en las abejas resultantes tras la metamorfosis y consecuentemente sobre el equilibrio de la colonia (Eiri *et al.*, 2015; Benvau y Nieh, 2017).

El objetivo de este trabajo fue determinar si la infección de los estadios inmaduros de abeja (larvas y pupas) se produce de forma natural y evaluar la prevalencia en cría respecto a la de las abejas adultas de la misma colonia, así como las posibles vías de trasmisión a la cría.

5.3. HIPÓTESIS

La alta prevalencia de la nosemosis en las colonias facilita que las abejas se expongan a la infección durante su desarrollo como estadios inmaduros y por tanto la infección puede producirse durante las fases de larva y pupa (por contaminación de la celdilla o por el alimento contaminado) y desarrollarse durante la metamorfosis. Esta posibilidad, por tanto, estaría relacionada con la prevalencia de la infección en las abejas adultas y con el desarrollo de la colonia según el periodo apícola.

5.4. MATERIAL Y MÉTODOS

5.4.1. Colmenas

Para este estudio se utilizaron diez colmenas de *Apis mellifera iberiensis* ubicadas en un colmenar experimental del CIAPA. Se realizaron dos estudios consecutivos entre los años 2015 y 2017, utilizando cinco colmenas en cada ensayo. Las colmenas H1 a H5 fueron incluidas en el primer estudio (Ensayo 1: 2015-2016) y las colmenas H6 a H10 en el segundo (Ensayo 2: 2016-2017). Todas ellas dieron positivo a *N. ceranae* en análisis de ADN previos con abejas pecoreadoras (Martín-Hernández *et al.*, 2012).

5.4.2. Muestreo de la cría de abeja

Los momentos de muestreo se indican en la **Tabla 5.1**. Las muestras de cría de abeja (BB: *bee brood*, por sus siglas en inglés) se analizaron antes y después de la formación de la piña invernal, para lo cual se tomó un cuadro de cría de cada colmena en octubre de 2015 y febrero de 2016 (Ensayo 1; colmenas H1-H5) y en noviembre de 2016 y marzo de 2017 (Ensayo 2; colmenas H6-H10).

A pesar de utilizar diferentes meses de muestreo en los dos ensayos, las muestras se recogieron en el mismo momento de la actividad apícola: antes de la formación de la piña invernal (Pre-invernada; octubre/noviembre) y después de la formación de la misma, en el momento en el que las primeras pecoreadoras comenzaron a salir de las colmenas (Post-invernada; febrero/marzo). Los cuadros de cría se recogieron en el colmenar experimental y se transportaron inmediatamente al laboratorio, donde se congelaron a -80°C hasta su análisis.

	Ensayo 1							Ensayo 2					
	Pre-invernada			Post-invernada				Pre-invernada			Post-invernada		
	Sep-15	Oct-15	Nov-15	Ene-16	Feb-16	Mar-16	Abr-16	Oct-16	Nov-16	Dic-16	Mar-17	May-17	Jul-17
Crías de abeja (BB)		x			x				x		x		
Ab. de interior (INT)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ab. pecoreadoras (PEC)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Celdas de cría									x		x		
Colmenas ID	H1-H5							H6-H10					

Tabla 5.1. Diseño del muestreo. Meses en los que se tomaron muestras de cría de abeja (BB), abejas adultas de interior (INT), pecoreadoras (PEC) y muestras de las celdas ocupadas previamente por las crías.

En la **Tabla 5.2** se detalla el número total de muestras analizadas en el estudio, que incluyeron todas las etapas de desarrollo inmaduro desde larvas recién operculadas y todos los estadios de pupa, hasta abejas adultas pre-emergentes, todavía operculadas. De cada cuadro de cría disponible, se analizaron en cada momento de muestreo un total de 90 muestras de cría. Después de la invernada en el Ensayo 1, tres colmenas habían muerto (H1, H3 y H4) y, por lo tanto, solo se tomaron cuadros de cría de las colmenas supervivientes. Asimismo, la colmena H7 mostró evidentes signos de debilitamiento en noviembre de 2016 (Ensayo 2) sin cría abundante (presencia de tan solo 2 cuadros de cría), por lo que no se extrajo ningún cuadro en dicho momento de muestreo para no contribuir con el debilitamiento.

Año	Colmenas	Temporada	BB	Celdas	INT	PEC	AA
2015-2016	H1-H5	Pre-invernada	447	-	350	300	650
		Post-invernada	179	-	225	175	400
2016-2017	H6-H10	Pre-invernada	360	77	1.125	500	1.625
		Post-invernada	447	87	1.625	1.400	3.025
TOTAL	H1-H10	Estudio	1.433	164	3.325	2.375	5.700

Tabla 5.2. Número de muestras analizadas en el estudio. BB: muestras de cría en diferentes estadios de desarrollo; Celdas (Ensayo 2): celdas donde se desarrolla la cría de abeja hasta su emergencia como abeja adulta; INT: abejas adultas de interior (jóvenes); PEC: abejas adultas pecoreadoras (mayores); AA: abejas adultas totales (INT + PEC).

Para tomar las muestras de los estadios inmaduros, los cuadros de cría congelados se atemperaron lo suficiente como para poder cortarlos cuidadosamente y extraer individualmente a las larvas y pupas de sus celdas evitando su completa descongelación. Las muestras de cría se seleccionaron aleatoriamente en el área de puesta de la reina (elipse de cría), tratando de incluir la mayor parte de las etapas de desarrollo presentes en los cuadros de cría (**Figura 5.2**). Cada muestra fue extraída asépticamente de la celda, una por una, con la ayuda de un par de palillos de madera y pinzas estériles para abrir el opérculo completamente y romper la pared de las celdas.

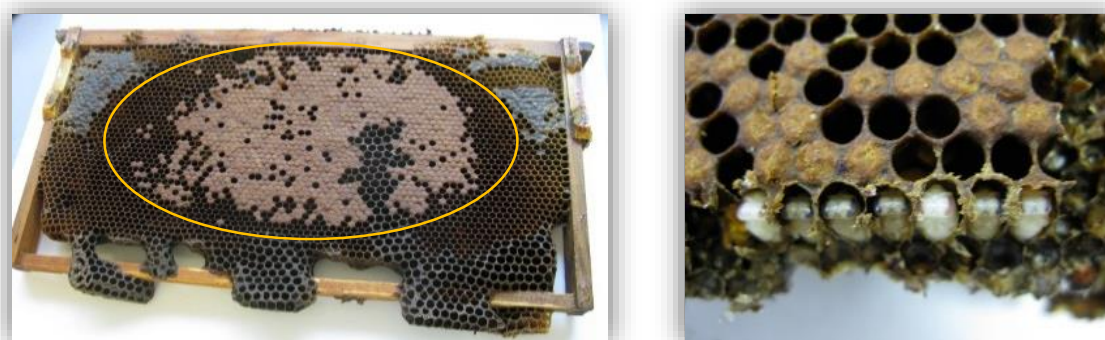


Figura 5.2. Área de puesta de la abeja reina. **Izquierda:** la reina tiende a colocar la puesta de huevos siguiendo un patrón circular-ovalado, o lo que es lo mismo, siguiendo un patrón en elipse; comenzando desde el centro del cuadro de cría hacia fuera. **Derecha:** cuando las crías maduras emergen dejando las celdas vacías, la reina tiende a volver a utilizarlos, de modo que se pueden encontrar diferentes etapas de desarrollo a lo largo de la elipse en un mismo cuadro de cría. Los cuadros de cría se sitúan en el centro de la colmena, esta predilecta posición proporciona una temperatura constante más alta ($\pm 34^{\circ}\text{C}$) y protección para el correcto desarrollo de las abejas. Fuente: original.

A continuación, se extrajeron las muestras evitando cualquier contaminación externa con esporas de *Nosema* spp. fuera de la celda de maduración. Las muestras se descartaron cuando las larvas

o pupas entraron en contacto con la superficie externa del cuadro o de celdas y crías adyacentes. Para eliminar cualquier espora de la superficie de las muestras recién extraídas, cada cría se lavó adecuadamente con H₂O milliQ® a presión utilizando una pipeta *Pasteur* estéril.

Las muestras de cría fueron clasificadas visualmente en 7 grupos de acuerdo a su etapa de desarrollo o tiempo post-operculación (tpo) y atendiendo principalmente al color del abdomen y de la unión de los apéndices, y al color de los ojos y su intensidad (Human *et al.*, 2013). Los 7 grupos resultantes se muestran en la **Tabla 5.3** y un ejemplo visual de cada caracterización se muestra en la **Figura 5.3**.

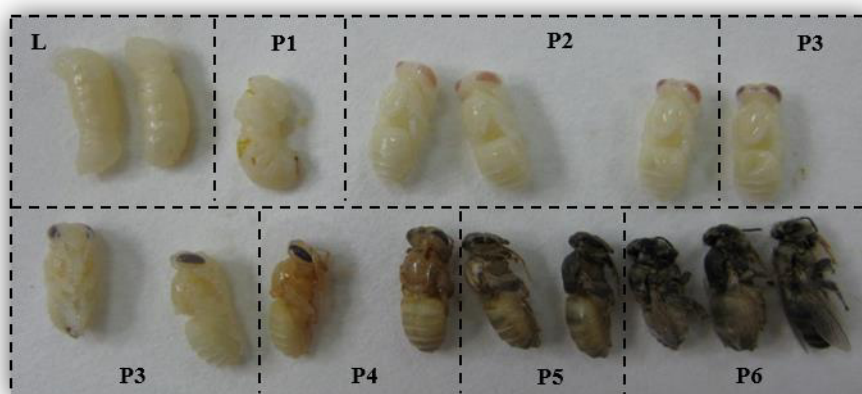


Figura 5.3. Clasificación de las muestras de cría según su etapa de desarrollo por reconocimiento visual. L: larvas post-operculación; P1-P6: pupas en diferentes etapas de desarrollo o tiempo post-operculación (tpo). Único ejemplar de P1 en la figura presenta restos de cera adheridos al cuerpo. Fuente: original.

Etapa de desarrollo	Características	Edad (tpo)
L	Larva operculada completamente blanca, estirada y estriada	2-3 días tpo
P1	Pupa con cuerpo y ojos completamente blancos	4 días tpo
P2	Pupa con cuerpo blanco y ojos rosados	5-6 días tpo
P3	Pupa con unión de apéndices y alas de color amarillo-marrón y ojos rosado-púrpura oscuro	7-8 días tpo
P4	Pupa con tórax amarillo y ojos morado muy oscuro	9 días tpo
P5	Pupa con almohadillas de alas grises y ojos negros	10-11 días tpo
P6	Abeja adulta pre-emergente completamente formada	12 días tpo

Tabla 5.3. Clasificación de las muestras de cría según su etapa de desarrollo mediante reconocimiento visual y siguiendo las indicaciones de la guía COLOSS de Human *et al.* (2013).

5.4.3. Muestreo del contenido de las celdas de cría

Las celdas de los cuadros de cría se examinaron durante el segundo ensayo con el fin de evaluar la presencia de esporas de *Nosema* spp. (**Tabla 5.1**), lo que indicaría una posible contaminación en el espacio donde se desarrolla la cría. Después de haber extraído cuidadosamente los ejemplares de cría, se tomaron muestras de alrededor de 20 celdas por cuadro de cría analizado. Para ello, se dejó resbalar lentamente 100 µl de agua de destilación doble (ddH₂O; calidad de PCR) por las paredes de la celda hexagonal, que posteriormente se recuperó del fondo con la misma pipeta *Pasteur* estéril (una por cada muestra de celda). Se analizaron un total de 164 celdas: 77 celdas de 4 colmenas antes de la invernada y 87 celdas de las 5 colmenas después de la invernada (**Tabla 5.2**). Como ya se ha mencionado, de la colmena H7 antes de la invernada (noviembre de 2016), no se disponía de muestras por encontrarse muy debilitada.

5.4.4. Muestreo de abejas adultas

En la **Tabla 5.1** se detallan los momentos de muestreo de las abejas adultas de interior (INT) y pecoreadoras (PEC) a lo largo de los 2 años de duración del estudio. En el Ensayo 1, se tomaron 25 INT y 25 PEC por colmena en siete puntos temporales entre septiembre de 2015 y abril de 2016. Durante el Ensayo 2, con el fin de aumentar el límite de detección de *Nosema* spp. el tamaño de la muestra se incrementó, por lo que se recogieron 100 INT y 100 PEC por colmena en seis puntos temporales entre septiembre de 2016 y julio de 2017, excepto en noviembre de 2016, momento en el que solo se recogieron 25 INT. El número total de abejas obreras muestreadas se detalla en la **Tabla 5.2**. En el apartado 4.4.1 se indica el procedimiento para el muestreo de abejas adultas (INT y PEC). Durante la formación de la piña invernal, en los meses más fríos de otoño e invierno, no se muestrearon abejas pecoreadoras dado que en el momento del muestreo no había actividad de pecoreo (H1: Nov. 2015 y Ene. 2016; H4: Nov. 2015; H6-H10: Nov. y Dic. 2016).

5.4.5. Procesamiento de muestras y extracción de ácidos nucleicos

a) Muestras de cría

Tras ser identificadas, cada muestra de cría se maceró adaptando un protocolo similar anteriormente descrito (Cepero *et al.*, 2014). Cada una se introdujo individualmente en un pocillo de una placa de 96 pocillos (Deepwell-96 plate, Deltalab, No. 409004) que contenía 180 µl de una solución tampón de AL[®] (Qiagen, No. 1014600) al 60%, 1 µg/ml de *RNA Carrier*[®] (Qiagen, No. 148037710) y cuatro bolas de vidrio de 2 mm (Sigma[®]). Uno de cada 20 pocillos se utilizó como control negativo de extracción

(añadiendo H₂O milliQ[®] y 60% AL[®], sin ejemplar de cría). Las placas se agitaron a 30 Hz durante 6 minutos (TyssueLyser II, Qiagen[®]).

Del macerado de cría resultante, 180 µl se transfirieron individualmente a una nueva placa multipocillo (Eppendorf[®], No. 0030128.575) que contenía 200 µl de tampón AL[®] al 60% y 20 µl de proteasa (suministrada con el kit comercial *BioSprint[®] 96 DNA Blood*, Qiagen[®]) y se incubaron durante 10 minutos a 70°C y 300 revoluciones por minuto (rpm). La extracción de ácidos nucleicos totales (AN) se realizó utilizando el kit comercial *BioSprint[®] 96 DNA Blood* (Qiagen[®], No. 940057) y siguiendo el protocolo *BS96 DNATissue[®]* (Qiagen[®]) en una estación de trabajo *Biosprint[®] 96* (Martín-Hernández *et al.*, 2012). El volumen de elución final fue de 100 µl de extracto de AN.

Inmediatamente después de la extracción, se tomó una alícuota de 25 µl de la muestra y el resto (75 µl) se congeló hasta su uso. La alícuota de 25 µl se transfirió a una nueva placa multipocillo y se trató con *Free-RNasa DNasa I* (Qiagen[®], N° 79254). Siguiendo las instrucciones de uso; se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y, para desactivar la enzima, se incubó a 70°C durante 20 minutos en agitación a 300 rpm, con el fin de eliminar completamente el ADN genómico de la muestra, quedando exclusivamente el ARN. Este se utilizó para generar el ADN complementario de primera cadena (ADNc) con el kit comercial *iScript[™] cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, No. 1708891), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (reacción a 25°C durante 5 minutos, 46°C durante 20 minutos y 95° C durante 1 minuto) en un termociclador *Mastercycler[®] ep gradiente S* (Eppendorf). El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su análisis. En todos los pasos se incluyeron controles negativos de extracción y síntesis de ADNc (NTC: *no template control*, sin muestra), y controles de la reacción de retro-transcripción (RTC: con muestra y reactivos, pero sin enzima retro-transcriptasa).

b) Muestras de las celdas ocupadas por muestras de cría

El ddH₂O (100 µl) recuperado del fondo de las celdas (sección 5.4.3) se introdujo individualmente en un pocillo de una placa *Deepwell-96* que contenía 100 µl de tampón AL[®] al 50% y 1 µg/ml de *RNA Carrier[®]* (Cepero *et al.*, 2014). A continuación, las placas se procesaron de la misma manera que las de las muestras de cría (sección 5.3.5.a) y, de nuevo, se incluyó en la placa un pocillo sin muestra (NTC) cada 20 muestras de celdas como control negativo.

c) Muestras de abejas adultas

El abdomen de cada abeja adulta (INT y PEC) se maceró individualmente en un pocillo de una placa *Deepwell-96* que contenía 180 µl de tampón AL[®] al 50%, 1 µg/ml de *RNA Carrier[®]* y 4 bolas de vidrio,

trabajando siempre sobre hielo. Las muestras del Ensayo 1 se procesaron hasta la extracción de AN como se describe en el apartado 5.3.5.a (incluyendo un control NTC cada 20 muestras).

Sin embargo, el ADN de las muestras de abejas adultas recogidas en el Ensayo 2 se extrajo utilizando un método diferente: 50 µl del macerado se transfirió a una nueva placa multipocillo con 50 µl de una solución de Tris-HCl (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) y 15 µl de Proteínasa K (Qiagen®, No. 1019499) y se incubó durante 20 minutos a 95 °C. Este método tiene un límite de detección para *Nosema* spp. similar al utilizado para las muestras de abejas adultas del Ensayo 1 y de cría (Ensayos 1 y 2), siendo más rápido y barato (Rodríguez-García *et al.*, 2014). Se incluyeron NTCs como en los casos anteriores.

5.4.6. Detección por PCR de *Nosema* spp. en las muestras de cría de abeja, abejas adultas y muestras de celda de la cría

La presencia de las especies de *N. apis* y *N. ceranae* se evaluó en todas las muestras mediante una PCR convencional triplex, incluyendo la detección de ADN de *A. mellifera* como control interno (IPC) para las reacciones de PCR, tal y como ha sido descrito anteriormente (Martín-Hernández *et al.*, 2012).

En este caso, se utilizaron placas gelificadas comerciales (Biotools®) de 96 pocillos, conteniendo la enzima *HotSplit DNA polimerasa* (1 U/µl: Biotools®, cod. 10.531-10.533), 0,4 µM de cada cebador (*primer*), 0,2 mg/ml de albúmina de suero bovino (más conocida por sus siglas en inglés, BSA) y 0,1% Tritón™ X-100. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, añadiendo en cada pocillo 22,5 µl de H₂O de PCR y 2,5 µl de ADN por muestra (muestra de extracto total de AN). Los cebadores utilizados en la PCR convencional se muestran en la **Tabla 5.4**.

Organismo	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Referencia	Amplicón
<i>N. ceranae</i>	218MITOC	F: cggCGACGATGTGATATGAAAATATTA R: cccggTCATTCTCAAACAAAAACCG	[2007]	218–219 bp
<i>N. apis</i>	321APIS	F: ggggGCATGTCTTTGACGTACTATGTA R: gggggGCGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG	[2007]	321 bp
<i>A. mellifera</i>	COI	F: gggTCCAAGACCAGGAACCTGGAT R: gcgCGGAAATTCCTGATATATGAAGAGAAAA	[2012]	119 bp

Tabla 5.4. Cebadores de la triplex-PCR en placas gelificadas Biotools®. Cebadores: 218MITOC (locus del gen *16S rRNA* de *N. ceranae*); 321APIS (locus del gen *16S rRNA* de *N. apis*) y COI (gen de la subunidad I de la *Citocromo Oxidasa* de *A. mellifera*) utilizado como control interno de la PCR (IPC). En cada par de cebadores: F *-forward-* y R *-reverse-*. [2007]: Martín-Hernández *et al.*, 2007. [2012]: Martín-Hernández *et al.*, 2012. Amplicón: tamaño del fragmento amplificado indicado en número de pares de bases (bp).

El límite de detección de este método es 2,5 esporas de *N. ceranae* y/o 25 esporas de *N. apis* en 150 µl de macerado de abeja, similar a la descrita anteriormente (Martín-Hernández *et al.*, 2012). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® *ep gradient S* (Eppendorf). Los fragmentos amplificados obtenidos de la PCR se revelaron utilizando un aparato de electroforesis capilar (QIAxcel Advanced System®, Qiagen) utilizando el paquete comercial de cribado de ADN *QIAxcel DNA Screening Resolution*® (Qiagen, No. 929004). Se aplicó el método AM420 (toma de muestra 10 segundos a 5 KV, separación 420 segundos a 5 KV), con marcadores de alineamiento *QX 15 bp/1kb* (Qiagen®, No. 929521) y marcadores de peso molecular *QX 50-800pb* a una concentración de 20 ng/µl (Qiagen®, No. 929556). Los electroferogramas resultantes se analizaron con el sistema *BioCalculator 3.0* (Qiagen®) y todas las muestras que generaron un fragmento de la longitud esperada y produjeron ≥ 0.1 unidades fluorescentes relativas (RFU) fueron consideradas positivas. Se analizaron paralelamente controles positivos de *N. apis* y *N. ceranae*, y controles negativos (procedentes de la extracción de ADN -NTC- y sin muestra en la PCR) incluyéndolos en cada placa de reacción para detectar posibles contaminaciones o fallos de amplificación y/o lectura de las placas.

5.4.7. Multiplicación de *Nosema* spp. en las muestras de cría (rt-PCR)

Las muestras de cría que resultaron positivas a *Nosema* spp. por tripex-PCR (sección 5.3.6) se analizaron de nuevo por PCR en tiempo real (rt-PCR, *real-time-PCR*), para determinar si la detección se correspondía a una infección activa que indicase la multiplicación de *Nosema* spp., o si se debía únicamente a la presencia de esporas inactivas.

Para ello se seleccionaron genes de copia única. En el caso de *N. ceranae* se seleccionó el gen que codifica la *proteína del túbulo polar 3 (PTP3)* y para *N. apis* el gen que codifica la *subunidad mayor de la proteína ARN polimerasa II (RPB1)*. Ambos genes fueron seleccionados por estar relacionados con fases esporogoniales (Brosson *et al.*, 2006) o de transcripción (Katinka *et al.*, 2001) y con procesos de maduración de proteínas (Belkorchia *et al.*, 2017) y, por lo tanto, por estar relacionados con la multiplicación activa de los microsporidios. La detección del ARNm de estos genes mediante rt-PCR, significa que los microsporidios se están multiplicando y por consiguiente que la infección es productiva en las muestras de cría positivas.

Para el diseño de los cebadores se buscaron zonas conservadas sobre las secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se alinearon utilizando el programa bioinformático (*software*) de libre acceso *BioEdit® Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999). Los cebadores y las sondas (UPL, Roche®) para *N. ceranae-PTP3* y *N. apis-RPB1* se diseñaron utilizando el software de libre acceso *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (https://lifescience.roche.com/en_es/brys/universal-probe-library.html#assay-design-center). La especificidad teórica de cada par de cebadores y sonda se verificó *in silico* con el programa BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Además, la especificidad de los cebadores de nuevo diseño se probó *in vitro* mediante análisis cruzados de muestras de ADN de *N. apis* amplificadas con los cebadores de NC-PTP3 y con muestras de ADN de *N. ceranae* amplificadas con los cebadores de NA-RPB1. Para el diseño de las reacciones de rt-PCR se siguieron las directrices de la guía de buenas prácticas *MIQE* (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*, Bustin *et al.*, 2009).

Además, todas las muestras analizadas por rt-PCR se analizaron también para determinar la expresión del gen β -actina de *A. mellifera* para comprobar la integridad del ARNm y la correcta síntesis de ADNc (a modo de IPC).

Se utilizaron los cebadores y sondas descritos anteriormente por Martín-Hernández *et al.*, (2017). Nuevamente, los controles sin muestra (NTC) y sin transcripción inversa (RTC) se analizaron en paralelo, dentro de todas las placas y en cada reacción. Las secuencias de los cebadores y las sondas utilizados en las reacciones de rt-PCR se muestran en la **Tabla 5.5**.

Organismo	Cebador ID	Secuencia (5' - 3')	Referencia	Amplicón	Referencia del <i>GenBank</i>
<i>N. ceranae</i>	NC-PTP3	F: TGCTGATGTTATGGCTACAGAAG R: TACAGATTGCGCTGCTTTAA P: GCCAGGAA (UPL #72)	<i>Este estudio</i>	90 bp	XM_002996713.1. <i>Nosema ceranae</i> BRL01 hypothetical protein (NCER_100083) mRNA, complete cds
<i>N. apis</i>	NA-RPB1	F: CCCGAATGGTTAATTTGACTG R: TCCCTCCATAACAATAGAAGGTCT P: CTCCTCCT (UPL #73)	<i>Este estudio</i>	71 bp	DQ996230.1. <i>Nosema apis</i> RNA polymerase II largest subunit (RPB1) gene, partial cds
<i>A. mellifera</i>	β -actina	F: GTATGCCAACACTGTCCTTTCTG R: AAGAATTGACCCACCAATCCA P: CCTAGCACCATCCACCATGAAAATT AAGATCATC	[1]	159 bp	AB023025.1. <i>Apis mellifera</i> mRNA for actin

Tabla 5.5. Cebadores y sondas de la rt-PCR utilizada. NC-PTP3: gen de la *proteína del túbulo polar 3* de *N. ceranae*; NA-RPB1: gen de la subunidad mayor de la proteína *ARN polimerasa II* de *N. apis*. β -actina: [1] Martín-Hernández *et al.*, 2017. Cebadores: F *-forward-* y R *-reverse-*; Sonda: P *-probe-*. Amplicón: tamaño del fragmento amplificado indicado en número de pares de bases (bp).

Todas las reacciones de rt-PCR se realizaron en un termociclador LightCycler® 480 (Roche) utilizando *LightCycler® 480 Probes Master Mix* (Roche) en un volumen final de 20 μ l, con los cebadores a 500 nM y sondas a 10 nM. El programa de rt-PCR consistió en un paso inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 6°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 segundo cada uno, y un paso final de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. Cada ciclo de amplificación se analizó con el software LightCycler® 480 v1.5.1 (*Roche Diagnostics*) determinando el punto de corte con el umbral Cp (*Crossing point*), a través del algoritmo estadístico de Máximo de la 2ª derivada

(*Second derivative Maximum*) en todas las muestras. Cualquier valor de Cp por encima del nivel umbral se interpretó como multiplicación activa de *N. ceranae* y/o *N. apis*, mientras que la no amplificación (ningún valor de Cp) se consideró como la ausencia de replicación de los microsporidios.

5.4.8. Validación de la multiplicación de *Nosema* spp.

Para comprobar que efectivamente la detección por rt-PCR de la expresión de *PTP3* y *RPB1* se correspondía con la multiplicación de los microsporidios, se llevó a cabo una prueba de validación en la que se analizó la expresión de los mismos genes en muestras de esporas ambientales de *N. ceranae* (n=6) y *N. apis* (n=5).

Las esporas de *N. ceranae* se obtuvieron a partir del macerado de abejas de colmenas infectadas naturalmente, mientras que las esporas de *N. apis* analizadas se tomaron de muestras antiguas almacenadas (*stocks*) y mantenidos a 4°C en el CIAPA. Todas las muestras de esporas se purificaron aplicando la metodología descrita en detalle en la sección 6.4.2 (Capítulo II), con un gradiente de Percoll® isotónico al 95%. Las especies de *Nosema* de cada muestra se confirmaron por triplex-PCR, utilizando las placas gelificadas descritas en la sección 5.4.6. Del mismo modo, la homogenización de las esporas previa a la extracción del AN totales (ADN y ARN), así como el tratamiento de 25 µl del producto de extracción con DNasa y la generación de ADNc se llevó a cabo tal y como se describe en la sección 5.4.5.a. Nuevamente se incluyeron los controles de extracción (sin esporas, NTC).

En este caso, una alícuota de todas las muestras se procesaron sin la enzima de retro-transcripción inversa, con el fin de verificar que el tratamiento con DNasa funcionó eficientemente, eliminando completamente el ADN genómico en las muestras.

Todas las muestras se analizaron por duplicado y las reacciones de rt-PCR se desarrollaron tal como se describe en la sección 5.4.7.

5.4.9. Niveles de parasitación y análisis estadístico

Las prevalencias de muestras de cría y de abejas adultas de interior y pecoreadoras infectadas naturalmente por *Nosema* spp. fueron analizadas para cada ensayo (Ensayo 1 y Ensayo 2) y punto de muestreo (pre- y post-invernada) y para el estudio de dos años de duración. La prevalencia de infección media en las abejas adultas (AA) se calculó determinando la media de la prevalencia en INT + PEC en cada colmena.

Además, se comparó la distribución de la prevalencia total de los microsporidios en BB (n=54) en cada punto analizado (cuatro niveles: año y estación) empleando pruebas no paramétricas (prueba de Kruskal-Wallis), al no cumplirse los supuestos básicos de las pruebas paramétricas (normalidad).

Considerando solo la infección por *N. ceranae* (n=19), las colmenas se dividieron en dos grupos; un primer grupo de colmenas en las que se detectó cría infectada y un segundo grupo de colmenas negativas a la infección por *N. ceranae* en la cría. La prevalencia de infección en AA fue comparado entre ambos grupos utilizando el estadístico de la prueba de Mann-Whitney.

Un valor $P < 0,05$ se consideró significativo. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software IBM SPSS Statistics V24.

5.5. RESULTADOS

Los resultados de todos los controles negativos analizados en este estudio (NTC de extracción, RTC de retro-transcripción y controles negativos de PCR y rt-PCR) no produjeron amplificación, indicando la ausencia de contaminación en cada paso del proceso. Los controles positivos de *N. apis* y *N. ceranae* mostraron el tamaño de amplicón esperado.

5.5.1. Prevalencia de *Nosema* spp. en la cría

Nosema ceranae se detectó con mayor frecuencia que *N. apis* en la cría de *A. m. iberiensis* bajo condiciones naturales de campo. Todas las colmenas de estudio fueron positivas a *N. ceranae* a lo largo del estudio y solo 4 colmenas antes de la invernada y 3 colmenas después de la invernada fueron positivas a *N. apis*.

5.5.2. Detección por PCR convencional

En este estudio de dos años de duración, se analizaron un total de 1.433 muestras de cría, cubriendo todas las etapas del desarrollo de las abejas (N=1.433, **Tabla 5.6**), desde larvas recientemente operculadas (L; 2-3 días tpo) hasta abejas adultas pre-emergentes (P6; 12 días tpo). La amplificación del IPC indicó una correcta extracción y buena conservación de ADN en 1.418 de las 1.433 muestras de cría analizadas y, por lo tanto, solo estas muestras fueron consideradas para posteriores análisis. De las 1.418 muestras *Nosema* spp. se detectó por triplex-PCR en 66 muestras (**Tablas 5.6 y 5.7**), con una frecuencia predominante de *N. ceranae*. El ADN de esta especie se detectó en todas las etapas de desarrollo de la cría (n=50; 3,53%. **Tabla 5.6**) y en ambas temporadas apícolas, pre-invernada y post-invernada, con la prevalencia más alta en la etapa larval, L (6.41%). *Nosema apis* se detectó solo en los estadios L y P2 (n=6; 0,42%), mientras que *N. ceranae* y *N. apis* se detectaron conjuntamente en

muestras de los estadios L, P1 y P6 (n=10; 0,71%), con la prevalencia más alta en pupas pre-emergentes, P6 (1,72%).

		MUESTRAS DE CRÍA DE ABEJA							
		L	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Total
N		562	179	233	210	117	59	58	1.418
Detección (PCR+)	<i>N. ceranae</i>	36 (6,41)	6 (3,35)	1 (0,43)	3 (1,43)	1 (0,85)	1 (1,69)	2 (3,45)	50 (3,53)
	<i>N. apis</i>	5 (0,89)	0 (0,00)	1 (0,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (0,42)
	<i>Co-detección</i>	8 (1,42)	1 (0,56)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,72)	10 (0,71)
Multiplicación (rt-PCR+)	<i>N. ceranae</i>	9 (1,60)	2 (1,12)	0 (0,00)	1 (0,48)	1 (0,85)	1 (1,69)	1 (1,72)	15 (1,06)
	<i>N. apis</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	<i>Co-infección</i>	1 (0,18)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,07)

Tabla 5.6. Número de muestras positivas y porcentaje (entre paréntesis) de detección de *Nosema* spp. por PCR convencional y por PCR en tiempo real, según la fase de desarrollo de la cría de abeja. Co-detección y co-infección indican la detección simultánea de ADN o ADNc de *N. ceranae* y *N. apis* en una misma muestra según el método de amplificación utilizado PCR o rt-PCR, respectivamente.

La prevalencia se evaluó antes y después de la invernada (**Tabla 5.7**). La detección relativa de *N. ceranae* pre-invernada fue muy baja en ambos ensayos. Después de la invernada en el Ensayo 1 no se detectaron estadios inmaduros positivos para *Nosema* spp. y solo dos colmenas sobrevivieron al invierno ese año. Sin embargo, la prevalencia más alta de *N. ceranae* se detectó después de la invernada en el Ensayo 2, con un resultado positivo en el 10,45% de la cría analizada. En este punto de muestreo también fue el único en el que se detectó *N. apis*, ya sea solo (1,36%) o junto con *N. ceranae* (1,82%) en una misma muestra (co-detección).

MUESTRAS DE CRÍA DE ABEJA

Año	Colmena	Temporada	Detección (% PCR+)					Multiplicación (% rt-PCR+)			
			N	NC	NA	NC&NA	muestras positivas	NC	NA	NC&NA	muestras positivas
2015-2016	H1-H5	Pre-invernada	447	0,45	0,00	0,00	2	0,45	0,00	0,00	2
		Post-invernada	172	0,00	0,00	0,00	0	-	-	-	0
2016-2017	H6-H10	Pre-invernada	359	0,56	0,00	0,56	4	0,84	0,00	0,28	4
		Post-invernada	440	10,45	1,36	1,82	60	2,27	0,00	0,00	10
2015-2017	H1-H10	Estudio	1.418	3,53	0,42	0,71	66	1,06	0,00	0,07	16

Tabla 5.7. Porcentaje de muestras de cría positivas a *Nosema* spp. detectadas por PCR convencional y por rt-PCR en cada temporada (pre-invernada y post-invernada) y año. NC: *Nosema ceranae*; NA: *Nosema apis*; NC&NA: co-detección simultánea de ADN o ADNc de *N. ceranae* y *N. apis* en una misma muestra según el método de amplificación utilizado PCR o rt-PCR, respectivamente.

5.5.3. Multiplicación de *Nosema* spp. en muestras de cría de abeja (rt-PCR)

El número de muestras de cría positivas y la prevalencia de la infección por *Nosema* spp. según la edad de los estadios inmaduros se muestra en la **Tabla 5.6**. Todas las muestras de cría analizadas por rt-PCR mostraron una correcta amplificación del gen β -actina de *A. mellifera*, lo que se corresponde a una correcta extracción de AN y a una buena integridad del ARNm y posterior transcripción eficiente a ADNc. La expresión de los genes *N. ceranae-PTP3* y *N. apis-RPBI* se analizó en las 66 muestras de cría en las que previamente se había detectado *Nosema* spp. mediante PCR convencional. La multiplicación de los microsporidios se confirmó solo en 16 de estas muestras (24%), de las cuales 15 fueron positivas a la infección por *N. ceranae* (estadios L, P1, P3, P4, P5 y P6; rango de prevalencia 0,48%-1,72%; **Tabla 5.6**), con una prevalencia en cada estadio inmaduro siempre inferior al 2%. Por el contrario, la multiplicación activa de *N. apis* se detectó solo en una larva co-infectada por *N. ceranae* (estadio L, prevalencia 0,18%, **Tabla 5.6**). De hecho, éste fue el único caso confirmado de multiplicación de *N. apis* en estadios inmaduros durante los dos años de estudio (2015-2017) y solo en co-infección con *N. ceranae*. Todas las muestras mostraron altos valores de Cp (>34 ciclos; **Tabla 5.8**) aunque los controles de extracción RTC y NTC fueron negativos, lo que indica la ausencia de contaminación o amplificación no específica de ADN.

Colmena ID	Multiplicación	Pre-invernada		Post- invernada	
		Estadio cría	Valor Cp (rt-PCR)	Estadio cría	Valor Cp (rt-PCR)
H1	<i>N. ceranae</i>	-	-	♀	
	<i>N. apis</i>	-	-		
H2	<i>N. ceranae</i>	-	-	-	-
	<i>N. apis</i>	-	-	-	-
H3	<i>N. ceranae</i>	P3	40,00	♀	
	<i>N. apis</i>	-	-		
H4	<i>N. ceranae</i>	P3	37,73	♀	
	<i>N. apis</i>	-	-		
H5	<i>N. ceranae</i>	-	-	-	-
	<i>N. apis</i>	-	-	-	-
H6	<i>N. ceranae</i>	-	-	L5	40,00
		-	-	L5*	35,99
		-	-	L5	38,85
H7	<i>N. apis</i>	-	-	-	-
	<i>N. apis</i>	-	-	-	-
H8	<i>N. ceranae</i>	L5*	37,27	P1*	37,19
		L5*	37,47	P1	37,38
		-	-	-	-
H9	<i>N. ceranae</i>	-	-	L5	36,87
		-	-	L5	40,00
		-	-	L5	40,00
		-	-	L5	38,09
		-	-	L5	38,32
H10	<i>N. apis</i>	-	-	-	-
		P6*	34,21	-	-
		L5	37,79	-	-
		-	-	-	-

* Muestras positivas a *N. ceranae* and *N. apis* en análisis previos de PCR convencional
 ♀ Colmena muerta

Tabla 5.8. Valores de Cp obtenidos del análisis de los genes *N. ceranae-PTP3* y *N. apis-RPBI* en muestras individuales de cría de abeja mediante rt-PCR.

La prevalencia de *Nosema* spp. en cría de abeja (**Tabla 5.7**) también se calculó de acuerdo con el número total de muestras de cría analizadas en cada temporada (antes y después de la invernada) y ensayo (Ensayo 1: 2015-2016 y Ensayo 2: 2016-2017). La tasa de multiplicación más alta (2,27%) se observó para *N. ceranae* tras la invernada del Ensayo 2 (2016-2017), coincidiendo con el nivel más alto de detección por PCR convencional (10,45%). La única larva positiva para *N. apis* en co-infección con *N. ceranae* (**Tabla 5.7**) fue detectada en el Ensayo 2 y durante la temporada pre-invernada.

Seis de las diez colmenas resultaron positivas para *Nosema* spp. en cría de abeja (BB) en algún momento del estudio: 4 de las 9 colmenas fueron detectadas infectadas durante la pre-invernada y 3 de las 6 colmenas fueron positivas en los muestreos post-invernada (**Tabla 5.9**). La infección solo fue persistente (detectada pre- y post-invernada) en la cría de una sola colmena (H8) en el Ensayo 2.

El análisis de la prevalencia en BB antes y después de la invernada adoptó una distribución no normal. La frecuencia de las muestras que mostraron multiplicación activa de *N. apis* fue muy baja (1 única muestra), por lo que no se pudieron realizar análisis estadísticos relativos a este microsporidio. El análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis probó diferencias no significativas ($P = 0,394$) en la prevalencia de infección natural de la cría por *N. ceranae* en los dos ensayos y estacionalmente (antes y después de la invernada).

Análisis	Muestra	Ensayo 1					Ensayo 2							
		Sep-15	Oct-15	Nov-15	Ene-16	Feb-16	Mar-16	Abr-16	Oct-16	Nov-16	Dic-16	Mar-17	May-17	Jul-17
colmenas positivas <i>Nosema</i> spp. / colmenas muestreadas	BB		2/5			0/2					2/4*	3/5		
	INT	4/5	5/5	2/4 [♀]	1/3 [♀]	1/2 [♀]	2/2	2/2	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	4/5
	PEC	5/5	3/5	2/2**	2/2**	0/2	0**	0/2	5/5	0**	5/5	5/5	4/4	5/5
	Celda									3/4*	5/5			
% <i>N. ceranae</i>	BB		0,45			0,00					0,56	2,79		
	INT	9,60	11,20	7,22	2,70	6,00	18,00	18,37	10,84	5,60	9,45	12,08	8,11	2,60
	PEC	48,78	6,45	16,33	8,00	0,00	-	0,00	51,38	-	-	28,71	25,27	15,00
	Celda									3,05	4,88			
% <i>N. apis</i>	BB		0,00			0,00					0,00	0,00		
	INT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	1,60	0,62	0,35	0,20	0,00
	PEC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	-	-	0,00	0,27	0,00
	Celda									0,00	2,44			
% Co-infección	BB		0,00			0,00					0,28	0,00		
	INT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	PEC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00	0,20
	Celda									0,00	3,05			
Colmenas-Identificación		H1-H5					H6-H10							

* Nov-16: BB y PEC no disponibles en colmena H7

** PEC no disponibles en algunas colmenas (ausencia de PEC en la entrada de la piquera tras ser bloqueada o colmena muy débil)

♀ Colmena muerta

Tabla 5.9. Recogida de muestras y prevalencia de *Nosema* spp. en la cría de abeja (BB), abejas adultas de interior (INT) y pecoreadoras (PEC), y dentro de las celdas de la cría. Cada muestra incluyó 5 colmenas, excepto cuando no hubo abejas disponibles o cuando las colmenas murieron. Co-infección: muestras individuales infectadas simultáneamente por *N. ceranae* y *N. apis*.

5.5.4. Detección de ADN de *Nosema* spp. en las celdas ocupadas por la cría

Se estudiaron un total de 164 celdas, lo que se corresponde al 20,32% del total de las muestras de cría analizadas en el Ensayo 2. Como también se disponía de los resultados de infección de las crías alojadas en dichas celdas, ambos conjuntos de datos se representan juntos en la **Figura 5.4**. De las 164 muestras de celdas analizadas, *Nosema* spp. solo se detectó en 26 de ellas (15,9%), de las cuales: *N. ceranae* se encontró en 17 celdas (10,4%), *N. apis* en 4 celdas (2,4%) y ambas especies se detectaron simultáneamente en 5 celdas (3,1%).

Además, de las 12 celdas (7,3%) que resultaron negativas para el ADN de *Nosema* spp.; 8 celdas habían alojado a 8 larvas/pupas en las que *N. ceranae* fue detectada solo por PCR convencional (4,9%) y las otras 4 celdas habían alojado muestras de cría que resultaron positivas tras la rt-PCR (2,4%), lo que indica que la multiplicación de estos microsporidios ocurre en la cría a pesar de que las abejas hubiesen ocupado celdas en las que no se detectó el ADN de los patógenos (**Figura 5.4**).

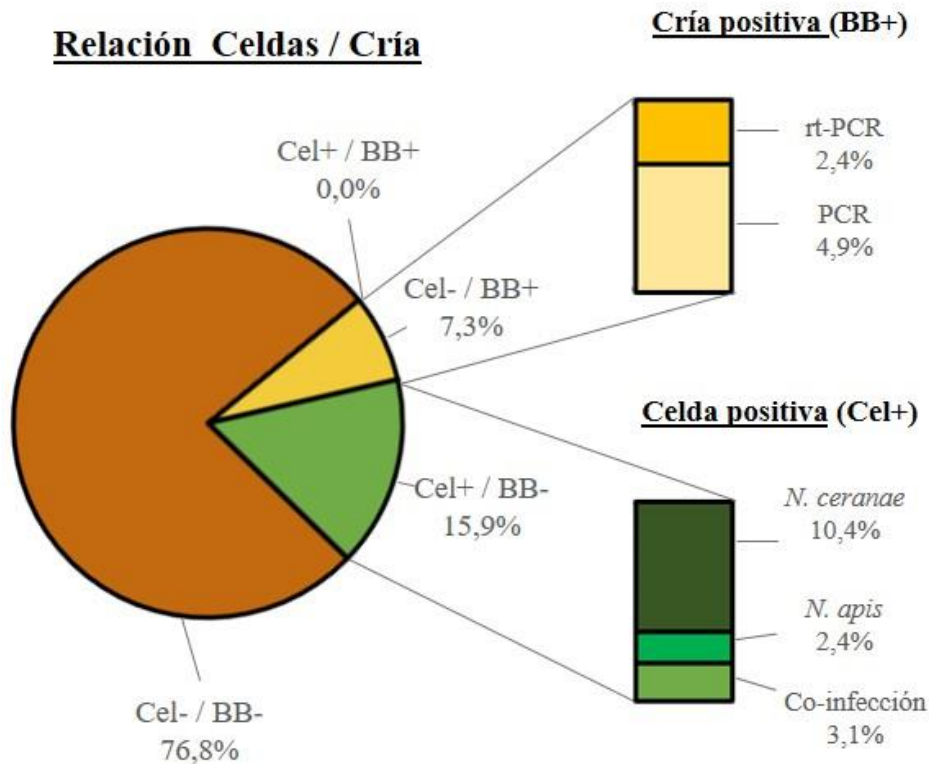


Figura 5.4. Porcentaje de celdas de cría positivas para *Nosema* spp. en relación a la detección de *Nosema* spp. en la cría de abejas. (+) indica un resultado positivo. (-) indica resultado negativo. Cría positiva: porcentaje de celdas negativas (Cel-) que estaban ocupadas con cría positiva (BB+) detectada por PCR o por rt-PCR. Celda positiva: porcentaje de celdas de cría positivas (Cel+) que estaban ocupadas por muestras de cría negativas (BB-).

5.5.5. Prevalencia de *Nosema spp.* en abejas adultas

Un total de 5.700 abejas obreras se analizaron individualmente para determinar el número de abejas adultas infectadas en cada colmena y en cada punto de muestreo (**Tablas 5.9**), de las cuales solo 5.650 muestras (3.348 INT y 2.302 PEC) resultaron positivas para el IPC en los análisis por PCR convencional, por lo que únicamente se consideraron estas muestras en análisis posteriores.

Se comprobó que la distribución de la prevalencia de los microsporidios en las abejas adultas era similar en los 4 momentos (año y temporada; test de Kruskal-Wallis one way ANOVA: antes, durante y después del muestreo de la cría, $P = 0,74$, $P = 0,53$ y $P = 0,67$, respectivamente), por lo que se pueden considerar conjuntamente. La prevalencia media en la infección por *N. ceranae* en AA del grupo de colmenas con cría infectada fue mayor que en el grupo de colmenas con cría no infectado y estos resultados se observaron siempre independientemente de la temporada de estudio (pre- o post-invernada) y del momento de muestreo de las abejas adultas: antes, durante o después del mes en el que se tomaron los cuadros de cría (**Figura 5.5**). Si bien, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (test de Mann-Whitney, $P = 0,26$; durante $P = 0,055$ y después $P = 0,056$).

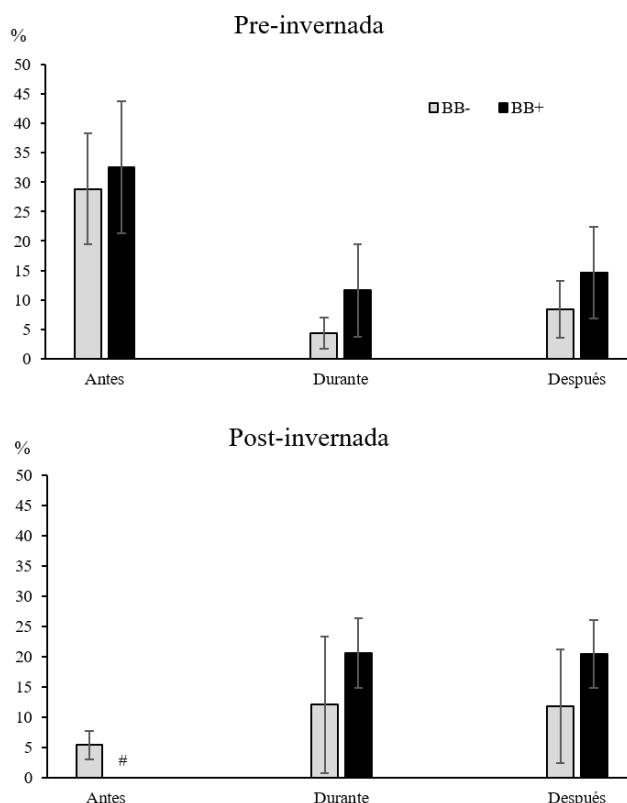


Figura 5.5. Prevalencia de la infección por *N. ceranae* en abejas adultas comparando colmenas agrupadas en las que la cría de abejas fue positiva (BB+ en negro) o negativa (BB- en gris), por temporada apícola y antes, durante y después del muestreo de la cría de abeja. Arriba: pre-invernada. Abajo: post-invernada. Las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Mann-Whitney, $P > 0,05$). #: colmenas BB+ con cría infectada no disponibles.

5.5.6. Validación de la técnica para detectar la multiplicación activa de *Nosema* spp.

La **Tabla 5.10** muestra los resultados de los valores de Cp de las muestras de ADN y ADNc obtenidas a partir de esporas ambientales de *N. apis* y *N. ceranae* y analizadas por rt-PCR. Todas las muestras de ADNc fueron negativas, lo que pone de manifiesto que las esporas ambientales de *N. apis* o *N. ceranae* no tuvieron actividad de los genes *RPB1* o *PTP3*, respectivamente. Además, las mismas muestras que habían sido procesadas sin enzima de transcripción inversa (RTC) no mostraron ninguna amplificación, demostrando que el tratamiento con DNasa fue eficiente y no quedaron residuos de ADN genómico. Por el contrario, el ADN obtenido de las mismas muestras reveló amplificación en ciclos bajos (valores de Cp), evidenciando la buena preservación de las esporas (recién purificadas de *N. ceranae* y stocks del CIAPA de *N. apis*) utilizadas para este ensayo de validación.

Por otro lado, no se observó ninguna reacción cruzada; los cebadores de NC-PTP3 detectaron específicamente muestras de *N. ceranae*, mientras que los cebadores de NA-RPB1 solo detectaron muestras de *N. apis*. Los controles NTC fueron negativos en todos los análisis realizados.

Gen	Muestra	Valores de Cp (rt-PCR)					Eficiencia
		ADN	ADNc	RTC	C+	C-	
<i>PTP3</i>	NC 1.1	27,24 ±0,01	0	0	36,50	0	99.8%
	NC 1.2	27,11 ±0,09	0	0		0	
	NC 1.3	32,02 ±0,40	0	0		0	
	NC 1.4	32,18 ±0,03	0	0		0	
	NC 3.1	24,89 ±0,11	0	0	24,48	0	
	NC 3.3	29,81 ±0,01	0	0		0	
<i>RPB1</i>	NA 1.2	21,09 ±0,19	0	0	26,68	0	102%
	NA 1.3	22,65 ±0,13	0	0		0	
	NA 1.4	21,51 ±0,07	0	0		0	
	NA 3.2	27,60 ±0,04	0	0	36,02	0	
	NA 3.3	35,19 ±1,43	0	0		0	

Tabla 5.10. Validación del ensayo de multiplicación de *N. ceranae* y *N. apis* por rt-PCR. El ADN y el ARN se extrajeron de esporas ambientales de *N. ceranae* y *N. apis*. Valores de Cp obtenidos para las muestras de ADN, ADNc y para los controles de retro-transcripción (RTC; ARNm sin enzima retro-transcriptasa). El valor de 0 indica la no detección de amplificación. Eficiencia del gen *β -actina* (91,4%) utilizando la metodología descrita anteriormente (Martín-Hernández *et al.*, 2017).

5.6. DISCUSIÓN

Este trabajo confirma que la infección por *Nosema* spp. ocurre naturalmente en estadios inmaduros de abejas melíferas, como se propuso previamente en estudios de laboratorio (Eiri *et al.*, 2015; Benvau y Nieh, 2017). Aunque las nosemosis han sido tradicionalmente consideradas enfermedades de abejas adultas desde que fueron descritas por primera vez en abejas de la miel (Zander 1909; Bailey 1955; Fries, 1993; Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007), existían algunas publicaciones que describían la infección en estadios inmaduros de abejas. La primera notificación de la infección por microsporidios en cría informó de la detección de esporas de *N. apis* en la hemolinfa de larvas de abeja (Gilliam y Shimanuki, 1967). Algunos años más tarde, se describió la infección por “*brood nosema*” (nosema de cría) en estados larvarios tardíos o pupales de un colmenar sudafricano (Buys, 1972, 1977; citado en Clark 1979), describiéndose como una especie distinta de *N. apis*, sin haberse confirmado molecularmente. Más de 30 años después, el ADN de *N. ceranae* fue detectado por PCR en zánganos, reinas y obreras inmaduras (Traver y Fell, 2011a; Traver y Fell, 2012; Rodríguez *et al.*, 2014) y el ADN de *N. apis* se detectó así mismo en pupas de abejas obreras (Rodríguez *et al.*, 2014), aunque no se proporcionaron datos sobre su prevalencia y no se confirmó su multiplicación. Por lo tanto, hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que determina la prevalencia de la infección por *N. ceranae* y *N. apis* en estadios inmaduros de abejas obreras bajo condiciones naturales de campo.

Como era de esperar, *N. ceranae* (3,53%) se encontró con mayor frecuencia que *N. apis* en la cría, siendo este último más frecuente en co-infección junto con *N. ceranae* (0,71%) que en infecciones simples (0,42%). Puesto que el análisis de las esporas ambientales no produjo ninguna amplificación, esto confirmó su multiplicación en la cría de abejas. La detección del ARNm de los genes *N. ceranae-PTP3* y *N. apis-RPBI* es una herramienta útil para confirmar la multiplicación de estos microsporidios que infectan a las abejas melíferas. De hecho, la multiplicación de *N. ceranae* se observó en el 1,06% de los estadios inmaduros examinados, mientras que *N. apis* solo se confirmó en co-infección (0,07%). En trabajos anteriores se ha demostrado que el gen *PTP3*, al igual que otras proteínas específicas de las esporas, se sintetiza durante la segunda mitad de la esporogonía durante la infección por *Encephalitozoon cuniculi* (Brosson *et al.*, 2006; Gridale *et al.*, 2013; Taupin *et al.*, 2006b). Por otro lado, el *RPBI* está directamente relacionado con la transcripción de genes que codifican proteínas (Chymkowitch y Enserink, 2013; Katinka *et al.*, 2001) durante la fase S del ciclo celular y con la producción de ARN no codificante (Belkorchia *et al.*, 2017) involucrado en varios procesos celulares cruciales del género Microsporidia. Las esporas ambientales son consideradas como estadios latentes con muy baja actividad celular, o incluso nula (revisado en Williams *et al.*, 2014), por lo que la detección de la expresión de esos genes confirma la multiplicación activa de los microsporidios estudiados. La amplificación se observó en ciclos altos de amplificación, indicando un bajo nivel de expresión de los mismos o una baja carga parasitaria.

Estudios anteriores demostraron que las esporas de *N. ceranae* pueden desarrollarse intracelularmente en las células del intestino medio de abejas en etapa pre-pupal infectadas experimentalmente durante su estadio larval (Eiri *et al.*, 2015). Por el contrario, un trabajo similar realizado con esporas de *N. apis* concluyó que este microsporidio solo se desarrolló con éxito en abejas adultas (van der Eijnde y Vette, 1993). Sin embargo, nuestros datos confirman que ambos microsporidios pueden desarrollar una infección activa en la cría de abeja bajo condiciones naturales de campo, aunque con baja prevalencia en el caso de *N. ceranae* y a niveles extremadamente bajos para *N. apis*. De hecho, la multiplicación de ambos microsporidios fue evidente desde las etapas más jóvenes (L), hasta los estadios maduros de cría (P6) estudiados, y no se encontró ninguna relación entre la detección o transcripción de los genes de *N. ceranae* y/o *N. apis* y la etapa de desarrollo de la abeja inmadura. *Nosema ceranae* completó su ciclo biológico dentro de las células del intestino medio de larvas de la misma edad a las ensayadas en el presente trabajo (L: Eiri *et al.*, 2015); el tejido que se convertirá en el ventrículo de abejas adultas (Carreck *et al.*, 2013). Este hecho se confirmó para *N. apis* mediante la expresión del gen *RPB1*, así como para el gen *N. ceranae-PTP3*. Sin embargo, la multiplicación solo se confirmó en el 24% de las muestras en las que se identificaron esporas de *Nosema* spp. mediante PCR convencional, lo que indica que la infección en muchos casos no fue exitosa. Esto podría deberse a que la germinación de las esporas ingeridas por la cría no se produjo (Bailey, 1955), o a que el ciclo biológico de las especies de *Nosema* spp. se interrumpiera en algún punto, lo que podría dar lugar a una latencia de la infección o a una inactividad de las esporas (Benvau y Nieh, 2017).

En cuanto a las consecuencias de la infección en estadios inmaduros, dos investigaciones recientes (Eiri *et al.*, 2015; Benvau y Nieh, 2017) demostraron que las infecciones durante los estadios larval y pupal son perjudiciales para la viabilidad de la colmena. Entre las consecuencias observadas se encuentran una menor longevidad de las abejas adultas (Eiri *et al.*, 2015), una alteración en la morfología del aguijón y un aumento de los títulos de vitelogenina que podrían afectar al polietismo normal y perturbar el equilibrio de la colmena (Goblirsch *et al.*, 2013; Lecocq *et al.*, 2016; Benvau y Nieh, 2017).

La infección de los estadios de cría de insectos por microsporidios no es rara, ya que se ha confirmado para otras especies. La infección de larvas de *Bombus terrestris* por *Nosema bombi* se ha observado repetidamente (van de Eijnde y Vette, 1993; Schmid-Hempel y Loosli, 1998) mientras que la infección de las larvas de *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Crambidae) por *Nosema furnacalis* y *Nosema granulosis* ha sido descrita recientemente por primera vez (Malysh *et al.*, 2018). De hecho, los estadios inmaduros pueden ser los únicos estadios susceptibles a la infección en algunas especies de insectos, como *B. terrestris* y *L. sticticalis* (van de Eijnde y Vette, 1993; Malysh *et al.*, 2018), aunque una vez adquiridos, la infección por *N. bombi* (van de Eijnde y Vette, 1993) y *N. ceranae* (Malysh *et al.*, 2018) también se pudo desarrollar durante los estadios adultos. Aunque no se ha confirmado su multiplicación activa, el ADN de *N. apis* y *N. ceranae* también se aisló recientemente de las larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae; una polilla que es una plaga de las colmenas de abeja)

recogidas en colmenares de Turquía (Ozgor *et al.*, 2017); de confirmarse su multiplicación estas especies podrían jugar un papel importante como reservorios y vectores de las enfermedades de la nosemosis.

Una vez que se estableció la frecuencia de infección de la cría, se estudiaron las celdas de cera ocupadas por algunas de las crías analizadas para evaluar su papel como un posible medio de transmisión. La presencia de ADN de *Nosema* spp. se detectó a niveles bajos (15,9%), confirmando que las celdas estaban contaminadas, principalmente por *N. ceranae*. Sin embargo, ninguna de las celdas contaminadas había sido ocupada por una cría infectada, mientras que algunas celdas (7,3%) en las que no se detectó el ADN de *Nosema* spp. habían hospedado crías infectadas solo por *N. ceranae* y solo en unas de esas pocas crías (2,7%) se confirmó la infección activa. Así, es de suponer que la contaminación del ambiente más próximo donde se desarrolla la cría no fue la vía principal de transmisión, incluso cuando la prevalencia de abejas adultas infectadas fue bastante alta, lo que refleja una contaminación más intensa de la colmena. Las esporas de *N. ceranae* pueden seguir siendo viables en las celdas de cera (MacInnis, 2017) y también han sido detectadas por PCR en la jalea real (Cox-Foster *et al.* 2007; Traver y Fell, 2012); la cera podría ser el principal medio de transmisión de esporas a los estadios inmaduros después de su transmisión a través del alimento (Traver y Fell, 2012; Goblirsch, 2017), ya que parece más razonable la exposición de las esporas a través de la jalea real (alimento de las larvas durante los 3 primeros días y a su vez componente del pan de abeja, que es el alimento principal de larvas y pupas), que la liberación de esporas desde la cera sólida, tal y como lo sugieren los resultados representados en la **Figura 5.4**.

La transmisión horizontal de microsporidios es posible que se esté produciendo a través de diferentes vías que incluyen la transmisión fecal-oral y oral-oral y la ingestión de alimento y agua contaminados (Diddier *et al.*, 2004b). La ingestión de esporas a través del alimentos ya ha sido confirmada en las abejas melíferas, a través de la ingestión de polen y/o del agua contaminados (Fries, 1993; Higes *et al.*, 2008b), del intercambio de alimento entre las abejas (trofalaxia) o cuando realizan tareas de limpieza (Bailey 1955; Fries, 1993; Higes *et al.*, 2009b; Smith 2012;). De hecho, el intercambio de alimento por parte de las abejas nodrizas fue, probablemente, la principal vía de infección en este estudio, ya que estas jóvenes abejas adultas desempeñan un papel crucial en la alimentación de las larvas y pupas (Crailsheim, 1990). Se han sugerido otras rutas, como la transmisión vertical de esporas desde la reina infectada a sus huevos (Traver y Fell, 2011a) y no se puede descartar esta posibilidad ya que no se recogieron datos sobre la infección de la reina, pero en este caso serían esperables mayores prevalencias de infección en la cría.

Finalmente, la prevalencia de la infección por *Nosema* spp. en abejas adultas fue evaluada para determinar si su mayor frecuencia se correspondía con una mayor probabilidad de infección de la cría y viceversa. Este efecto podría haberse esperado, ya que las abejas inmaduras infectadas pueden sobrevivir hasta la edad adulta, su infección persiste después de la metamorfosis y cuando se convierten en

individuos adultos (Eiri *et al.*, 2015; Benvau y Nieh, 2017), por lo que una mayor prevalencia de cría infectada también podría aumentar la frecuencia de la infección de abejas adultas un mes más tarde, tras su maduración. Sin embargo, aunque los resultados representados en la **Figura 5.5** muestran el mayor nivel de infección de abejas adultas en el grupo de colmenas en las que la cría fue también positiva a la infección, esta relación no pudo establecerse estadísticamente. En consecuencia, se deben desarrollar más estudios que incluyan un mayor número de colmenas para demostrar este patrón aparente. Además, cabe destacar que la propagación del patógeno desde las abejas infectadas recién nacidas a sus compañeras de colmena sanas puede ser muy variable, dependiendo de si se involucran en interacciones intensas o si quedan socialmente aisladas, que a su vez depende del nivel y frecuencia de infección de todos los miembros de la colmena y por tanto del estado de salud de la misma (Biganski *et al.*, 2017), que atendiendo a la epidemiología de las nosemosis varía en las diferentes épocas del año (Higes *et al.*, 2010b).

Según los resultados presentados en este capítulo, *N. ceranae* y *N. apis* no son solo entomoparásitos de individuos adultos de abejas melíferas, sino que pueden multiplicarse activamente en los estadios inmaduros de la cría de abeja; desde larvas recién operculadas hasta pupas maduras pre-emergentes, bajo condiciones naturales. Sin embargo, en condiciones de campo existe poco riesgo de infección de la cría de abejas obreras, incluso cuando el nivel de infección en las abejas adultas sea relativamente alto, lo que sugiere algún tipo de estrategia para la prevención de su infección y de la multiplicación de las esporas en el corazón de la colmena, tal y como se ha sugerido para la prevención de la infección natural de la abeja reina (Chaimanee *et al.*, 2014). Las consecuencias de la infección natural de la cría son de interés veterinario y será necesario determinar la evolución temporal de dicha infección, así como el efecto que pueda tener en la epidemiología de la enfermedad y en la evolución de las colmenas. Asimismo, los resultados presentados son de interés para el desarrollo de medidas de control de las nosemosis en las colmenas.

Agradecimientos

Gracias a la participación del equipo técnico del Laboratorio de Patología Apícola del Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA) adscrito al Instituto Regional de Investigación Agroalimentaria y Forestal de Castilla-La Mancha (IRIAF-JCCM), con especial mención a Virginia Albendea, Teresa Corrales, María Gajero, Carmen Uceta y María Buendía, quienes ayudaron a procesar las muestras en el laboratorio y a Javier Almagro y Jesús García por su ayuda en la toma de muestras de campo.

Este trabajo forma parte de varios proyectos subvencionados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (INIA): Urbietta-Magro; contratada superior investigador de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha a través de la ayuda FPI-INIA CC.AA: RTA2012-00076-C02-01. Asimismo, este trabajo fue apoyado por otros fondos INIA-FEDER (RTA2015-00013-C03-01 y RTA2012-00076-C02-01). La financiación no tuvo ninguna influencia en el contenido de este documento. No se declara ningún posible conflicto de interés con respecto a la investigación, autoría y/o publicación del artículo de este capítulo en la revista *International Journal for Parasitology*.



Chapter 2

Capítulo II

La edad de las abejas obreras y el método experimental de infección con esporas de *Nosema ceranae* influyen en el desarrollo y curso de la enfermedad

¿Qué factores experimentales y/o biológicos afectan al curso y desarrollo de la infección por *N. ceranae* en abejas melíferas?

Artículo científico enviado a "Insects"

Enviado: 31 julio 2019. Primera revisión: 15.08.2019 (ID: insects-574839)

Manuscript submitted to "Insects"

Received: 31.07.2019; First revision: 15.08.2019 (ID: insects-574839)

Age and method matter when studying experimentally infected *Nosema ceranae* worker honey bees (*Apis mellifera*)

Co-authors: Urbieto-Magro A., Higes M., Meana A., Barrios L., Martín-Hernández R.

Key words: honey bee, *Apis mellifera*; *Nosema ceranae*; host-parasite interactions; age cohort; method of infection, *PTP3* gene quantification; epidemiology

6.1. RESUMEN

La mayoría de los estudios de patogenicidad de *N. ceranae* se realizan en laboratorio con abejas de edad controlada, generalmente de 0 a 7 días después de la emergencia (p.e.). Sin embargo, se disponen de datos escasos acerca del efecto de la edad de la abeja sobre el desarrollo de la infección. Igualmente, el método de inoculación de esporas varía en los diferentes trabajos y no hay ensayos que evalúen la influencia del método en la infección.

Para aclarar estos aspectos, se inocularon grupos de abejas a las edades de 0 a 15 días p.e. de forma individual (Grupo A) y de forma colectiva (Grupo B), con esporas purificadas frescas de *N. ceranae* con el fin de evaluar el efecto de la edad de las abejas y el método de administración de las esporas (inoculación) en el curso y desarrollo de la enfermedad a los 7 días después de la inoculación.

El nivel de infección de las abejas de diferentes edades se analizó individualmente por qPCR usando una concentración conocida estándar (gBlock[®]) del gen *N. ceranae-PTP3* para su cuantificación. Los resultados mostraron que la edad de las abejas y el método de administración de las esporas influyeron significativamente en los niveles de infección y por tanto en el desarrollo temprano de la parasitación.

Las abejas más jóvenes (abejas recién nacidas y abejas de 1 día p.e.) mostraron el mayor nivel medio de carga parasitaria, que disminuyó drásticamente en abejas infectadas a la edad de 2 días p.e. Los niveles más bajos se detectaron en abejas infectadas a edades más avanzadas, de 10 a 16 días p.e., con una tendencia indirecta al aumentar la edad de las abejas. La infección en las abejas del Grupo A fue más prevalente y los niveles de infección fueron mayores que en las abejas del Grupo B.

Se discuten factores dependientes del hospedador y del parásito como posibles determinantes de la diferente susceptibilidad de las abejas a la infección.

SUMMARY

Most pathogenicity studies of *N. ceranae* are conducted in laboratory with age-controlled bees, usually 0-7 days post-emergence (p.e.). However, little data are available about the effect of the bee's age on the development of the infection. Similarly, the method of spore inoculation varies across different works and there are no assays evaluating the influence of the method on infection.

To clarify these aspects, groups of bees aged 0 to 15 days p.e. were inoculated individually (Group A) and collectively (Group B) with fresh purified spores of *N. ceranae* to evaluate the effect of the bee's age and the method of spores administration (inoculation) on the course and development of the disease, at 7 days post-inoculation.

The level of infection in bees of different ages was analyzed individually by qPCR using a known standard concentration (gBlock®) of the *N. ceranae-PTP3* gene for quantification. The results showed that the age of the bees and the method of spore's administration significantly influence the levels of infection and therefore the early development of the parasitization.

The youngest bees (new-born bees and 1 day p.e.) showed the highest mean level of parasitic load, which decreased radically in infected bees at the age of 2 days p.e. The lowest levels were detected in infected bees at older ages, from 10 to 16 days p.e., with a downward trend with increasing age. The infection in the Group A was more prevalent and the infection levels were higher than in the Group B.

Host and parasite-dependent factors are discussed as possible determinants of the different susceptibility of bees to infection.

6.2. ANTECEDENTES

Muchos factores influyen en el curso y desarrollo de la infección por *N. ceranae* en las abejas melíferas; las diferencias genéticas entre las subespecies de abeja (Bourgeois *et al.*, 2012; Fontbonne *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015), las prácticas apícolas (Malone y Gatehouse, 1998; Giersch *et al.*, 2009; van der Zee *et al.*, 2012) y algunos factores climatológicos y medioambientales (Martín-Hernández *et al.*, 2007, 2009; Fenoy *et al.*, 2009; Tapasztó *et al.*, 2009) explican una relación hospedador-patógeno aparentemente desigual en diferentes partes del mundo (Klee *et al.*, 2007; Fries, 2010).

Sin embargo, el uso de metodologías de investigación muy diversas son fuente de resultados controvertidos (Forsgren y Fries, 2010; Porrini *et al.*, 2011; Higes *et al.*, 2013; Milbrath *et al.*, 2013; Jack *et al.*, 2016a). En este sentido, tanto la edad de las abejas en el momento de la infección, como el método experimental de infección de las abejas varían considerablemente de unos trabajos a otros y pueden dar lugar a infecciones desiguales (Lecqoc *et al.*, 2016; Biganski *et al.*, 2017; Brodschneider *et al.* 2017), que resulten en conclusiones aparentemente contradictorias.

El objetivo de este trabajo fue evaluar, en condiciones experimentales, el efecto de estos dos factores, biológico y experimental, en el curso y desarrollo de la infección por *N. ceranae*.

6.3. HIPÓTESIS

La edad a la que las abejas adultas se exponen a la infección por *N. ceranae* influye en el desarrollo posterior de la parasitación. El método de infección colectiva a través del alimento administrado *ad libitum* favorece infecciones desiguales entre abejas enjauladas juntas.

6.4. MATERIAL Y MÉTODOS

6.4.1. Origen de las abejas y condiciones de cría

Se obtuvieron cuadros de cría operculada de 5 colmenas sanas de *A. mellifera iberiensis* libres de *Nosema* spp emplazadas en el colmenar experimental situado en la localidad de Valdeavero (véase apartado 4.3). La ausencia de infección de todas las colmenas por especies de *Nosema* se analizó en treinta abejas adultas recién nacidas de las mismas colmenas, que se maceraron en grupo (Cepero *et al.*, 2014) y se analizaron mediante triplex-PCR, tal y como se indica en el Capítulo I (apartados 5.4.5a y 5.4.6).

En el laboratorio, los cuadros de cría se mantuvieron durante 15 días consecutivos en una incubadora a 34°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) para proporcionar un suministro diario de abejas obreras. Todas las abejas recién emergidas fueron retiradas de los cuadros de cría diariamente e introducidas cuidadosamente en jaulas de malla de acero (Martín Hernández *et al.*, 2011), en grupos de 20 abejas por jaula, que se mantuvieron en otra incubadora (33°C $\pm 1^\circ\text{C}$) hasta el día de la infección experimental. La edad de las abejas (días post-emergencia: p.e.) se registró diariamente de tal forma que todas las abejas de una misma jaula tuvieran la misma edad (cohorte de edad). De esta manera, para este ensayo se dispuso de jaulas de cohortes de abejas de 0 a 15 días p.e.

Durante el tiempo que estuvieron en el laboratorio, las abejas se alimentaron *ad libitum* con una solución fresca de sacarosa (50% p/v en agua destilada; dH₂O) combinada con 2% Promotor L[®] (Calier Lab.), preparado diariamente. La miel y el polen no se utilizaron para alimentar a las abejas con el fin de evitar una posible contaminación (Higes *et al.*, 2008c) con esporas infecciosas de *Nosema* spp. (Martín-Hernández *et al.*, 2011) y debido a la difícil homogenización del alimento cuando se utilizan estos sustratos. Las abejas muertas se retiraron de todas las jaulas diariamente.

6.4.2. Esporas de *N. ceranae*

Las esporas de *N. ceranae* se aislaron de alrededor de 200 abejas (*A. m. iberiensis*) altamente parasitadas. Estas abejas se recolectaron dos días antes de su uso, de 3 colmenas infectadas de forma natural y ubicadas en un apiario experimental del CIAPA, siguiendo los procedimientos detallados por Higes *et al.* (2008b). Brevemente, las abejas se maceraron en grupo (30-40 abejas) en el interior de una bolsa con filtro (Seward, BA6040) en dH₂O (calidad de PCR) durante 120 segundos a baja velocidad (Stomacher 80-Microbiomaster[®]) y, posteriormente, se centrifugaron durante 6 minutos a 800 g. El sedimento se purificó siguiendo un procedimiento de separación por gradiente (Taupin *et al.*, 2006a) con Percoll[®] isotónico al 95% (en dH₂O) en una proporción de 1:9 (esporas:percoll) mediante su centrifugación a 11.000 g durante 40 minutos. Posteriormente, este se lavó tres veces por centrifugación a 800 g durante 6 minutos, el sobrenadante se decantó entre lavados y el sedimento se resuspendió en 1ml ddH₂O estéril (Higes *et al.*, 2008b). Las especies de las esporas purificadas de *Nosema* se confirmaron por PCR (Martín-Hernández; *et al.*, 2012) utilizando las placas de Biotools[®] descritas en el Capítulo I (Urbieta-Magro *et al.*, 2019). Todas las esporas obtenidas se unificaron en un único vial y la concentración de la solución final se calculó por conteo según el método de Cantwell (1970) en un hemocitómetro Neubauer[®], con un microscopio óptico en contraste de fase (x40 y Ph2). La concentración final de esporas se estableció en 57.000 esporas μl^{-1} .

Para disponer de una mayor homogeneidad de la solución de esporas administrada (inóculo de esporas) que se utilizaría dos días después, la solución se dividió inmediatamente en alícuotas en varios

microtubos de 50 μ l por jaula y los viales se almacenaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su uso.

6.4.3. Experimentos de infección: Grupo A y Grupo B

Se realizaron dos ensayos en paralelo. En el primer ensayo las abejas se infectaron individualmente (Grupo A) y en el segundo las abejas se infectaron de forma colectiva (Grupo B).

Se dispuso de 4 jaulas por cohorte de edad ($n=80$, 20 abejas por jaula), desde los días 0-15 post-emergencia. De cada grupo de edad 3 jaulas se destinaron para el ensayo de infección individual (Grupo A) y la cuarta jaula se utilizó para el ensayo de infección colectiva (Grupo B). Adicionalmente se dispuso de jaulas de diferentes edades de abejas ($n=300$ abejas) que se utilizaron como grupo testigo (T) a lo largo del estudio.

Ambos ensayos se diseñaron de tal modo que las infecciones (administración de esporas o inoculación) se realizaron tan solo en dos días diferentes y permitiendo que los grupos de abejas de diferentes edades y grupos de infección se inocularan el mismo día, de forma que se eliminaron sesgos por alícuotas o tiempo de conservación de las esporas. Las abejas del grupo testigo fueron las últimas en manipularse tras la inoculación de los grupos de estudio en ambos momentos de infección.

a) Grupo A: infección individual de abejas

Antes de la inoculación, se retiró el alimentador de las jaulas durante 2 horas y, posteriormente, las abejas se anestesiaron con CO_2 durante 90 segundos, con el fin de facilitar su manipulación durante las infecciones experimentales, como ya se ha explicado en el apartado 4.4 (**Figura 4.2.E**).

Cada abeja del Grupo A (3 jaulas de 20 abejas por cada cohorte de edad) se sujetó individualmente por las alas (**Figura 6.1**) y cuando comenzó a despertarse de la anestesia se le administraron 2 μ l de la solución de esporas (114.000 esporas por abeja) usando una punta de pipeta de 10 μ l (Malone *et al.*, 1995). La solución de esporas se agitó cada tres abejas para asegurar una suspensión uniforme de las esporas.



Figura 6.1. Inoculación individual de abejas del Grupo A. Las abejas en ayunas (2h) y anestesiadas (CO₂) se sujetaron delicadamente por las alas y al despertar, una gota de agua (2 µl) conteniendo 114.000 esporas de *N. ceranae* se aproximó a la boca de los insectos con una punta de micropipeta. Las abejas reaccionaron rápidamente al estímulo ingiriendo el inóculo de esporas y en su defecto fueron descartadas. Las abejas testigo se alimentaron individualmente con 2 µl de agua sin esporas. Fuente: original.

En este ensayo se inocularon abejas de edades de 0 a 15 días post-emergencia (excepto del día 3 por falta de disponibilidad -nacimiento de abejas suficientes-). Se incluyó un grupo testigo de las abejas de 0, 1, 4, 5, 8, 11, 13 y 14 días p.e. (1 jaula de 20 abejas por edad), que se alimentaron con 2 µl del agua sin esporas. Este grupo de abejas testigo solo se utilizó para asegurar la falta de infección de origen y cruzada.

Las abejas que no ingirieron toda la gota fueron descartadas. Se utilizó una barrera de cartón para separar físicamente a las jaulas de las diferentes cohortes evitando el contacto entre las abejas de diferente edad en una misma incubadora (Memmert® Mod. IPP500, ±0,1°C). Los grupos de abejas infectadas y no infectadas se mantuvieron en estufas separadas bajo las mismas condiciones (oscuridad, 33 ± 1°C y 80% de H.R.). Los grupos de edad y el número de abejas utilizadas en el estudio se indican en la **Tabla 6.1**.

DISEÑO EXPERIMENTAL																		
Cohorte	T	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Grupo A	160	90	60	60	-	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	-
Grupo B	120	-	20	20	20	-	-	20	20	20	20	20	20	-	20	20	20	20

Tabla 6.1. Número de abejas totales en cada cohorte y grupo de infección. Grupo A: abejas infectadas individualmente (n= 20 abejas x 3 jaulas). Grupo B: abejas infectadas colectivamente (n= 20 abejas x 1 jaula). T: testigo. -: grupo de abejas no disponible. Las abejas que murieron se sacaron del estudio.

b) *Grupo B: infección colectiva de grupos de abejas*

De forma paralela a la prueba anterior, una jaula de cada grupo de edad, de 0 a 15 días p.e., se utilizó para inocular a las abejas empleando el método colectivo (Grupo B). Para ello, se preparó una solución de jarabe que contenía esporas purificadas (del mismo inóculo purificado que en el ensayo anterior) para alcanzar una dosis equivalente de 114.000 esporas/abeja, en un volumen total de 400 μ l de jarabe fresco por cada jaula de 20 abejas, asumiendo que cada abeja consume 20 μ l de alimento por día y que todas consumen lo mismo, lo que equivale a una concentración de 5.700 esporas μ l⁻¹. El día de la inoculación (administración de esporas), los alimentadores de todas las jaulas del Grupo B se sustituyeron por alimentadores conteniendo la solución de sacarosa con esporas que se mantuvo durante 24 horas.

Tras 24h, se verificó que todo el alimento administrado había sido completamente consumido, de manera que la edad mínima de las abejas en el momento de infección fue considerada como 1 día p.e., por lo tanto no se dispuso de una cohorte de 0 días en el Grupo B (**Tabla 6.1**). El alimento se renovó diariamente con jarabe sin esporas (solución de sacarosa) preparado en el momento y se administró *ad libitum*. Además se incluyeron abejas control de la ausencia de infección de 1, 7, 8, 10, 11 y 14 días p.e. (1 jaula de 20 abejas por edad), que recibieron 400 μ l de solución fresca de jarabe sin esporas. En este ensayo no se dispuso de abejas de las edades 4, 5 y 12 días p.e.

Las jaulas de abejas infectadas se mantuvieron en una incubadora diferente a las del Grupo A y de nuevo fueron separadas físicamente para evitar infecciones cruzadas entre cohortes diferentes. Las jaulas de abejas no infectadas se mantuvieron en una incubadora diferente, junto a las jaulas de abejas no infectadas del Grupo A.

6.4.4. Detección molecular de la infección por *N. ceranae* (extracción de ADN y análisis qPCR)

El día 7 después de la inoculación, las abejas vivas restantes fueron registradas y congeladas a -20°C. Siempre que estaban disponibles, se tomaron 10 abejas de cada jaula del Grupo A (30 abejas por cohorte) y del Grupo B (10 abejas por cohorte). Los abdómenes se separaron cuidadosamente y se introdujeron individualmente en un pocillo de una placa de 96 pocillos conteniendo cuatro bolas de vidrio de 2 mm (Sigma®) y 180 μ l de H₂O miliQ® estéril para su homogeneización por agitación a 30 Hz durante 6 minutos (TissueLyser II, Qiagen®). El ADN se extrajo del macerado resultante empleando la metodología anteriormente descrita en el apartado 5.4.5.c (Tris-HCl + Proteinasa K).

Como control negativo de extracción se utilizó un pocillo sin muestra (NTC) entre los abdómenes de las abejas de diferentes edades. *Nosema ceranae* se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés, *quantitative*-PCR) para detectar el ADN del gen que codifica para la *proteína 3 del túbulo polar (PTP3; Urbietta-Magro et al., 2019)*. Todas las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 384 pocillos, en un volumen final de 10 μ l y empleando la

metodología descrita en el apartado 5.4.7 (**Tabla 5.5**). Todos los análisis se hicieron por duplicado incluyendo dos réplicas analíticas de cada muestra en la misma serie cinética de qPCR (variación intra-ensayo). En cada muestra de qPCR el valor de C_p se calculó a partir de la curva estándar utilizando Máximo de la 2ª derivada.

La carga parasitaria se cuantificó en todas las muestras respecto a un oligonucleótido sintético específico (gBlocks®, IDT DNA Technologies) del fragmento del gen de *N. ceranae-PTP3*, que se diseñó utilizando la herramienta bioinformática de ordenamiento de Fragmentos Genéticos gBlock® (*gBlock® Gene Fragment ordering tool*). Se seleccionaron zonas no variables del gen en base a los datos de secuencias disponibles en *Genbank* y la base de datos del propio equipo de investigación (Gómez-Moracho, 2015). La curva estándar para la cuantificación se preparó siguiendo el protocolo del fabricante a una concentración inicial de 10 ng/μl (en TE), seguido de diluciones decimales seriadas hasta 1 x10⁻¹⁴ ng/μl. La secuencia del Fragmento Genético *PTP3* gBlock® se muestra en la **Tabla 6.2**.

Método	Organismo	<i>PTP3</i> gBlock® Gene Fragment	Referencia
qPCR	<i>N. ceranae</i>	5'_TGAAGCTAAAAAAGAAGAACAACCTTGACCAAATAGCTAAA AAGAATGCAGAGACAGAGAAACAACACAGAGAGGTACTTCTC AAAGAACATCAAGA TGCTGATGTTATGGCTACAGAAG AAAAG ACTTGCTAAAAATAATAGAG CCAGGA AGATTAGTGAGGCAGG AA TTAAAGCAGCGCAATCTGTA TTGAAAACCTGGAGGAACAA TAGAAGAAGCAAGAGCAGCTAAGGCGGCAGCTGAAAAAGCTA TATTGCAAGAAATTGAGAGTAGAGAAGCGCAA_3'	<i>Este estudio</i>

Tabla 6.2. *PTP3* Block® Gene Fragment. Fragmento del genoma de *N. ceranae* de 281 nucleótidos incluyendo las secuencias de las región de los cebadores NC-PTP3 subrayadas en rojo y la secuencia de la sonda UPL#72 en azul. Posición del fragmento en 500-780 nt del *gen gi|557790804|gb|KC520145.1| Nosema ceranae isolate 526 clone 11 polar tube protein 3 (PTP3) gene, partial cds sequence*, del *GenBank*. Una única secuencia de hasta 276 coincidentes y disponibles en el *GenBank* tiene un solo desajuste (*missmatch*) en la posición *prima reverse* (0,3% no coincidente).

Para detectar posibles contaminaciones en cada reacción de qPCR se analizaron en paralelo, dentro de la misma placa de reacción, los controles de extracción (NTC) y un control negativo. Además, en cada reacción se incluyó un control positivo con DNA de *N. ceranae* extraído de una muestra ambiental, con el fin de detectar posibles fallos de amplificación.

6.4.5. Análisis estadístico: nivel de infección de *N. ceranae* en relación con la edad de la abeja y el método de infección

El nivel medio de infección de *N. ceranae* se calculó en todas las cohortes de abejas disponibles y para cada grupo de ensayo (**Tabla 6.1**), a partir del valor medio de la concentración del gen *N. ceranae-PTP3*

a los 7 días después de la inoculación (d.p.i.). Cada cohorte de edad ensayada incluyó 30 abdómenes de abejas analizados individualmente y 10 abdómenes de abejas analizados de la misma manera, para los grupos: Grupo A y Grupo B, respectivamente.

Para evaluar el posible efecto de la edad y del método de infección, en el nivel de infección de cada cohorte de abejas ensayado, se utilizaron modelos lineales generalizados (GLMz de acuerdo con sus siglas en inglés). Los GLMz permiten modelizar variables que no cumplen los requisitos para el uso de modelos lineales estándar (i.e. normalidad y homocedasticidad), permitiendo la modelización de variables que siguen distribuciones diferentes a la Normal (Binomial, Poisson, Gamma, etc). Estos modelos también permiten combinar de forma flexible variables de distinta naturaleza (discretas, continuas). En este estudio, se consideró que la distribución que mejor se ajustaba a la variable respuesta - concentraciones medias de ADN de *N. ceranae* - fue la distribución Gamma.

A continuación, se compararon los niveles de infección de dos formas utilizando la prueba de Mann-Whitney (no paramétrica): a) entre las diferentes cohortes de edad dentro del mismo ensayo (Grupo A o Grupo B); y b) entre ambos ensayos comparando los datos agrupados de todas las cohortes según el método de infección (n=423 y n=108 para el Grupo A y B, respectivamente).

Finalmente, en el Grupo A (3 jaulas por cohorte de edad) también se evaluó el posible efecto del factor “jaula” en las relaciones estudiadas. Para ello se utilizó un caso particular de GLM (Modelos Lineales Generalizados Mixtos o GLMMs por sus siglas en inglés), que permiten la inclusión de factores aleatorios (jaula, en este caso) en el modelo.

Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa IBM SPSS Statistics V24 en la unidad de estadística del Área de Cálculo Científico SGAI-CSIC, de Madrid.

6.5. RESULTADOS

Todas las abejas utilizadas en el estudio fueron negativas a la infección por *Nosema* spp. al nacer, al igual que todos los controles negativos (NTCs y de PCR), indicando que no hubo contaminación cruzada durante las reacciones de qPCR. Asimismo, todas las abejas testigo sin infectar fueron negativas, por lo que no hubo contaminación entre las jaulas.

El número de abejas analizadas de forma individual por cada grupo de infección (Grupo A y Grupo B) y por cada grupo de edad de las abejas (cohorte), así como el porcentaje de abejas infectadas en cada uno de ellos, se muestra en la **Tabla 6.3**.

Cohorte	Porcentaje de abejas infectadas (7 d.p.i.)																		
	T	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Grupo A	n	46	30	29	24	-	30	30	30	30	21	30	30	30	30	30	30	19*	-
	%	0	100	97	100	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Grupo B	n	17	-	10	9	10	-	-	10	10	9	10	9	8	-	5	8	10	10
	%	0	-	100	90	100	-	-	100	100	90	100	90	80	-	50	80	10	100

Tabla 6.3. Número de abejas y porcentaje de abejas infectadas por *N. ceranae* a los 7 días post-inoculación (d.p.i.). Grupo A: abejas infectadas individualmente con esporas de *N. ceranae* (n≈ 30 abejas/ cohorte de edad); (*): n< 30 abejas debido a una alta mortalidad acumulada de las abejas a los 7 d.p.i. Grupo B: abejas infectadas colectivamente con la misma fuente de esporas (n≈ 10 abejas/ cohorte de edad). T: testigo.

La inoculación tuvo mayor éxito en el grupo infectado individualmente (n=424; 99,76%) que en el grupo infectado de manera colectiva (n=130; 90%). De hecho, tan solo en una abeja del Grupo A no se detectó la infección (día 1 p.e.). En el Grupo B la infección fue muy variable, con los menores niveles detectados en abejas infectadas a los 13 días p.e. y sobre todo a los 15 días p.e., cuando tras 7 días de la inoculación solo una abeja estaba infectada. Si bien, todas las abejas inoculadas a la edad de 16 días post-emergencia se infectaron.

La sensibilidad de la qPCR fue de 1×10^{-11} ng/μl de ADN de *N. ceranae-PTP3*. No se incluyeron en el análisis estadístico posterior los grupos control (T), las abejas que murieron, las muestras de abejas infectadas que no presentaron valores de Cp, ni la jaula del Grupo B que contenía abejas de 15 días p.e. que no habían consumido la totalidad de la solución azucarada con esporas en las 24 horas establecidas para la infección colectiva.

6.5.1. Nivel de infección en abejas de edades diferentes (Grupo A)

La **Figura 6.2** muestra los niveles medios de infección de las abejas del Grupo A. Como se puede ver en ella, la edad de las abejas en el momento de la infección influyó significativamente en el nivel de infección desarrollado a los 7 d.p.i. (test GLM, estadístico Wald Chi-Square, variable fija: método, co-variable: edad; $P < 0,001$).

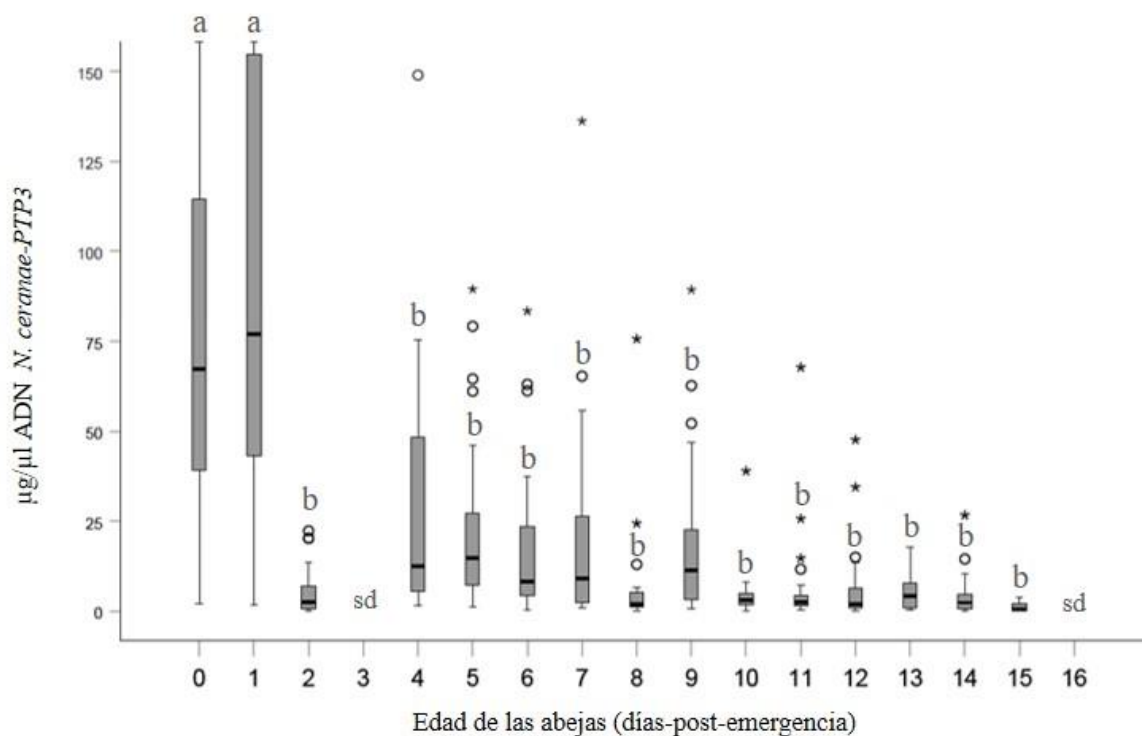


Figura 6.2. Concentración media de ADN del gen *N. ceranae-PTP3* ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a los 7 días tras la inoculación individual de las abejas del Grupo A. Las letras indican significancia estadística (prueba de Mann-Whitney de una cola, $P < 0,05$); sd: sin datos; *: casos extremos; °: casos muy poco probables.

Las abejas infectadas a edades de 0 a 24 horas p.e. registraron la mayor cantidad ADN del gen *N. ceranae-PTP3*. Las abejas infectadas a las 48 horas p.e. mostraron una disminución estadísticamente significativa (test de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$) en los niveles de infección detectados, llevando a una reducción de la carga parasitaria ≈ 20 veces menor respecto a las más jóvenes. Los niveles en las abejas infectadas a los 4 días p.e. registraron un nuevo aumento, aunque no fue estadísticamente significativo con respecto a la carga parasitaria de las abejas de 2 días p.e. y los niveles se mantuvieron por debajo en el resto de edades. La carga parasitaria se mantuvo en las cohortes de entre 4 y 9 días p.e. y los niveles más bajos se detectaron en abejas infectadas a edades más avanzadas, de 10 a 15 días p.e., con una tendencia indirecta al aumentar la edad de las abejas, llegando hasta un orden de magnitud inferior a las abejas inmediatamente más jóvenes. La distribución de la concentración media $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del patógeno fue estadísticamente diferente entre las abejas de 0 y 1 día p.e., respecto al resto de cohortes estudiadas.

La desviación estándar media observada en las cohortes estudiadas fue relativamente alta, debido a la gran variación entre los niveles de parasitación de cada abeja individual dentro de una misma cohorte. El efecto del replicado (jaula) no se demostró significativo en la respuesta, por lo que la media de la concentración del ADN-*N. ceranae* no se modificó cuando se agruparon los 30 valores registrados en las abejas de una misma edad.

6.5.2. Nivel de infección en relación con la edad y el método de infección (Grupo A vs Grupos B)

La **Figura 6.3** muestra la concentración media de ADN del gen *N. ceranae-PTP3* registrada en todas las cohortes inoculadas de forma colectiva y confirma la tendencia observada en el grupo anterior (**Figura 6.2**).

En este caso, en términos descriptivos puede decirse que la evolución de la infección fue muy similar al caso anterior; las abejas más jóvenes (1 día p.e.) tenían una mayor cantidad de ADN de *N. ceranae* que fue muy inferior en las abejas un día más de edad y a partir de entonces. Las abejas infectadas a las 2 día p.e. mostraron de media un desarrollo de la infección por el microsporidio ≈ 8 veces menor que las abejas de 1 día p.e. La parasitación media detectada en las abejas infectadas a los 3 días p.e. describió un nuevo aumento, quedando por debajo de la registrada en las abejas de 1 día p.e. y este nivel se mantuvo en las cohortes infectadas hasta los 10 días p.e. Los niveles medios más bajos fueron detectados en las abejas infectadas más maduras, de 11 a 16 días p.e., que nuevamente presentaron valores de un orden de magnitud inferior con respecto a las inmediatamente más jóvenes, confirmando la tendencia de infección al mostrar una cantidad de ADN de *N. ceranae* menor según se infectaban con más edad. En este grupo, la distribución de la concentración media no fue estadísticamente diferente entre las abejas inoculadas a distintas edades debido a la gran variabilidad entre las muestras analizadas.

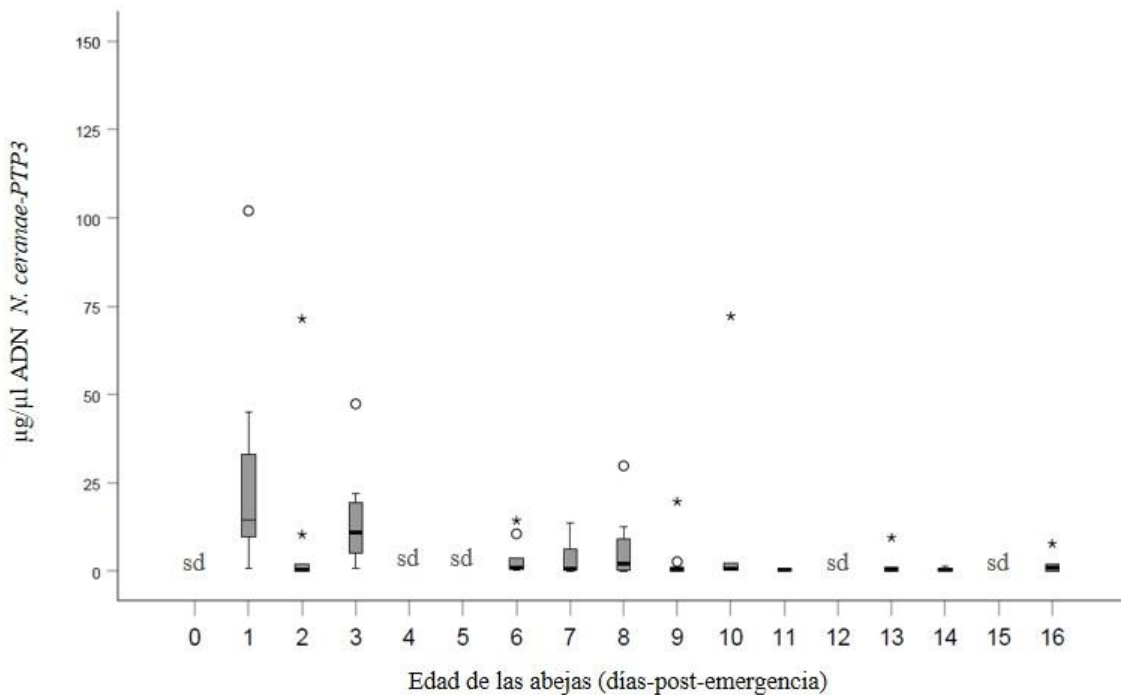


Figura 6.3. Concentración media de ADN del gen *N. ceranae-PTP3* ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a los 7 días tras la infección colectiva de las abejas del Grupo B. sd: sin datos; *: casos extremos; °: casos muy poco probables.

Los niveles de infección en el Grupo A (**Figura 6.2**) fueron en general superiores a los del Grupo B (**Figura 6.3**) en todas las abejas de la misma edad estudiadas. Cuando se compararon los valores agrupados por método de infección (Grupo A vs Grupo B), se observó una concentración media del microsporidio significativamente mayor (test GLM, estadístico Wald Chi-Square, variable fija: método, co-variable: edad; $P = 0,004$) en las abejas infectadas individualmente que en las infectadas colectivamente. A los 7 d.p.i., la mayor cantidad de ADN de *N. ceranae* de todo el estudio se observó en las abejas infectadas individualmente a la edad de 1 día p.e.

6.6. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar el desarrollo de la infección a través de la cuantificación de la carga de *N. ceranae*, en función de la edad de las abejas en el momento de la inoculación de esporas y del método empleado para la misma, sin analizar el efecto de la infección sobre la viabilidad de las abejas. Ambos factores: la edad de la abeja y el método de inoculación mostraron una influencia significativa en el curso y desarrollo de la infección por *N. ceranae* a los 7 d.p.i.

En este estudio, se administró una dosis de esporas que esperablemente garantizara la infección del 100% de las abejas (Forsgren y Fries, 2010; Suwannapong *et al.*, 2011; Fries *et al.*, 2013; Eiri *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015; McGowan *et al.*, 2016). Se usaron esporas procedentes de diferentes colmenas infectadas de forma natural para favorecer la heterogeneidad natural de la población regional de *N. ceranae* (Natsopoulou *et al.*, 2014; Doublet *et al.*, 2015a; Sagastume *et al.*, 2016). El diseño del trabajo incluía valorar los niveles de infección a los 7 d.p.i. para evitar una alta proliferación de esporas que pudiera igualarse entre todos los grupos en un experimento más largo (Fries, 1988) y para valorar la infección en un momento concreto, antes de que un gran número de abejas se mueran por la infección (Higes *et al.*, 2007; Pettis *et al.*, 2012), evitando el confinamiento prolongado que aumenta los niveles de *Nosema* spp. (OIE, 2018) y la mortalidad de las abejas (Maistrello *et al.*, 2008; Dickel *et al.*, 2018).

Los resultados de este estudio demuestran que el éxito de la infección y/o la capacidad de *N. ceranae* para multiplicarse dependen significativamente de la edad de las abejas en el momento de la infección y del método de administración de las esporas, en las condiciones controladas de laboratorio. Las abejas adultas jóvenes de 0-1 día p.e. fueron especialmente susceptibles al desarrollo de la infección y la carga parasitaria a los 7 d.p.i. fue significativamente más altas en dichas edades.

Es de destacar la baja carga parasitaria por *N. ceranae* detectada en abejas infectadas a los 2 días post-emergencia. Además, esta tendencia se observó en ambos grupos de estudio (abejas infectadas individual y colectivamente). Las diferencias en el nivel de infección de los grupos de abejas de edades diferentes no son atribuibles al origen de las esporas o de las abejas, ya que todas se alimentaron con la

misma mezcla de esporas de *N. ceranae* y todas procedieron de los mismos cuadros de cría mantenidos en el laboratorio durante 15 días.

De forma muy similar a los resultados observados en el presente trabajo, las reinas infectadas colectivamente a la edad de 1 día p.e. fueron más susceptibles a la infección por *N. ceranae* y presentaron niveles de infección significativamente más altos que las reinas infectadas a edades mayores, de 6 y 12 días p.e. (Chaimanee *et al.*, 2014). Por el contrario, en otro estudio las abejas obreras infectadas a los 5 días p.e. fueron las más susceptibles a los microsporidios y desarrollaron mayores niveles de infección que las abejas recién nacidas y las de 14 días p.e. (Huang *et al.*, 2015). No obstante, en este último trabajo debido a una mortalidad inusualmente alta de las abejas infectadas de 0-24 horas p.e., un gran número de jaulas de esta cohorte fueron excluidas del análisis de susceptibilidad (Huang *et al.*, 2015).

Los niveles de infección podrían estar relacionados con el establecimiento de la microbiota en el intestino de las abejas y con su competencia con el parásito por los recursos del hospedador, así como por los eventos fisiológicos inherentes al desarrollo de la abeja y por otros mediados por la acción patógena del propio microsporidio y la respuesta inmune del hospedador que varía con la edad.

De hecho es conocido que la microbiota de las abejas sufre modificaciones naturales particularmente importantes en la composición y sucesión de las comunidades intestinales durante los primeros 6 días de desarrollo adulto de las abejas (Powell *et al.*, 2014; Engel *et al.*, 2015; Anderson *et al.*, 2016). Estas modificaciones podrían perturbar o promover el ciclo biológico de los microsporidios (Maes *et al.*, 2016) e incluso la intensidad de la infección (Rubanov *et al.*, 2019). De hecho, la promoción de enfermedades en abejas melíferas, y por tanto la salud de la colonia, se ha propuesto que está asociada a cambios en la composición y abundancia de la microbiota intestinal de las abejas individuales (Maes *et al.*, 2016; Ptaszyńska *et al.*, 2016; Anderson y Ricigliano, 2017; Li *et al.*, 2017^a; Regan *et al.*, 2018).

Nuestros resultados mostraron las mayores diferencias en los niveles de infección entre las cohortes más jóvenes de 0 y 1 días después de la emergencia. Recientemente, se ha descubierto que las abejas recién nacidas comienzan la adquisición de su microbiota intestinal en cuestión de horas, quedando completamente colonizado al sexto día p.e. (Powell *et al.*, 2014; Engel *et al.*, 2015). El proceso de sucesión de la colonización bacteriana de los 3 a los 8 días post-emergencia sugiere resiliencia a cambios ambientales y nutricionales (Anderson *et al.*, 2016), aunque la abundancia relativa de algunos miembros de dicha comunidad microbiana está asociada al ambiente en el que se desarrollan (Jones *et al.*, 2018a) y la sucesión de las comunidades está fuertemente asociada a la casta y edad de las abejas (Anderson *et al.*, 2018).

Por otra parte, atendiendo a la estricta dependencia de la energía del hospedador para el desarrollo de los microsporidios (Burri *et al.*, 2006; Cornman *et al.*, 2009), la mayor disponibilidad de aminoácidos esenciales en abejas jóvenes (Crailsheim y Leonhard, 1997), podría favorecer la

multiplicación del parásito en las abejas más jóvenes (Weidner *et al.*, 1999; Burri *et al.*, 2006; Cornman *et al.*, 2009).

La inmunosenescencia en insectos más maduros (Hillyer, 2016) puede resultar en un aumento de la intensidad de la infección por *N. ceranae* en abejas melíferas más viejas (Roberts y Hughes, 2014). Es comúnmente aceptado que las abejas pecoreadoras (más mayores) son las que presentan la mayor frecuencia e intensidad de la infección en la colmena (Higes *et al.*, 2008a; Meana *et al.*, 2010; Smart y Sheppard, 2012; Li *et al.*, 2017b). Este hecho se explica al acelerarse al comportamiento de la pecorea en abejas infectadas por *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008b; Goblirsch *et al.*, 2013; Holt *et al.*, 2013; Lecocq *et al.*, 2016; Fleites-Ayil *et al.*, 2018). Además, dada la alta susceptibilidad de las abejas obreras más jóvenes en este estudio, es posible que exista algún tipo de estrategia en el súper-organismo para reducir la contaminación por *Nosema* spp. en el núcleo de la colmena donde se desarrollan las mismas, tal y como ha sido propuesto anteriormente para prevenir la infección de reinas jóvenes (Chaimanee *et al.*, 2014), abejas obreras jóvenes (Woyciechowski y Morón, 2009) y de los estadios inmaduros, capaces de desarrollar una infección (Eiri *et al.*, 2015; BenVau *et al.*, 2017) que, sin embargo, tiene un bajo riesgo de ocurrir incluso cuando la prevalencia de la infección en las abejas adultas es relativamente alta (ver capítulo anterior).

Además de los factores biológicos asociados a las diferentes etapas de vida de las abejas, la propia infección por *N. ceranae* también puede afectar a varios aspectos de la fisiología (metabolismo y respuesta inmunitaria), la morfología y el comportamiento de las abejas melíferas (Aliferis *et al.*, 2012; Dussaubat *et al.*, 2012; Goblirsch *et al.*, 2013; Holt *et al.*, 2013; Benvau and Nieh, 2017; Martín-Hernández *et al.*, 2017) y, de alguna manera, influir en la viabilidad e intensidad de la infección. Algunas evidencias sugieren que la manipulación parasitaria de la homeostasis intestinal y la inhibición de la renovación del epitelio intestinal (Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al.*, 2018) se correlacionan con un aumento en la susceptibilidad de las abejas a *N. ceranae* debido a una disminución de la capacidad para reparar el daño intestinal (Panek *et al.*, 2018). Las células epiteliales del ventrículo en abejas jóvenes a la edad de 1 a 2 días post-emergencia todavía experimentan un desarrollo morfogénico (Pipan y Rakovec, 1980), que se ha relacionado con la capacidad para acumular células apoptóticas infectadas en el intestino medio y el recto en las abejas más jóvenes infectadas experimentalmente (Kurze *et al.*, 2015).

Por otra parte, tanto la prevalencia de la infección como los niveles medios de infección fueron significativamente mayores en las abejas infectadas individualmente (Grupo A) que las infectadas colectivamente (Grupo B), lo que puede explicar resultados contradictorios en la bibliografía. En este sentido, se han descrito diferencias importantes en la ingesta de alimento entre abejas enjauladas juntas dentro de las primeras 48 horas, de manera que una abeja pudo ingerir hasta 8,8 veces más que la abeja que menos alimento ingirió en la misma jaula (Brodshneider *et al.*, 2017). Estas observaciones pueden

conducir a una exposición diferencial de las abejas a las esporas de *N. ceranae* durante las infecciones colectivas. De hecho, varios trabajos han descrito que, a los 12-15 días tras la administración colectiva de esporas a través del alimento, solo se infectan intensamente entre un 23,3% (Pettis *et al.* 2013) y un 78% (Lecocq *et al.* 2016) de las abejas enjauladas.

La trofalaxia favorece la transmisión de esporas de unas abejas a otras. Un estudio mostró que solo se encontraron tres abejas infectadas de cinco muestras analizadas en las jaulas de inoculación a los 5 d.p.i., mientras que todas las abejas muestreadas a los 10 y 15 d.p.i. fueron positivas a la infección (Badaoui *et al.*, 2017). No obstante, las abejas infectadas pueden estar menos dispuestas a compartir alimento con sus compañeras de jaula (Naug y Gibbs, 2009) o, por el contrario, mostrar un comportamiento significativamente mayor de trofalaxia (Lecocq *et al.*, 2016). A su vez, el número de abejas infectadas en una jaula y la carga parasitaria de las mismas son factores que influyen el intercambio de alimento entre abejas infectadas y no infectadas (Biganski *et al.*, 2017). El uso de 10 abejas melíferas recién nacidas y estrechamente emparentadas parece dar lugar a una distribución más uniforme del alimento en experimentos de laboratorio (Brodschneider *et al.*, 2017); sin embargo, esta alimentación preferencial no se observó si el grupo estaba formado por obreras de más de tres subfamilias (Moritz y Heisler, 1992), por lo que no parece influir en el comportamiento de la trofalaxia durante la alimentación colectiva de nuestro estudio.

Los niveles de infección de *N. ceranae* en ambos grupos de infección (Grupo A y Grupo B) mostraron una tendencia muy similar, con valores significativamente altos en abejas de 0-48 horas post-emergencia y menores al aumentar la edad de las abejas. Por lo tanto, considerando todas las variables anteriormente descritas que podrían modular la frecuencia e intensidad de la infección y el intercambio de alimento contaminado entre las abejas enjauladas, consideramos que la edad de una abeja en el momento de infección influye en el nivel de infección y en el desarrollo de la nosemosis, tal y como ha sido sugerido en infecciones por *N. apis* (Rueppell *et al.*, 2007; Woyciechowski y Morón, 2009). Además, los fallos de las infecciones colectivas (abejas no infectadas) fueron más elevados que los individuales, especialmente en las abejas jóvenes y podrían llevar a interpretaciones inadecuadas de los resultados, por lo que ambas variables deben ser consideradas en los estudios de laboratorio y especialmente cuando se comparan los resultados.

De manera similar, además de los experimentos en jaulas, se deben desarrollar más pruebas de campo con colmenas, ya que se han encontrado diferencias en la morfología, fisiología, comportamiento y expresión génica de las abejas melíferas (obreras y reinas) criadas *in vitro* en comparación con las naturalmente infectadas por microsporidios (Blacquièrre *et al.*, 2012; Ptaszyńska *et al.*, 2016; De Smet *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2018a; De Souza *et al.*, 2018).

Los resultados aquí presentados demuestran que la edad de las abejas y el método de infección son factores determinantes en el desarrollo de la nosemosis, por lo que es importante tenerlos en cuenta

para el diseño experimental de estudios de infecciones en laboratorio. Futuras líneas de investigación podrán ir encaminadas al estudio de las diferencias fisiológicas de las abejas de edades diferentes que expliquen la diferente susceptibilidad a la infección por *N. ceranae*.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la participación del equipo técnico del Laboratorio de Patología Apícola del Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA-IRIAF), con especial mención a Teresa Corrales, María Gajero, Virginia Albendea y Carmen Uceta quienes ayudaron a infectar a las abejas y a procesar las muestras en el laboratorio y a Javier Almagro y Jesús García por su participación en la toma de muestras de campo. La autora agradece la supervisión del análisis estadístico a la Dra. Laura Barrios, responsable del Área de Informática Científica de la unidad de estadística del SGAI-CSIC, de Madrid y las correcciones y explicaciones de la Dra. Cristina Fernández Aragón.

Este trabajo forma parte de varios proyectos subvencionados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (INIA): Urbietta-Magro; contratada superior investigador de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha a través de la ayuda FPI-INIA CC.AA: RTA2012-00076-C02-01. Asimismo, este trabajo contó con el apoyo de los fondos del INIA-FEDER (Proyecto nacional de investigación pública RTA2013-00042-06). No se declara ningún posible conflicto de interés con respecto a la investigación y autoría para la publicación del artículo de este capítulo enviado a la revista *Insetc* (31 de julio de 2019; insects-574839).



Chapter 3

Capítulo III

Patogenia de la infección con dosis bajas de *N. ceranae*

¿Cuáles son los efectos mantenidos de la infección por *N. ceranae* a lo largo de la infección?

Artículo científico en preparación

Manuscript in prep.

*Pathogenesis of infection with low doses of *N. ceranae*: What are the effects over the course of the infection?*

Co-authors: Urbieto-Magro A., Higes M., Meana A., Barrios L., Martín-Hernández R.

Key words: honey bee, *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, host-parasite-patogen interactions, immune response, host cell's cycle.

7.1. RESUMEN

Las abejas melíferas están en constante exposición a una amplia variedad de factores estresantes, como son parásitos y plaguicidas. Aunque nuestra comprensión del papel de los patógenos en la pérdida de colmenas de abejas melíferas ha mejorado, todavía no se conoce con exactitud cómo dichos agentes nosógenos afectan al sistema inmunológico de la abeja. Dada su alta prevalencia en nuestro país, en este trabajo se ha evaluado la respuesta inmune de abejas expuestas a *N. ceranae* a través del estudio de la expresión de algunos genes del ciclo celular y la apoptosis en tejidos infectados de las abejas.

Abejas adultas de 5 días de edad se inocularon individualmente con 40.000 esporas frescas del microsporidio y se incluyó un Grupo Testigo sin infectar. Se tomaron 5 abejas por grupo a los 5, 9 y 15 días después de la inoculación para analizar el nivel de expresión de genes relacionados con las interacciones parásito-huésped que están destinadas a asegurar la supervivencia del parásito dentro de la célula, en detrimento de la homeostasis celular de *A. mellifera*. El consumo de alimento y la mortalidad de las abejas se registraron diariamente por abeja y grupo ensayado.

La mortalidad fue mayor en el grupo infectado con el microsporidio y el consumo de alimento fue similar en el Grupo *N. ceranae* y Testigo. Se observó una modulación en la expresión de genes que participan en el ciclo celular y la apoptosis de los tejidos infectados, que mostraron un patrón variable a lo largo del tiempo transcurrido desde la infección.

Nuestros resultados confirman que *N. ceranae* disminuye la longevidad de las abejas infectadas aunque sin favorecer una mayor ingesta de alimento. Los mecanismos de modulación de la homeostasis celular son dinámicos en el tiempo.

SUMMARY

Honey bees are constantly exposed to a wide variety of stressors, such as parasites and pesticides. Although our understanding of the role of pathogens in the losses of honeybee hives has improved, it is not yet known exactly how they affect the bee's immune system. In this work, the immune response of bees exposed to *N. ceranae* and the expression of bee cell cycle genes in infected tissues have been evaluated, given the high prevalence of this pathogen in our country.

Adult 5-days-old bees were individually infected with 40,000 fresh spores of the microsporidium and an uninfected control group was included. Five bees per group were taken at 5, 9 and 15 days after inoculation, to analyze the level of gene expression related to parasite-host interactions that are intended to ensure the parasite's survival within the cell against the cell 'cycle and the homeostasis of *A. mellifera*. Feed consumption and bee mortality were recorded daily per bee and assayed group.

Mortality was higher in the microsporidium-infected group and feed consumption was similar in the infected and control group. Modulation was observed in the expression of genes involved in the cell cycle and apoptosis of the infected tissues, which showed a variable pattern throughout the time since infection.

Our results confirm that *N. ceranae* decreases the longevity of infected bees without favoring higher food intake. The modulation mechanisms of cellular homeostasis are dynamic along the time.

7.2. ANTECEDENTES

Diferentes trabajos demuestran que la infección experimental con esporas de *N. ceranae* acorta la vida de las abejas nodrizas enjauladas (p.ej.: Williams *et al.*, 2008b; Mayack y Naug, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Goblirsch *et al.*, 2013; Roberts y Hughes, 2015; Basualdo *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015), sin embargo es un efecto que no siempre se ha observado (Milbrath *et al.*, 2013; Retschnig *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2016).

Igualmente se ha observado un estrés energético en abejas infectadas, valorado como el mayor consumo de alimento en ensayos de laboratorio y relacionado directamente con la dependencia del microsporidio por la energía del hospedador (Mayack y Naug, 2009; Alaux *et al.*, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Vidau *et al.*, 2011). Este efecto de *N. ceranae* sobre el metabolismo de abejas infectadas se ha confirmado a nivel genético (Szumowski y Troemel, 2015), si bien, algunos trabajos han obtenido resultados contradictorios con este hecho (Aufauvre *et al.*, 2012, 2014).

Recientemente, se ha demostrado que *N. ceranae* puede secretar enzimas (hexoquinasas) que tienen la capacidad de fosforilar la glucosa de las células infectadas (Dolgikh *et al.*, 2019). Este hecho apoya otros anteriores en los que se sugiere que la infección por *N. ceranae* actúa directamente sobre el metabolismo celular del hospedador (Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al.*, 2018), lo que puede disminuir la capacidad para reparar el daño epitelial del ventrículo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la mortalidad de abejas infectadas con dosis moderadas de *N. ceranae*, establecer si existe estrés energético a estos niveles de infección y estudiar la modulación de genes del ciclo celular y la apoptosis, a lo largo del tiempo, durante transcurso de la infección.

7.3. HIPÓTESIS

La infección con dosis bajas de *N. ceranae* causa en las abejas efectos similares a los observados con dosis elevadas, produciendo en ellas un estrés energético, modulando la respuesta tisular durante la infección y afectando a su supervivencia.

7.4. MATERIAL Y MÉTODOS

7.4.1. Infección por *N. ceranae*

Se obtuvieron un total de 6 cuadros de cría operculada de 3 colmenas de *A. m. iberiensis* libres de *Nosema* spp. localizadas en el colmenar de Valdeavero (apartado 4.3), que se mantuvieron en una

incubadora de cría a 34°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). La ausencia de infección se confirmó en cada colmena empleando ≈ 30 abejas pecoreadoras (ver apartado 6.4.1) mediante triplex-PCR (apartados 5.4.5a y 5.4.6).

Las abejas obreras de 0-24 horas de edad se introdujeron en jaulas de malla de acero (20 abejas por jaula), que se pasaron a una incubadora diferente (oscuridad, $33 \pm 1^\circ\text{C}$ y 80% de H.R.) y se alimentaron diariamente *ad libitum* con un jarabe de sacarosa + 2% de Promotor L, tal y como se detalla en el apartado 4.4.2. Para este estudio se emplearon un total de 240 abejas distribuidas en 12 jaulas.

A los 5 días post-emergencia, las abejas de 6 jaulas ($n=120$ abejas adultas) fueron infectadas individualmente mediante la administración de un inóculo de infección con 40.000 esporas frescas de *N. ceranae*, previamente purificadas como se detalla en el apartado 6.4.2. Las abejas del Grupo Testigo (6 jaulas con 20 abejas cada una, $n=120$) fueron alimentadas individualmente con 2 μl de agua esterilizada sin esporas de *N. ceranae*, siguiendo el mismo procedimiento previamente detallado (apartado 6.4.3.a). En cada grupo, 3 jaulas se emplearon para evaluar la mortalidad y el consumo de alimento de las abejas y las 3 restantes se utilizaron para el estudio de la expresión de genes del metabolismo celular y la apoptosis de *A. mellifera*.

Las jaulas con abejas a las que se les administró *N. ceranae* (Grupo *N. ceranae*) se mantuvieron en una incubadora diferente a la utilizada para mantener las del Grupo Testigo (Memmert® Mod. IPP500 en ambos casos), con el fin de evitar la contaminación cruzada. Todas se mantuvieron bajo las mismas condiciones experimentales (oscuridad, $33^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y 80% de H.R.).

7.4.2. Mortalidad y estrés energético a lo largo del estudio

Diariamente se anotaron el número de abejas muertas y se retiraron de las jaulas. La demanda nutricional (estrés energético) de las abejas infectadas y no infectadas se determinó calculando la cantidad de alimento consumido diariamente, tal y como ha sido descrito anteriormente (Mayack y Naug, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2011). El consumo de alimento diario por jaula se cuantificó por diferencia de pesada en una balanza de precisión (Sartorius CP225D; sensibilidad: 0,01 mg) y el consumo diario por abeja se calculó asumiendo un consumo homogéneo por todas las abejas de una misma jaula en 24 horas.

7.4.3. Modulación de la expresión génica durante la infección temprana

El nivel de expresión de algunos genes relacionados con inmunidad y homeóstasis a lo largo del tiempo, se determinó en 5 abejas por grupo de infección a los 5, 9 y 15 después de la inoculación (d.p.i.). Para ello, las abejas se anestesiaron con CO_2 y se introdujeron individualmente en un tubo (1,5 ml) conteniendo un volumen suficiente de *RNA later*® (Sigma-Aldrich, No. R0901) que las cubriese completamente. Para facilitar la penetración del *RNA later*® en los tejidos internos de las abejas, se

realizaron ligeros cortes en el abdomen de las mismas antes de ser introducidas en los tubos. Las abejas se congelaron inmediatamente (-80°C) hasta la posterior extracción de ARN.

7.4.4. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las abejas muestreadas los días 5, 9 y 15 d.p.i. se atemperaron sin permitir la completa descongelación y se trasladaron a un nuevo tubo en hielo, que contenía 1 ml de reactivo de lisis QIAzol (Qiagen®; No. 79306) con 5 bolas de vidrio de 2 mm (Sigma®). Cada abeja completa se maceró individualmente en una estación de agitación *MagNA Lyser* (Roche®) a 25 Hz durante 5 minutos y se centrifugó 1 minuto a 6.000 g. Los macerados de las 5 abejas por grupo y punto de muestreo se juntaron en un tubo Falcon™ de 15 ml y se procesaron de forma conjunta desde este paso en adelante (i.e. una muestra por punto de muestreo y grupo). Cada tubo se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) y, posteriormente, se agregó 1 ml de cloroformo (Sigma-Aldrich, No. 67663), se agitaron vigorosamente a mano durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 6.000g durante 15 minutos a 4°C.

Se recogieron 3 ml de la fase acuosa que se transfirieron a un nuevo tubo (15 ml), al que se añadió un volumen de etanol al 70% en una proporción 1:1. La solución se mezcló cuidadosamente y se transfirió a una columna de extracción de *RNeasy Midi Kit*, Qiagen®. El ARN total de las muestras se aisló de acuerdo a las instrucciones del fabricante, incluyendo una fase de digestión de ADN con *DNase I free-RNase* (Qiagen®, No. 79254) con el fin de eliminar los residuos de ADN genómico. La elución del producto final de extracción se realizó en *RNase-Free H₂O*, en un volumen final de 150 µl.

Inmediatamente después, 5 µl del ARN eluido se utilizaron para generar el ADN complementario de primera cadena (ADNc) con el paquete comercial *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, No. 1708891), tal y como se detalla en el apartado 5.4.5.a. El ADNc sintetizado se diluyó 1:3 en *RNase-Free H₂O* y se almacenó a -20°C hasta su análisis. Tanto la pureza como la cantidad del ARN y de ADNc de cada muestra se evaluaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

7.4.5. Multiplicación de *Nosema spp.*

Todas las muestras se analizaron para detectar la presencia/ausencia de *N. ceranae* y comprobar la multiplicación activa del microsporidio. Para ello se seleccionó un gen de copia única (Gómez-Moracho *et al.*, 2013) que codifica para la subunidad mayor de la *proteína ARN polimerasa II (RPB1)*. Este gen se seleccionó por estar relacionado con la multiplicación activa de los microsporidios (Katinka *et al.*, 2001; Belkorchia *et al.*, 2017).

Los cebadores se diseñaron con *Primer Blast* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) usando como referencia la secuencias *Nosema ceranae* BRL01 *hypothetical protein* (XP_002995402). Los pares de cebadores NC-RPB1-F (5'-CATAAAAATGCACGTTTCAGTGG -3') y NC-RPB1-R (5'-CATGGAGAATGGGTTCCCTA -3') se seleccionaron para la amplificación específica de *N. ceranae-RPB1*. El diseño de la sonda (UPL 131; Roche®), así como la verificación de la especificidad *in silico* e *in vitro* del par de cebadores y la sonda se comprobaron siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 5.4.7, y tal y como se indica en la guía de buenas prácticas *MIQE* (Bustin *et al.*, 2009).

Todas las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 384 pocillos en un sistema de PCR en tiempo real *LightCycler® 480* (Roche) supervisado por la versión del software *LightCycler® 480 v1.5.1* (*Roche Diagnostics*). Todas las muestras de ADNc se analizaron por duplicado. También se incluyeron controles negativos de extracción de ARN y síntesis de ADNc (NTC), de la transcripción inversa (RTC) y de qPCR, como se ha explicado en el apartado 5.4.7.

7.4.6. Expresión de genes de *A. mellifera* (qPCR)

Se analizó la expresión de los 6 genes que se muestran en la **Tabla 7.1**. Las reacciones de qPCR, se realizaron utilizando *LightCycler® 480 Probes Master Mix* (Roche) en un volumen final de 10 µl, de acuerdo con las instrucciones del fabricante: cebadores a 500 nM, sondas a 10 nM (Roche) y 3,75 µl de la muestra (diluida 1:3). El programa consistió en un paso inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de: 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 segundo cada uno, y un paso final de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. La fluorescencia se midió en cada ciclo tras el paso de elongamiento. En cada ciclo de amplificación se determinó el valor del ciclo máximo de cada curva (Cp), a través del algoritmo estadístico de Máximo de la 2ª derivada. Los valores de Cp se normalizaron restando el valor de Cp del gen de referencia de cada muestra de ADNc correspondiente.

En cada reacción se incluyó una curva estándar para cada par de cebadores analizados, incluido el gen de referencia, utilizando una serie de diluciones decimales realizada sobre ADN de abeja.

Nombre cebador	Categoría	Secuencia (5' - 3')	Fuente
<i>RING</i>	Ciclo celular	F: CCGAGCGTGTCCGATTG	<i>Martín-Hernández et al., 2017</i>
	<i>RING finger protein 19 (Dorfin)</i>	R: CCACACGTGCTGACAAATCC	
		P: TATCATGTCAGTTTCATCGAGGGGATCA	
<i>E Cyclin</i>	Ciclo celular	F: TGGGAGATCAAAAAGACTATTACTCAAAG	<i>Martín-Hernández et al., 2017</i>
	<i>G1/S-specific Cyclin E</i>	R: TTGCTCGCATTCTTGGTTGTA	
		P: TAAATCCACAATAATGTTTCAAAGGCACCCAA	
<i>Buffy</i>	Apoptosis	F: CATTGCCGATGCCTGAAAA	<i>Martín-Hernández et al., 2017</i>
	(similar a <i>Drosophila</i>)	R: CCGACGAAATCCAGACATTGA	
	<i>Bcl-2-like protein</i>	P: TTCTGAAATGGCAGGAAATTCACCGGA	
<i>BIRC5</i>	Apoptosis	F: CTTCTGACAAATTCGTGCAATCC	<i>Martín-Hernández et al., 2017</i>
	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5</i>	R: GGGTTCTTTCTTACCACCCACTAC	
		P: TAGCGGATGGCTGCTGGTTTT	
<i>EF1</i>	Factor Elongación	F: CTGGTACCTCTCAGGCTGATTGT	<i>Budge et al., 2015</i>
	(HK)	R: GCATGCTCAGGAGTTTGCCATTCT	
	P: TTGCTTCGAACCTCTCCAGTACCAGCAGCAACA		
<i>Actin</i>	β-Actina	F: GTATGCCAACACACTGTCCTTTCTG	<i>Martín-Hernández et al., 2017</i>
	(HK)	R: AAGAATTGACCCACCAATCCA	
	P: CCTAGCACCATCCACCATGAAAATTAAGATCATC		

Tabla 7.1. Cebadores utilizados en las reacciones qPCR con señal sonda que codifican para genes de *A. mellifera*. Nombre de los cebadores: primer/Locus y su identificación (Gen ID). Secuencia: cada par de cebadores (F *-forward-* y R *-reverse-*) y de la sonda (P *-probe-*) en sentido 5' - 3'. Sondas TaqMan® - BHQ®. HK: gen de referencia.

7.4.7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics V24 (servicio prestado por la unidad de estadística del Área de Cálculo Científico SGAI-CSIC, Madrid). En todos los casos, $P < 0,05$ se consideró significativo.

a) Mortalidad de las abejas

La muerte acumulada de las abejas en el Grupo *N. ceranae* y Testigo se estandarizó en ambos casos a 50 abejas iniciales. El efecto de la infección por *N. ceranae* en la tasa de supervivencia de las abejas melíferas (1- tasa de mortalidad) se analizó utilizando el método de Kaplan-Meier como estimador no paramétrico de la función de supervivencia. Se realizó una prueba Log-Rank (Mantel-Cox) para evaluar la homogeneidad entre los grupos infectado y testigo y la pendiente de la función de supervivencia. Finalmente, se comparó la proporción de mortalidad a tiempo final entre los dos grupos mediante un Test de proporciones de 2 muestras.

b) Estrés energético del hospedador

En cada grupo, infectado y testigo, se calculó la media de consumo de alimento (mg) por abeja y día. Para determinar las diferencias estadísticas en el consumo de alimento (estrés energético) entre ambos grupos. Se consideró el consumo acumulado por abeja a lo largo del tiempo y se determinó a tiempo final con un intervalo de confianza del 95%.

c) Expresión de genes del ciclo celular y la apoptosis de *A. mellifera*

La cuantificación de la expresión de todos los genes en los 3 puntos del estudio (5, 9 y 15 días después de la inoculación) se normalizó respecto a la expresión de un gen de referencia (HK, por sus siglas en inglés *HouseKeeping*) en todas las muestras estudiadas. Este se incluyó en cada placa de reacción.

La expresión relativa de cada gen de *A. mellifera* (**Tabla 7.1**) se calculó utilizando el programa de Expresión Relativa: *REST 2009* - versión 2.0.13 (<http://www.gene-quantification.de/download.html>, Qiagen), que utiliza la prueba de aleatorización de reasignación fija por pares (Pfaffl, 2001 y Pfaffl *et al* 2002).

Cada grupo de abejas infectadas por *N. ceranae* se comparó con el correspondiente Grupo Testigo en cada punto de muestreo (5, 9 y 15 días post-infección). Se tuvo en cuenta la eficacia de cada reacción de qPCR que se calculó a partir de la curva estándar, tal y como ha sido descrito anteriormente (Pfaffl,

2001). El nivel de importancia para determinar de la regulación ascendente (activación o sobre-expresión) o descendente (supresión o sub-expresión) de cada gen también se determinó utilizando el software *REST* 2009 (V 2.0.13.).

7.5. RESULTADOS

Todas las abejas del Grupo Testigo fueron negativas a la infección por *N. ceranae* a lo largo del estudio, demostrando que no hubo contaminación cruzada entre las distintas jaulas. Todas las muestras del conjunto de 5 abejas inoculadas individualmente con 40.000 esporas de *N. ceranae* fueron positivas a la infección en todos los puntos del muestreo.

7.5.1. Mortalidad de las abejas y estrés energético

La tasa de mortalidad de las abejas de los 2 grupos de estudio según el modelo de Kaplan Meier y la ponderación a 50 abejas/grupo se muestra en la **Figura 7.1**. El experimento se dio por finalizado el día 18 después de la inoculación de esporas, momento en el que todas las abejas del Grupo *N. ceranae* murieron (día 24 después de la emergencia).

La evolución de la tasa de mortalidad (porcentaje de mortalidad acumulada) del grupo de abejas sin infectar, Grupo Testigo, no alcanzó la mediana teórica del ensayo. Por el contrario, el grupo de abejas infectadas por *N. ceranae* alcanzó dicha mediana en torno al día 12 post-infección, momento en el que el 50% de las abejas infectadas había muerto. Por ello, la evolución en el modelo de supervivencia fue estadísticamente significativo (test de Log Rank - Mantel-Cox-, Chi-cuadrado, $P < 0.001$), lo que indica que la infección por el microsporidio aumentó significativamente la mortalidad de las abejas obreras enjauladas. La diferencia en la proporción final de muerte de las abejas en el Grupo Testigo fue del 28% (95% IC 16,2-40,4) frente al 100% en el Grupo *N. ceranae* (**Figura 7.1**).

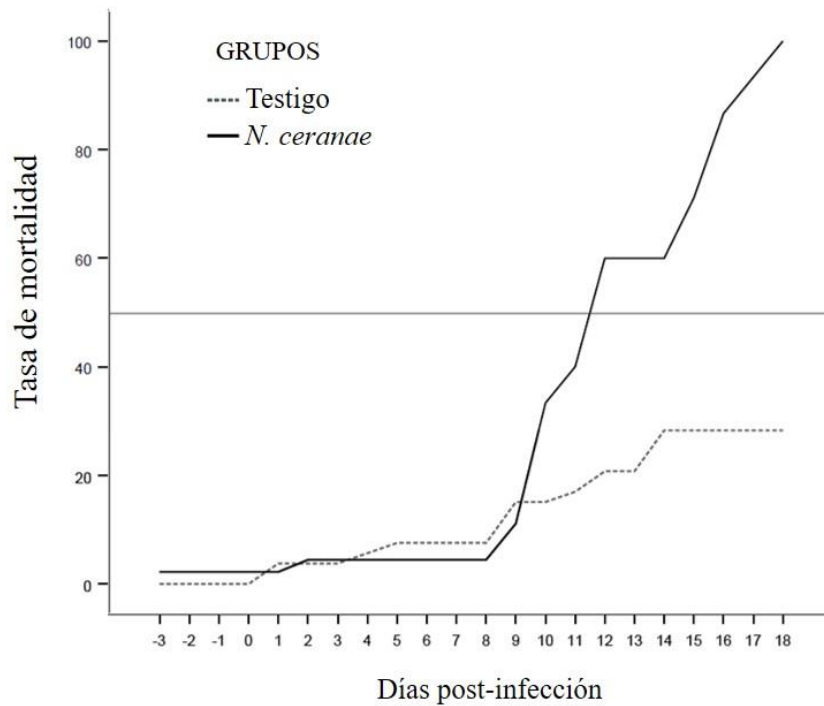


Figura 7.1. Efecto de la alimentación con esporas de *N. ceranae* en la tasa de mortalidad (% de muerte acumulada) de abejas obreras adultas. Función de supervivencia de Kaplan Meier.

7.5.2. Estrés energético

La media del consumo de alimento ingerido diariamente por las abejas del Grupo Testigo ($22,66 \text{ mg} \pm 8,43 \text{ mg}$) y del Grupo *N. ceranae* ($21,19 \text{ mg} \pm 7,6 \text{ mg}$) no mostró diferencias significativas (**Figura 7.2**). El mayor consumo medio (mg alimento/abeja) se observó en las abejas del Grupo *N. ceranae* durante las primeras 24 horas después de la inoculación con esporas del microsporidio (DO).

En la **Figura 7.3** se representan los valores medios del consumo de alimento acumulado por abeja en los grupos infectado y testigo a lo largo del estudio. El consumo medio acumulado de las abejas testigo fue mayor que el de las infectadas por *N. ceranae* pero las diferencias diarias no fueron estadísticamente significativas (T-test, $P = 0,569$).

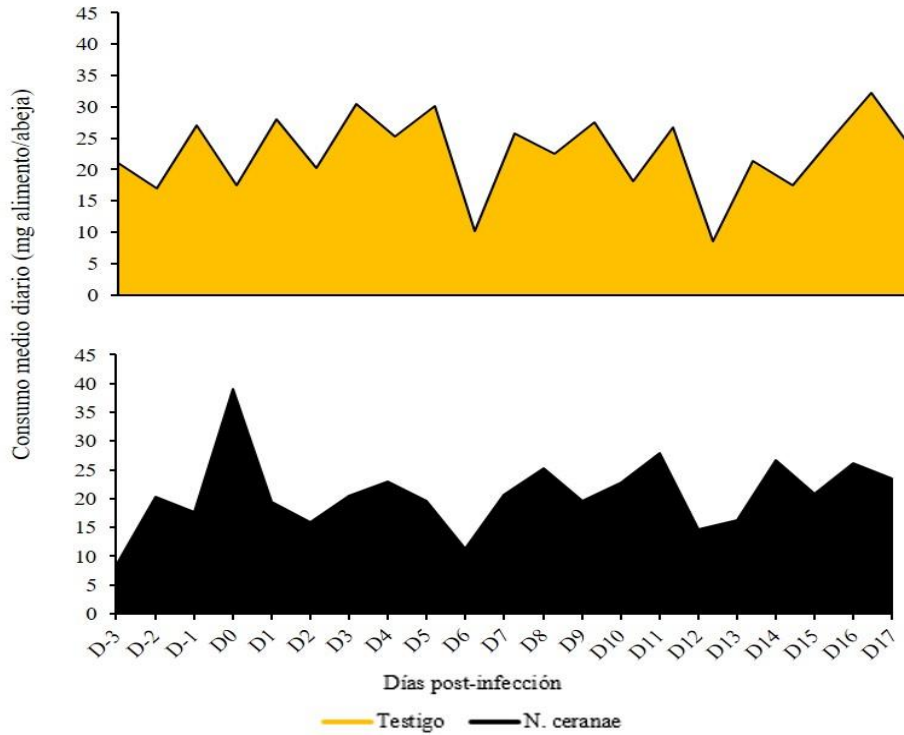


Figura 7.2. Consumo medio diario por abeja. Cantidad de alimento consumido (mg) por abeja y día a lo largo del estudio. Se asume que la ingesta de alimento es homogénea entre todas las abejas de una misma jaula.

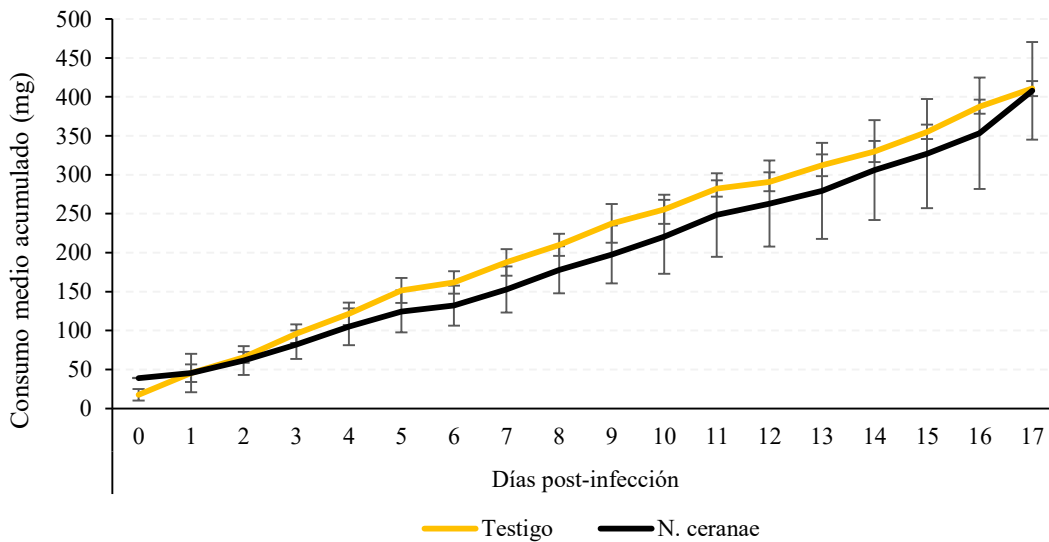


Figura 7.3. Demanda nutricional de las abejas. Cantidad media de alimento consumido (mg) por abeja, desde el momento de la inoculación hasta el final del estudio. Se asume que la ingesta de alimento es homogénea entre todas las abejas enjauladas juntas. Cada punto corresponde a los datos de 3 jaulas.

7.5.3. Evaluación expresión de genes del ciclo celular y la apoptosis

Para determinar la presencia/ausencia de infección de las abejas por *N. ceranae* y/o *N. apis* se consideró como valor positivo cualquier valor de Cp por encima del nivel umbral ($Cp \leq 40$), mientras que la no amplificación (ningún valor de Cp) se valoró como la ausencia de infección.

Respecto al gen de referencia, un número considerable de muestras no mostraron amplificación del gen *Actin* (gen de *A. mellifera*) en el conjunto de datos, por lo que este fue descartado para análisis posteriores. Por ello, para evaluar la expresión de los genes de estudio los valores de Cp de las muestras estudiadas se normalizaron restando el valor de Cp del gen de referencia que codifica para el *factor de elongamiento 1 (EF1; Martín-Hernández et al., 2017)*, de cada muestra de ADNc correspondiente.

Los niveles de variación en la modulación de los genes del ciclo celular (*RING* y *E-cyclin*) y la apoptosis (*Buffy* y *BIRC5*), en las abejas infectadas por *N. ceranae* respecto a las no infectadas, y en cada punto de muestreo (5, 9 y 15 d.p.i.), se muestran en la **Figura 7.4**.

La modulación de todos los genes de *A. mellifera* estudiados varió a lo largo del tiempo. Los mayores niveles de expresión diferencial (**Figura 7.4**) en los grupos infectados por *N. ceranae* respecto a los testigos se observaron a los 5 d.p.i. En este momento el gen *RING* y *E-cyclin* se expresaron >2 veces significativamente por encima en el Grupo *N. ceranae*. A los 9 y 15 d.p.i la expresión de estos genes fue prácticamente igual en el Grupo *N. ceranae* y no infectado, si bien esta leve diferencia fue significativa a los 9 d.p.i.

Respecto a *Buffy*, se observó a los 5 y 15 d.p.i. el mismo nivel de sobre-expresión que fue estadísticamente significativa ($>1,5$ veces). Esta tendencia no se pudo observar a los 9 d.p.i. dada la ausencia de datos en el Grupo *N. ceranae*, que no mostró ningún valor de amplificación (Cp) en dicho momento.

Por último, la expresión de *BIRC* a los 5 y 9 d.p.i. fue similar y solo ligeramente superior en el Grupo *N. ceranae* (de forma significativa a los 5 d.p.i. y no significativa a los 9 d.p.i.) y sin ninguna diferencia a los 15 d.p.i.

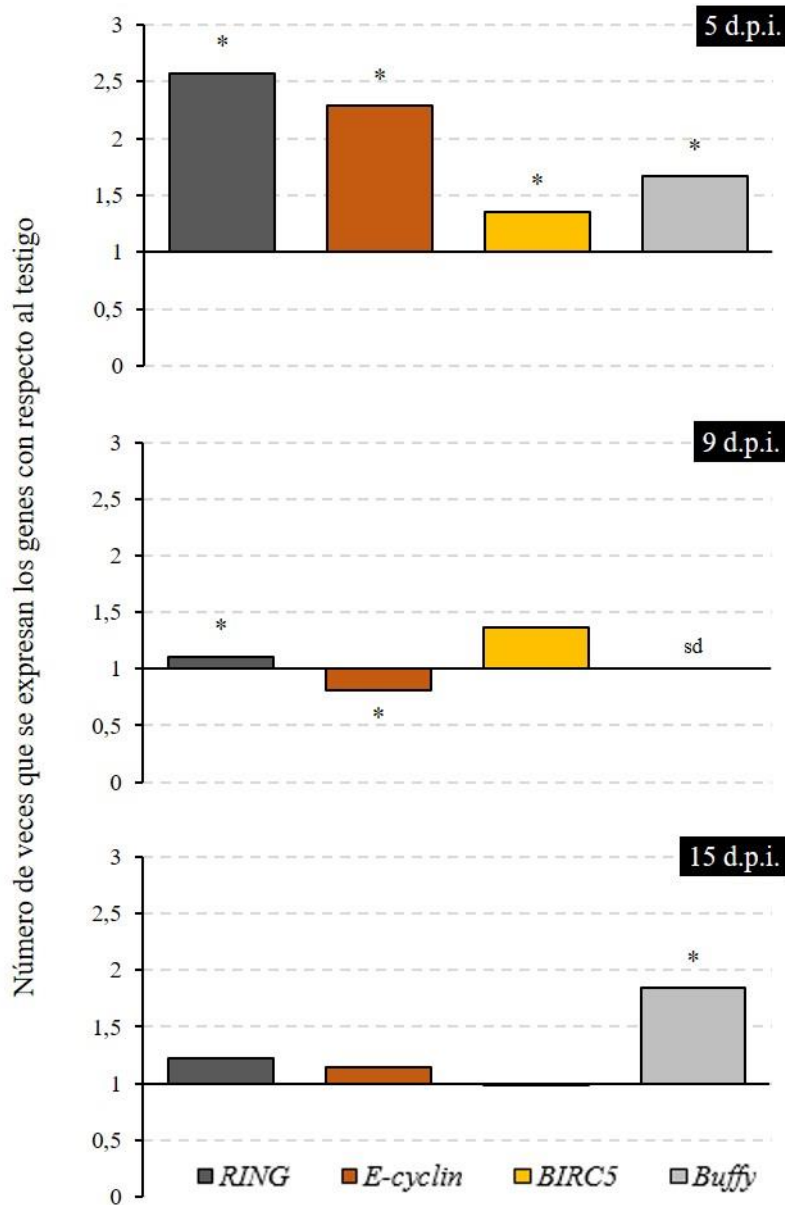


Figura 7.4. Modulación de genes en abejas infectadas por *N. ceranae* a lo largo del tiempo. Nivel de sobre-expresión (>1) o sub-expresión (<1) de los genes *RING*, *E-cyclin*, *BIRC5* y *Buffy* corregidos con la eficiencia de cada reacción y normalizados con la expresión del gen *EF1* en cada punto del muestreo (n= 5 abejas analizadas conjuntamente por grupo y punto de muestreo). *: regulación estadísticamente significativa (P < 0,05). sd: sin datos.

7.6. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que la infección por *N. ceranae* disminuye significativamente el tiempo de supervivencia de las abejas infectadas a partir del día 12 después de la infección. La mayor parte de los trabajos experimentales desarrollados con abejas adultas son consistentes con este resultado (Williams *et al.*, 2008b; Mayack y Naug, 2009; Alaux *et al.*, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012; Schwarz y Evans, 2013; Goblirsch *et al.*, 2013; Roberts y Hughes, 2015; Basualdo *et al.*, 2014; Roberts y Hughes, 2014; Aufauvre *et al.*, 2014; Doublet *et al.*, 2015b; Huang *et al.*, 2015) y sólo en unos pocos ensayos de laboratorio la mortalidad de las abejas infectadas por el microsporidio no fue significativamente mayor a la de las abejas de la misma edad sin infectar (Milbrath *et al.*, 2013; Retschnig *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2016; Badaoui *et al.*, 2017).

En nuestro estudio el 100% de las abejas infectadas individualmente con 40.000 esporas de *N. ceranae* murieron a los 18 días después de la infección. La supervivencia de las abejas en este estudio fue superior a la publicada anteriormente para *A. m. iberiensis* (Martín-Hernández *et al.*, 2011). En dicho trabajo las abejas infectadas con dosis de 50.000 esporas alcanzaron el 67% de mortalidad a los 7 días después de la inoculación. Asimismo, nuestros resultados fueron ligeramente superiores a los obtenidos por Lecqoc *et al.* (2016) e inferiores a los observados por Panek *et al.* (2018) y analizados en otras subespecies de *A. mellifera*. Las diferencias en la dosis de esporas administrada a las abejas, en la duración de los experimentos (tiempo post-inoculación al que se analiza), en la edad de las abejas y el método de infección (ver capítulo anterior), e incluso en la diversidad de los alimentos (Porrini *et al.*, 2011a; Di Pasquale *et al.*, 2013) y en el número de abejas por jaula (Brodschneider *et al.* 2017), podrían explicar las diferencias observadas en la tasa de mortalidad de las abejas infectadas en una variedad de experimentos (ver **Tabla 2.2**, página 25).

Bajo nuestras condiciones, no se observaron diferencias significativas en el consumo medio diario de alimento ingerido por las abejas infectadas y no infectadas. Tampoco se observaron diferencias en el consumo medio acumulado al final del ensayo, desde el momento de la infección. No obstante, el mayor consumo se registró en las abejas infectadas durante las 24 horas siguientes a la inoculación. Si bien, este resultado no es atribuible a la infección del epitelio ventricular, dado que no se produce hasta las 36-72 horas después de la administración de esporas de *Nosema* spp. (Fries *et al.*, 1988; Rodríguez-García, 2017). Previamente se ha señalado que la infección por *N. ceranae* aumenta las necesidades energéticas de las abejas, lo que puede contribuir a su menor supervivencia (Mayack y Naug 2009). La demanda de energía del parásito aumenta el requerimiento de energía para la abeja, lo que se ve reflejado en el aumento del estrés nutricional y energético en el hospedador que conduce a una ingestión de alimentos ricos en glucosa (Mayack y Naug, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Aliferis *et al.*, 2012; Vidau *et al.*, 2014). Asimismo, el efecto de la infección sobre el metabolismo de las abejas puede verse

reflejado en la pérdida acelerada de lípidos (Aliferis *et al.*, 2012), carbohidratos y proteínas (Mayack y Naug, 2010; Aufauvre *et al.*, 2014; Vidau *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019) y en el aceleramiento del comportamiento de la pecorea en respuesta al estrés energético (Li *et al.*, 2018, 2019) o en el aumento de la respuesta del reflejo de extensión de la probóscide ante el estímulo con jarabe azucarado en ensayos con abejas enjauladas (Badaoui *et al.*, 2017). Sin embargo, no existen datos acerca de la demanda de alimento valorada como el consumo acumulado del jarabe administrado por abeja y a lo largo del tiempo, dado que todos los trabajos anteriores evalúan el estrés energético, por este u otros métodos, pero solo en momentos concretos, ya sea en abejas adultas jóvenes experimentalmente infectadas con dosis de esporas de *N. ceranae* mucho mayores (Martín-Hernández *et al.*, 2011; Vidau *et al.*, 2014; Badaoui *et al.*, 2017) o en abejas pecoreadoras recogidas de colmenas naturalmente infectadas (Mayack y Naug, 2009; Mayack y Naug, 2010; Aliferis *et al.*, 2012).

En el estudio de Martín-Hernández *et al.* (2011) se describieron diferencias significativas en el consumo de alimento a los 1, 2 y 6 días después de la inoculación. Por otra parte, Vidau *et al.* (2014) observaron que, a los 10 días después de la infección, *N. ceranae* causó una "modificación metabólica del hábitat" en el intestino medio de la abeja, favoreciendo su desarrollo al aumentar la disponibilidad de nutrientes y reducir la defensa de la abeja melífera. Recientemente, Li *et al.* (2019) observaron una sobre-expresión de genes de las glándulas hipofaríngeas, inducida por la infección por *N. ceranae* a los 10 días después de la infección, que sugiere un desequilibrio de nutrientes y energía en las abejas. En esta misma línea, las secreciones de enzimas hexoquinasa de *N. ceranae* promueven la generación de glucosa-6-fosfato, la cual debería aumentar la síntesis de ATP en el hospedador, otros nucleótidos, aminoácidos y lípidos necesarios para el crecimiento del parásito, así como el transporte de nuevas moléculas de glucosa a las células infectadas (Dolgikh *et al.*, 2019). Por lo tanto, aunque las abejas infectadas por *N. ceranae* presentan diferentes signos de estrés energético inducido por la parasitación, el mecanismo que emplean las abejas para su compensación a través de una mayor ingesta de alimento no ha sido demostrado en este estudio. No obstante, la pérdida de apetito (anorexia) es un comportamiento común que exhiben los animales enfermos cuando se enfrentan a un desafío inmunológico, esta respuesta puede ser una estrategia adaptativa conservada para aumentar la probabilidad de sobrevivir a una infección (Kyriazakis *et al.*, 1998; Ayres y Schneider, 2009; Kaminski *et al.*, 2018).

Por otra parte, las células epiteliales del intestino de los insectos forman parte de la primera línea de defensa ante la infección por patógenos internos y en el caso de los microsporidios de las abejas son las células diana de la infección parasitaria (Higes *et al.*, 2007 y capítulo siguiente). Uno de los mecanismos de defensa frente a la infección es generalmente la muerte celular programada que, sin embargo, puede estar inhibida en las abejas infectadas por *N. ceranae* (Dussaubat *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013; Higes *et al.*, 2013; Aufauvre *et al.*, 2014; Kurze *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al.*, 2018). La infección por microsporidios perturba la homeostasis

intestinal de las abejas (Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al.*, 2018) y produce una disminución de la renovación celular, que está relacionada con la reducción de su longevidad (Panek *et al.*, 2018), pero se desconocen con exactitud las diferentes vías por las que se inhibe la apoptosis (Martín-Hernández *et al.*, 2017), que pueden cambiar con la edad de las abejas y con el momento de infección o la intensidad y duración de los agentes estresantes (Schwarz y Evans, 2013; Li *et al.*, 2017b; Li *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que a los 5 días después de la infección hay una sobre-expresión de genes relacionados con vías de inhibición de la apoptosis (*BIRC5* y *Buffy*) y del gen *E-ciclin*, que favorece la transición de la fase del ciclo celular G1 a la fase S en el hospedador. El aumento de la expresión de estos tres genes se asocia con una reducción del número de células que finalmente entran en apoptosis en los tejidos infectados (Martín-Hernández *et al.*, 2017). Sin embargo, la activación de la expresión del gen *RING* (*RING-finger protein 19* o *Dorfin*), relacionado con la degradación de toxinas y proteínas patógenas intracelulares, a los 5 d.p.i. junto con la supresión del gen del ciclo celular *E-ciclin* a los 9 d.p.i. (si bien fue muy bajo), sugieren una modulación a la inversa que podría favorecer la apoptosis de las células del hospedador (Martín-Hernández *et al.*, 2017). No obstante, nuestros resultados muestran que la inhibición de la apoptosis por estas vías de expresión génica puede inducirse en abejas infectadas por *N. ceranae*, incluso cuando no se ha inducido previamente la apoptosis con cicloheximida. El mecanismo de regulación de los genes estudiados muestra un patrón complejo y dinámico a lo largo del tiempo, que sugiere que las abejas utilizan una variedad de tácticas para hacer frente al estrés de la infección por *N. ceranae*, tal y como se ha sugerido anteriormente (Kurze *et al.*, 2015; Martín-Hernández *et al.*, 2017).

De forma similar, un estudio anterior muestra que las modificaciones en las vías de la apoptosis varían con el tiempo transcurrido tras la infección (Kurze *et al.*, 2015). En este estudio se comparó el nivel de apoptosis entre abejas procedentes de líneas resistentes y susceptibles a *N. ceranae*, la tasa de apoptosis disminuyó al aumentar el tiempo tras la infección a pesar de que los niveles de expresión génica de algunos factores pro-apoptóticos importantes aumentaron al aumentar el tiempo de infección. Lo que propone que, en las abejas melíferas sensibles a la infección por *N. ceranae*; la activación de otros mecanismos como las vías de supervivencia celular podría estar modulando la tasa de regeneración celular (Kurze *et al.*, 2015). Otros estudios también han informado que *N. ceranae* causa inmunosupresión diferencial a lo largo del tiempo (Antunez *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017b) y en función de la carga parasitaria de las abejas (Chaimanee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017b). La carga de esporas aumenta al aumentar el tiempo de infección y en las abejas infectadas naturalmente los niveles de esporas de *Nosema* spp. se han correlacionado positivamente con la respuesta inmune de las abejas (Li *et al.*, 2017b).

El resultado final para una célula infectada es la muerte, pero comprender los mecanismos que la producen es importante para determinar el grado en el que la abeja puede limitar la propagación de la infección y cómo el patógeno ejerce algún control sobre los procesos metabólicos de su hospedador (Goblirsch, 2018; Dolgikh *et al.*, 2019). Es claramente difícil identificar qué vía es responsable de la renovación de las células infectadas sobre la base de la expresión génica (Dussaubat *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016; Panek *et al.*, 2018), ya que la regulación de varias proteínas implicadas en estas vías se produce tanto a través de la fosforilación como de la reubicación de proteínas (Panek *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha sugerido que la variación en la expresión de genes de *N. ceranae*, que aumenta al aumentar el tiempo transcurrido tras la infección (Huang *et al.*, 2016; Huang y Evans, 2016), asimismo podrían dirigirse a los genes del hospedador y regular la expresión de las abejas (Huang *et al.*, 2016).

Los resultados de este trabajo muestran que la infección por *N. ceranae* aumenta significativamente la mortalidad de las abejas sin favorecer un aumento en el consumo de alimento a lo largo del tiempo bajo condiciones experimentales. Asimismo, las vías de señalización estudiadas se alteran en abejas infectadas por *N. ceranae* con un patrón complejo durante el transcurso de la infección. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos subyacentes por los que se modifica la homeóstasis intestinal en las abejas infectadas y no parece que haya un mecanismo único por el que sucede, y si haya más de uno, y sea dinámico en el tiempo. Se necesitan más estudios para comprender mejor la manera en la que la infección por *N. ceranae* altera gravemente la fisiología de las abejas y para conocer los posibles mecanismos de compensación de las células, y de las abejas, ante el estrés prolongado de la infección.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración del equipo técnico del Laboratorio de Patología del CIAPA-IRIAF de Marchamalo, con especial mención a Teresa Corrales, María Carmen Rogerio, María Gajero, Virginia Albendea y María Benito quienes ayudaron a infectar a las abejas y a procesar las muestras en el laboratorio y a Javier Almagro y Jesús García por su participación en la toma de muestras de campo. La autora agradece la ayuda de la Dra. Lina De Smet (Universidad de Gante) en el análisis con geNorm y la supervisión del análisis estadístico a la Dra. Laura Barrios, responsable del Área de Cálculo Científico de la unidad de estadística del SGAI-CSIC, de Madrid.

Este trabajo forma parte de varios proyectos subvencionados por el INIA (Urbieta-Magro; FPI-INIA CC.AA: RTA2012-00076-C02-01) y fondos INIA-FEDER (RTA2013-00042-06). No se declara ningún posible conflicto de intereses con respecto a la investigación, autoría y divulgación de este capítulo.



Chapter 4

Capítulo IV

Tropismo tisular de *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en abejas obreras (*Apis mellifera*) infectadas experimentalmente

¿Qué tejidos de las abejas melíferas son realmente susceptibles de la infección por microsporidios?

Publicado en la revista "Veterinary Pathology"

Aceptado: 18 junio 2019; DOI: 10.1177/0300985819864302

Published in the Veterinary Pathology

Accepted: 18.06.2019; DOI: 10.1177/0300985819864302

Tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in experimentally infected worker honey bees (*Apis mellifera*)

Co-authors: Higes M., García-Palencia P., Urbieto-Magro A., Nanetti A., Martín-Hernández R.

Key words: honey bee, *Apis mellifera*, *Microsporidia*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, tissue tropism, histological study.

8.1. RESUMEN

Los microsporidios *N. apis* y *N. ceranae* son patógenos de las abejas melíferas, pero poseen diferentes características en cuanto a la sintomatología, pronóstico y prevalencia de la enfermedad que causan en las abejas. Aunque el epitelio ventricular se considera el tejido diana de ambas especies en las abejas, observaciones indirectas como la detección molecular del ADN de *N. ceranae* en tejidos diferentes llevaron a especular que esta especie también puede afectar a otros órganos y tejidos, lo que podría explicar algunas de las diferencias entre estas dos especies.

Para investigar el tropismo de *Nosema* spp. por los tejidos de las abejas melíferas, se llevaron a cabo infecciones de laboratorio controladas mediante la administración oral de esporas frescas de ambas especies en dosis de 50.000 o 100.000 esporas por abeja. Varios órganos del aparato digestivo (esófago, ventrículo, íleon y recto), excretor (túbulos de Malpighi), circulatorio (aorta y corazón), respiratorio (tráquea torácica), exocrino (glándulas hipofaríngeas, mandibulares y salivales, labiales, cefálicas y torácicas) y de los sistemas sensorial y nervioso (cerebro, ojos y estructuras nerviosas asociadas y ganglios del nervio torácico), así como el cuerpo graso de las abejas infectadas, fueron examinados mediante microscopía de óptica y electrónica de transmisión a los 7, 10 y 15 días después de la infección.

Ambas especies de *Nosema* infectaron las células del tejido epitelial del ventrículo de las abejas, así como los grupos de células regenerativas del mismo tejido, mientras que la luz del íleon y el recto contenían esporas de los microsporidios sin mostrar signos manifiestos de infección o daño tisular. De manera similar, en los otros órganos examinados, no se detectaron lesiones celulares ni parásitos en ninguna de las etapas de su ciclo biológico. Estos resultados confirman el alto tropismo de ambas especies para el epitelio ventricular en abejas obreras adultas. Por tanto, estas observaciones histopatológicas directas no apoyan la hipótesis de que las especies de *Nosema* tienen tropismo para órganos de abejas melíferas distintos del ventrículo.

SUMMARY

The microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* are major honey bee pathogens that possess different characteristics in terms of symptoms, evolution and transmission. Although the ventricular epithelium is generally considered the target tissue of both species, indirect observations led to speculation that *N. ceranae* may also target other structures, which might explain at least some of the differences between these two species.

To investigate the tropism of *Nosema* spp. for honey bee tissues, we performed controlled laboratory infections by orally administering fresh spores of either species at doses of 50,000 or 100,000 fresh mature spores. Organs from the digestive (oesophagus, ventriculus, ileum, rectum), excretory (Malpighian tubules), circulatory (aorta, heart), respiratory (thoracic tracheas), exocrine (hypopharyngeal, mandibular and labial, cephalic, thoracic salivary glands) and sensory/nervous (brain, eyes and associated nerve structures, thoracic nerve ganglia) systems, as well as the fat body, from the infected bees were examined by light and electron microscopy 7, 10 and 15 days post-infection.

Both *Nosema* species were found to infect epithelial tissue and clusters of regenerative cells in the ventriculus, whereas the ileum and rectum contained spores of the microsporidia but they failed to show overt signs of infection. No stages of the parasites or cellular lesions were detected in the other organs tested, confirming the high tropism of both species for the ventricular epithelium. These direct histopathological observations fail to support the hypothesis that these two *Nosema* species exhibit tropism for honey bee organs other than the ventriculus.

8.2. ANTECEDENTES

Las características típicas de la infección por *N. apis* incluyen diarrea y mortalidad observable de abejas alrededor de la colmena con una clara estacionalidad, mientras que la infección por *N. ceranae* hace que la colonia disminuya y colapse en todas las estaciones (COLOSS, 2009).

Todos los individuos adultos de una colonia, independientemente de su casta y sexo, son susceptibles a la infección por *Nosema* spp. Existen pruebas de que *N. ceranae* también puede infectar a los estadios inmaduros (Traver y Fell et al., 2011; Rodríguez et al., 2014; Eiri et al., 2015) y órganos diferentes al ventrículo en abejas adultas infectadas (Chen et al., 2009; Gisder et al., 2010; Copley y Jabaji et al., 2012).

Si las pruebas sugirieran que *N. ceranae* no es un tejido específico, se requeriría una revisión de nuestra comprensión de su ciclo de vida, allanando el camino para nuevas hipótesis sobre la patogénesis diferencial y la epidemiología de las dos especies de *Nosema*.

En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar las lesiones histológicas y las etapas del ciclo de vida de *Nosema* en tejidos extraventriculares después de la infección experimental con estos parásitos.

8.3. HIPÓTESIS

Los microsporidios *N. apis* y *N. ceranae* infectan principalmente las células epiteliales del ventrículo de las abejas adultas pero además pueden infectar otros órganos o células. Ambos microsporidios pueden presentar tropismo tisular diferencial.

8.4. MATERIAL Y MÉTODOS

8.4.1. Abejas obreras

El material biológico fue recogido de colonias de *A. m. iberiensis* criadas en el centro de investigación CIAPA-IRIAF (Marchamalo, España). Se extrajo un cuadro de cría de abejas obreras con estadios inmaduros de abeja operculada de una colonia libre de *Nosema* spp. (Colmenar de Valdeavero) y se mantuvo en una incubadora (Memmert, UNB400) a 34°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) en el laboratorio hasta que emergieron las abejas obreras adultas (Martín-Hernández et al., 2017).

Las abejas recién nacidas se transfirieron a jaulas en grupos de 25 abejas, que se mantuvieron en una incubadora a 33°C. Las abejas enjauladas fueron diariamente alimentadas *ad libitum* con una solución fresca de sacarosa (50% p/v en dH₂O) combinada con 2% Promotor L[®] (Calier Lab.). La ausencia de infección de la colmena por *Nosema* spp. se analizó empleando 30 abejas pecoreadoras (apartado 6.4.1) mediante triplex-PCR como se ha descrito anteriormente (apartados 5.4.5a y 5.4.6).

8.4.2. Obtención de esporas purificadas

Las esporas viables e infectantes de *N. apis* y *N. ceranae* se obtuvieron de colonias de *A. m. iberiensis* infectadas de forma natural, tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 6.4.2). Brevemente, abejas pecoreadoras naturalmente infectadas fueron recogidas de la piquera de la colmena, previamente bloqueada, y se maceraron en grupo en dH₂O. Posteriormente, se centrifugaron y el sedimento de esporas maduras se purificó por gradiente de Percoll[®] isotónico al 95%. Estos primeros lotes de esporas purificadas fueron confirmados como compuestos de una sola especie de *Nosema* por triplex-PCR (apartados 5.4.5a y 5.4.6) y se conservaron un mes a -20°C.

Para homogeneizar y revitalizar las esporas, abejas de 5 días de edad nacidas en el laboratorio se alimentaron con el mismo jarabe que se indicó anteriormente que contenía 1 millón de esporas (recuentos según Cantwell, 1970) de los primeros lotes diferenciados por especie de *Nosema*: 100 abejas recibieron esporas de *N. ceranae* y 100 abejas recibieron esporas de *N. apis*. Estas abejas fueron mantenidas en el laboratorio durante dos semanas (apartado 4.4.2). Posteriormente, se anestesiaron con CO₂ y se procesaron como se describe en el apartado 6.4.2 para obtener un segundo lote de esporas purificadas por Percoll[®] de ambas especies de *Nosema*. Estos segundos lotes de infección fueron almacenados a temperatura ambiente durante menos de 24 horas hasta su uso.

8.4.3. Infección de abejas con esporas de *Nosema* spp.

La infección experimental de las abejas enjauladas se realizó individualmente por vía oral cuando las abejas del estudio tenían 5 días de edad (5 días post-emergencia). Se ofreció a cada abeja agua (2 µl) con una micropipeta (apartado 6.4.3.a) que contenía 50.000 o 100.000 esporas frescas de los lotes de esporas revitalizadas de *N. ceranae* o *N. apis* (Higes *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2011, 2017). Las abejas que no ingirieron la dosis completa fueron descartadas. Otras abejas del mismo origen recibieron 2 µl de agua destilada sin esporas y sirvieron como testigos no infectados. La dosis administrada fue intencionadamente alta en comparación con la dosis mínima infectante anteriormente descrita para otras subespecies de *A. mellifera* (ID100 = 1 x 10⁴), especificada para ambas especies de *Nosema* (Forsgren y Fries, 2010). Esta alta dosis de esporas administrada pretendía promover una rápida

aparición de la infección y así favorecer una propagación más amplia a los tejidos, para poder ser detectada, en su caso, en aquellos tejidos para los cuales los patógenos mostraran un tropismo menor.

8.4.4. Grupos estudiados: dosis de *Nosema* spp. y microscopía de MO y MET

De acuerdo a la dosis de esporas administrada y a la especie infecciosa se establecieron un total de cinco grupos experimentales, cada uno compuesto por tres jaulas (réplicas) que contenían 25 abejas cada una. Los grupos se catalogaron de la siguiente manera: A5, A10, C5, C10 y T0 (**Tabla 8.1**), donde la letra indica la especie de *Nosema* (A= *N. apis*; C= *N. ceranae*; T= testigo no infectado) y el número corresponde al coeficiente de la concentración de esporas (5= 5×10^4 , 10= 10×10^4 y 0= 0). Los grupos con letras (especies) diferentes se mantuvieron en incubadoras separadas a 33°C para evitar infecciones cruzadas. Se les suministró agua azucarada al 50% con 2% de Promotor L[®] *ad libitum* como alimento durante todo el estudio.

En la **Tabla 8.1** se muestran las condiciones del ensayo y las muestras de abejas empleadas en el estudio. A los 7 y 10 días después de la inoculación de esporas (d.p.i.), cuando se esperaba un aumento notable de la infección ventricular en las condiciones de cría empleadas (Martín-Hernández *et al.*, 2009), se tomaron 8 abejas al azar de cada jaula; cuatro de estas abejas fueron utilizadas para estudios histológicos por microscopía óptica (MO) y las otras cuatro fueron preparadas para el análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET). A los 15 d.p.i., debido a la mortalidad registrada en este punto del experimento, de los grupos A5, C5 y T0 solo se pudieron tomar 4 abejas (dos se utilizaron para estudios de MO y las otras dos para estudios de MET) y no hubo abejas disponibles de los grupos A10 y C10.

Grupo	CONDICIONES DEL ENSAYO			MUESTREO DE ABEJAS (jaulas x abejas)					
				MO			MET		
	<i>Nosema</i> ssp.	Dosis esporas	Jaula=replicado (jaulas x abejas)	7 d.p.i	10 d.p.i	15 d.p.i	7 d.p.i	10 d.p.i	15 d.p.i
A5	<i>N. apis</i>	50.000	3 x 25	3 x 4	3 x 4	3 x 2	3 x 4	3 x 4	3 x 2
A10	<i>N. apis</i>	100.000	3 x 25	3 x 4	3 x 4	-	3 x 4	3 x 4	-
C5	<i>N. ceranae</i>	50.000	3 x 25	3 x 4	3 x 4	3 x 2	3 x 4	3 x 4	3 x 2
C10	<i>N. ceranae</i>	100.000	3 x 25	3 x 4	3 x 4	-	3 x 4	3 x 4	-
T0	H2O (control)	0	3 x 25	3 x 4	3 x 4	3 x 2	3 x 4	3 x 4	3 x 2

Tabla 8.1. Condiciones del ensayo y diseño del muestreo. Grupos de abejas de 5 días infectadas experimentalmente de manera individual por *N. apis* o *N. ceranae* con 5 o 10×10^4 esporas purificadas (cuatro niveles: especie y dosis): A5, A10, C5, C10. Testigo no infectado: T0. Muestreo de abejas a los 7, 10 y 15 días post-infección (d.p.i). Análisis histopatológico de tejidos de las abejas infectadas por microscopía (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

Se diseccionó separadamente el canal alimentario; para ello con unas pinzas se sujetó el último segmento abdominal desde la parte posterior de cada abeja (previamente anestesiada con CO₂) y ejerciendo una ligera tracción se extrajo íntegro el tracto digestivo abdominal: la ampolla rectal, el íleon, el ventrículo con los túbulos de Malpighi unidos, el proventrículo y el intestino anterior (nectario). Estos tejidos se fijaron inmediatamente para su estudio por MO o MET.

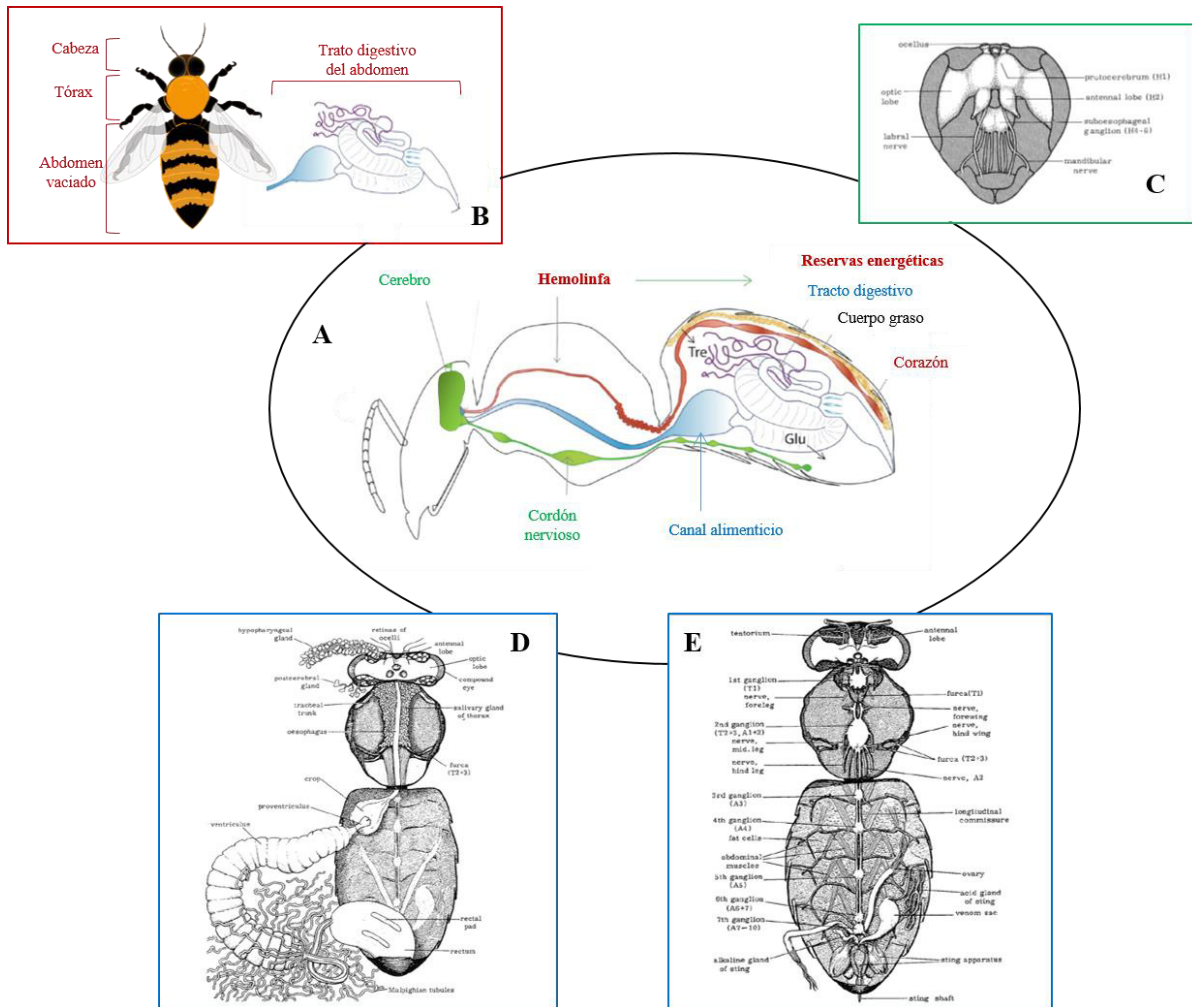


Figura 8.1. Anatomía y disección de *A. mellifera*. **A:** Diagrama que ilustra la posición del cerebro y el cordón nervioso a lo largo de la cabeza, tórax y abdomen (verde); sistema circulatorio de la hemolinfa, corazón y la aorta (rojo); sistema digestivo (azul); cuerpo grasso del abdomen (marrón) y túbulos de Malpighi (morado). Tre: trehalosa; Glu: glucosa. **B:** Disección de las muestras de abeja en cuatro secciones: tracto digestivo abdominal, cabeza, tórax y abdomen vaciado. **C:** Detalle de la posición del cerebro y los nervios principales de la cabeza, vista anterior. **D:** Cabeza, tórax y abdomen con detalle de las glándulas de la cabeza, de los músculos de vuelo del tórax, de los órganos subyacentes y del tracto digestivo (estómago anterior, proventrículo, ventrículo con los tubos de Malpighi unidos, íleon y recto). **E:** Detalle de la posición de los nervios principales de la cabeza: vista dorsal con las glándulas removidas; tráquea torácica removida para exponer el sistema nervioso, el aparato urinario y el piso del abdomen. Fuente: original modificado de Carreck *et al.*, 2013 (originales de C, D y E) y Even *et al.*, 2012 (A modificado y detalle de B).

A continuación, cada muestra de abeja fue dividida en tres secciones: cabeza, tórax y el resto del abdomen vaciado para la posterior visualización microscópica de los siguientes tejidos y órganos: el cerebro, los ojos y las estructuras nerviosas asociadas; las glándulas hipofaríngeas, mandibulares y salivales (labial, cefálica y torácica); el esófago; los ganglios del nervio torácico; la tráquea torácica; la aorta y el corazón y el cuerpo graso. La **Figura 8.1** muestra la posición de estos tejidos y órganos según la guía COLOSS sobre métodos estándar para la anatomía y disección de *Apis mellifera* (Carreck *et al.*, 2013).

Las tres secciones (cabeza, tórax y abdomen vaciado) y el tracto digestivo abdominal obtenidos fueron preparados para la visualización de los tejidos por MO y MET como se describió anteriormente (Higes *et al.*, 2008a; García-Palencia *et al.*, 2010). Brevemente, para MO los órganos se fijaron en formol tamponado al 10% durante 24h, se incluyeron en parafina y se tiñeron secciones de 4 µm con hematoxilina-eosina (HE). Para MET, los tejidos se prefijaron en una solución de glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2,5%, se lavaron tres veces en PBS y se realizó un post-fijado en tetróxido de osmio al 1%, seguido de un deshidratado en una serie ascendente de acetona y las secciones completas se incluyeron en resina Epon-Araldite[®]. Los cortes semifinos (0.5 µm con micrótomos) se tiñeron con azul de metileno al 1% en una solución de borato de sodio al 4% y se estudiaron primero bajo un fotomicroscopio (Olympus[®] Vanox AHB53) con el propósito de preseleccionar áreas de tejido representativas. Posteriormente, el bloque Epon[®] fue cortado (con micrótomos) para obtener secciones ultrafinas de 60 nm. Las rejillas con las secciones tisulares ultrafinas fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% en agua e incubadas con una solución de citrato de plomo-Reynold durante 10 minutos. Finalmente, estas secciones se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico JEOL JEM 1010 a un voltaje de aceleración de 80-100 kV.

8.5. RESULTADOS

La ausencia infección por las especies de *Nosema* se confirmó en la colmena utilizada como fuente de abejas libres de infección: la muestra de abejas pecoreadoras analizada y los controles de extracción (NTC) fueron negativos a *Nosema* spp. y el IPC produjo un amplicón del tamaño esperado (Martín-Hernández *et al.*, 2012; ver apartado 5.4.6).

8.5.1. Hallazgos clínicos

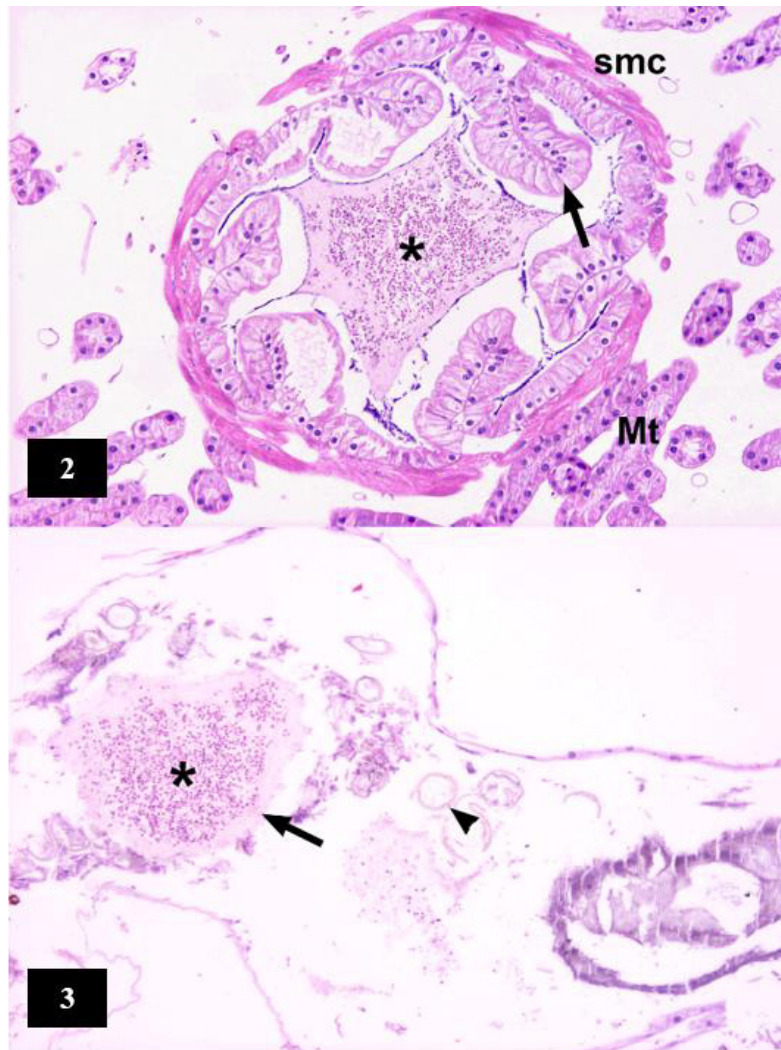
Durante los primeros 10 días del experimento no se observaron síntomas clínicos relevantes en las abejas infectadas (como diarrea, inflamación del abdomen, etc.), ni hubo mortalidad de las abejas enjauladas en este tiempo. Sin embargo, a los 15 d.p.i. las abejas infectadas con cualquiera de ambos microsporidios en las dosis más altas de esporas mostraron cierta mortalidad y, efectivamente, ninguna abeja del grupo C10 sobrevivió hasta ese momento y solo 2 del grupo A10 sobrevivieron, por lo que no se tomaron muestras de esos grupos en el día 15 d.p.i.

8.5.2. Histología

Los resultados histológicos fueron similares en los diferentes grupos e independientemente de la especie de microsporidio empleada para la infección. Como tal, no se detectaron lesiones intracelulares o diferentes etapas en el ciclo biológico de *N. apis* o *N. ceranae* en ningún órgano o tejido cefálico o torácico de las abejas adultas infectadas. Además, no se observaron lesiones ni formas parasitarias en los diferentes órganos de la cavidad abdominal diferentes del ventrículo y sólo se encontraron esporas maduras en el lumen del íleon y de la ampolla rectal, aunque no se detectaron signos manifiestos de infección de las células ni lesiones celulares en estas localizaciones (**Figuras 8.2-8.3**).

Tan solo en las células del ventrículo de las abejas infectadas se detectaron alteraciones tisulares específicas y diferentes etapas del ciclo biológico de ambas especies de *Nosema*, pero no en las abejas del grupo testigo (T0), verificándose en estas la ausencia de infección. Algunas de las lesiones observadas en las abejas infectadas por *N. ceranae* se correspondieron a las descritas anteriormente (Higes *et al.*, 2007) y fueron similares para ambas especies de *Nosema*, cuyas diferentes etapas del ciclo intracelular se distribuyeron ampliamente a lo largo del tejido epitelial del ventrículo.

En las abejas de los grupos C5 y C10, la mayoría de las células epiteliales del ventrículo estaban muy parasitadas y presentaban un citoplasma muy dilatado, con un núcleo intensamente teñido y desplazado apicalmente. Fue común observar los restos de células epiteliales globulares segregados y llenos de esporas maduras, así como esporas libres en el lumen ventricular donde, además, las membranas peritróficas a menudo aparecían rotas y fragmentadas (**Figura 8.4**). Por el contrario, la musculatura circular y longitudinal del intestino medio se observó siempre libre de formas parasitarias y morfológicamente inalterado (**Figura 8.4**).



Figuras 8.2 y 8.3. Abejas obreras (*A. m. iberiensis*) infectadas con diferentes dosis de *N. apis* y *N. ceranae*. Tinción: Hematoxilina-eosina (HE). Hematoxilina: catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura (p. ej. núcleos celulares); Eosina: aniónica o ácida, tiñe componentes básicos (acidófilos) en diferentes tonos rosados (p. ej. citoplasma celular).

Figura 8.2. Abeja infectada con 50.000 esporas de *N. ceranae* a los 15 d.p.i. Sección transversal a través del íleon rodeado de varios túbulos de Malpighi (Mt). Detalle de las células epiteliales eosinofílicas no infectadas (flecha) del íleon y de un gran número de esporas maduras en el lumen (asterisco). Una fina capa de células musculares esqueléticas (smc) es visible en la periferia. Aumento: 10x.

Figura 8.3. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. apis* a los 10 d.p.i. Sección longitudinal del recto con algunos restos fecales que contienen numerosas esporas de *N. apis* (asterisco) rodeadas de la membrana peritrófica (flecha) y polen (punta de flecha). Aumento: 10x.



Figura 8.4. Ventriculo de una abeja infectada con 50.000 esporas de *N. ceranae* a los 15 d.p.i. Células epiteliales intensamente infectadas con *N. ceranae*. En esta imagen son visibles algunas membranas peritróficas (asterisco) en el lumen del intestino, así como los grupos de células regenerativas limitados dentro de los nichos de los pliegues epiteliales. Gotas citoplasmáticas llenas de esporas sobresalen en el lumen (flecha negra), con algunas células epiteliales mostrando una moderada vacuolización (flecha gris) y otras células presentan un núcleo apical desplazado (punta de flecha). En la periferia es visible una fina capa de miocitos, así como algunas tráqueas (t) y túbulos de Malpighi (Mt). Tinción: HE. Aumento: 20x.

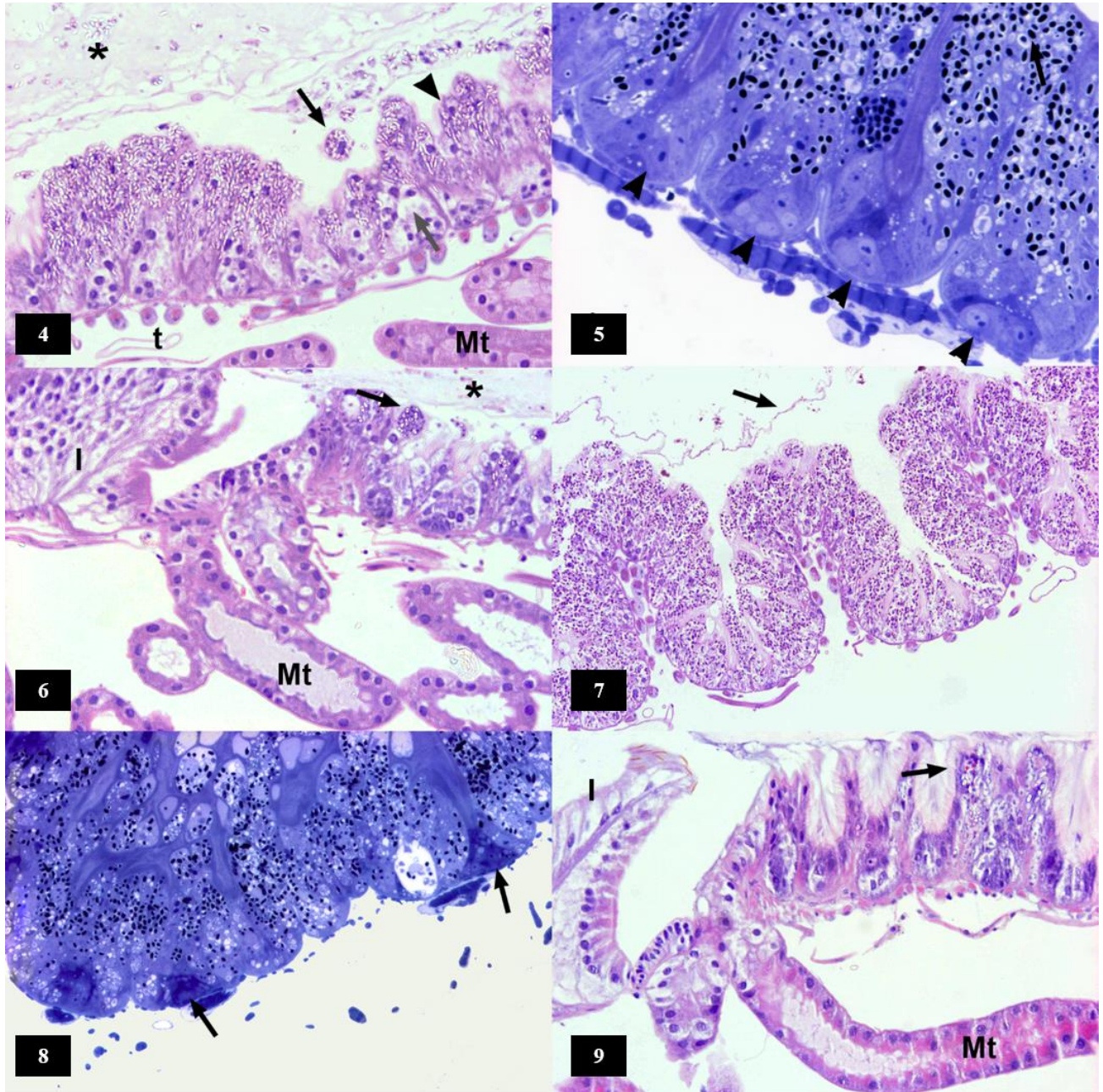
Figura 8.5. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. ceranae* a los 10 d.p.i. Tejido del ventriculo muy infectado. Esporas maduras basófilas en la región apical de las células epiteliales (flecha). Estructuras parasitadas más grandes, heterogéneas y teñidas en el fondo de los pliegues y de las células basales regenerativas, lo que sugiere diferentes etapas del ciclo biológico del microsporidio (punta de flecha). Tinción: Azul de metileno (de tipo básico no diferencial, aumento de contraste). Aumento: 20x.

Figura 8.6. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. ceranae* a los 10 d.p.i. Región pilórica y de la apertura de los túbulos de Malpighi en el íleon donde las células epiteliales (flecha) y el lumen (asterisco) del ventriculo contienen esporas de *N. ceranae*. Las células epiteliales no infectadas pueden verse tanto en el íleon (I) como en los túbulos de Malpighi (Mt). Tinción: HE. Aumento: 20x.

Figura 8.7. Ventriculo de una abeja infectada con 50.000 esporas de *N. apis* a los 10 d.p.i. Células epiteliales intensamente infectadas con diferentes estadios intracelulares del parásito y restos de membranas peritróficas (flecha) en el lumen. Tinción: HE. Aumento: 10x.

Figura 8.8. Intestino de una abeja infectada con 100.000 esporas de *N. apis* a los 7 d.p.i. Numerosas células epiteliales y algunos grupos de células regenerativas (flechas) están infectadas con diferentes etapas de *N. apis*. Esporas maduras basofílicas en la región apical de las células epiteliales y estructuras parasitarias heterogéneas (inmaduras o vegetativas) teñidas en el fondo de los pliegues y en las células regenerativas. Tinción: Azul de metileno. Aumento: 20x.

Figura 8.9. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. apis* a los 10 d.p.i. Detalle de la apertura de los túbulos de Malpighi (Mt) en el íleon. Las esporas de *N. apis* pueden verse solo en las células epiteliales (flecha) del ventriculo, mientras que las células epiteliales no infectadas son evidentes tanto en el íleon (I) como en los túbulos de Malpighi (Mt). Tinción: HE. Aumento: 20x.



Figuras 8.4 a 8.9. Imágenes del ventrículo infectado (intestino medio) de abejas obreras adultas (*A. m. iberiensis*) con diferentes dosis de esporas frescas de *N. ceranae* (4-6) y *N. apis* (7-9).



Figuras 8.10 a 8.15. Imágenes de hematoxilina-eosina (HE) de diferentes órganos y tejidos sanos, no infectados, en abejas obreras infectadas experimentalmente con esporas frescas y maduras de *N. apis*.

Figura 8.10. Sección longitudinal del cerebro (punta de flecha) y sacos traqueales (flecha) de la cabeza. Aumento: 10x.

Figura 8.11. Varios conductos glandulares (asteriscos), glándulas salivales (punta de flecha) y células musculares esqueléticas (flecha). Aumento: 20x.

Figura 8.12. Glándulas salivales (asterisco) y células musculares esqueléticas (flecha) del tórax. Aumento: 10x.

Figura 8.13. Ganglio torácico del sistema nervioso (asterisco). Se muestran las células musculares esqueléticas y glándulas salivales (punta de flecha) y los sacos traqueales (flecha) del tórax. Aumento: 10x.

Figura 8.14. Tergitas con apodema (asterisco) y membrana intersegmental. Se muestran las células del cuerpo adiposo abdominal (células pericárdicas, flecha) entre el tegumento, así como las células musculares esqueléticas (punta de flecha) y los sacos traqueales. Aumento: 10x.

Figura 8.15. Íleon con muchas esporas maduras de *N. apis* en el lumen (asterisco). En la periferia son visibles una fina capa de células musculares esqueléticas (flecha) y algunos túbulos de Malpighi (MT). Detalle de una célula epitelial no infectada del íleon (punta de flecha). Aumento: 10x.

Figuras 8.16 a 8.20. Imágenes de hematoxilina-eosina (HE) de diferentes órganos y tejidos sanos no infectados en abejas obreras infectadas experimentalmente con esporas frescas y maduras de *N. ceranae*.

Figura 8.16. Sección horizontal de la cabeza muestra las glándulas hipofaríngeas y salivales (puntas de flecha) y una sección del ojo compuesto (asterisco) y del cerebro (flecha). Aumento: 20x.

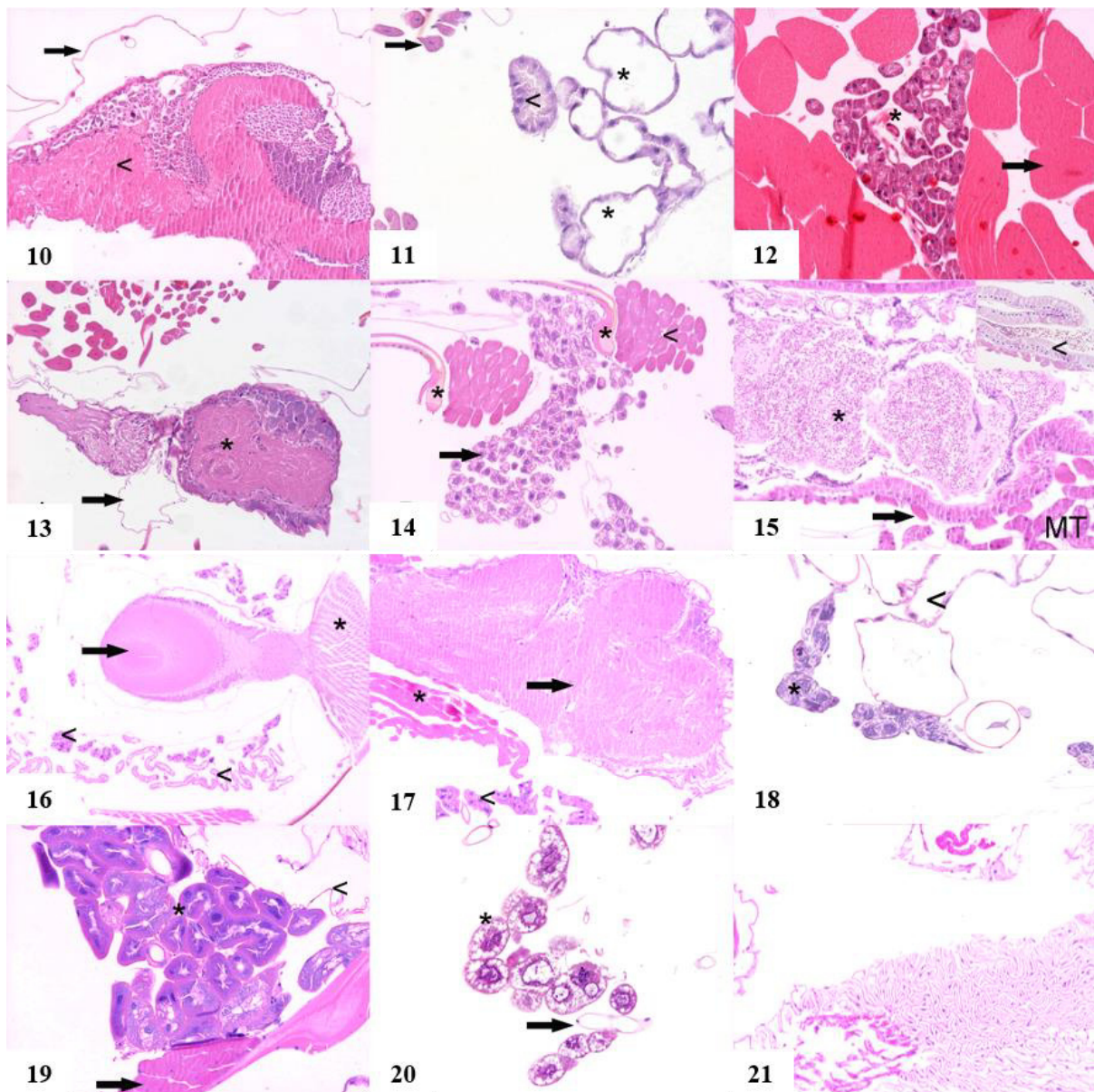
Figura 8.17. Sección longitudinal del cerebro (flecha), la glándula hipofaríngea (punta de flecha) y las células musculares esqueléticas (asterisco). Aumento: 10x.

Figura 8.18. Glándula hipofaríngea (asterisco) y sacos traqueales (punta de flecha) de la cabeza. Aumento: 20x.

Figura 8.19. Glándulas salivales (asterisco), células musculares esqueléticas (flecha) y sacos traqueales (punta de flecha) del tórax. Aumento: 20x.

Figura 8.20. Células adiposas abdominales (asterisco) y traqueolas delgadas (flecha). Aumento: 20x.

Figura 8.21. El recto recubierto por un epitelio delgado está vacío y retraído. Tinción: HE. Aumento: 10x.



Figuras 8.10 a 8.21. Tejidos extraventriculares de abejas obreras adultas (*A. m. iberiensis*) infectadas experimentalmente con diferentes dosis de esporas maduras frescas de *N. apis* (10-15) y *N. ceranae* (16-21). Tinción: hematoxilina-eosina (HE).

En las abejas infectadas por *N. ceranae* hubo un predominio de esporas maduras (basofílicas) en las células epiteliales de la porción apical de los pliegues del ventrículo. Por el contrario, las células de la parte inferior de los pliegues del ventrículo, incluso las de los grupos de células regenerativas, contenían menos estadios basófilos pero más grandes, lo que indica que contenían formas parasitarias en estadios vegetativos (**Figura 8.5**). Se observó un menor número de células epiteliales ventriculares parasitadas en las regiones de inserción de los túbulos de Malpighi y en ningún caso se observaron formaciones parasitarias en las células epiteliales de los túbulos (**Figura 8.6**).

Se observaron resultados histológicos similares en las abejas infectadas por *N. apis* (**Figuras 8.7-8.9**): sólo las células epiteliales del ventrículo se vieron infectadas en cualquiera de las abejas. La comparación de las abejas infectadas no proporcionó ninguna evidencia de tropismo de *Nosema* para las estructuras antes mencionadas, independientemente de la especie o de la dosis de esporas administrada (**Figuras 8.10-8.21**). No pudieron detectarse lesiones tisulares o formas parasitarias de *N. apis* en los órganos cefálico o torácico de las abejas melíferas infectadas (grupos A5, A10), en el cuerpo graso o el corazón (**Figuras 8.10-8.15**). Se obtuvieron resultados similares en el examen histopatológico de abejas infectadas por *N. ceranae* (grupos C5, C10), en las que no se observaron signos de infección en órganos extraventriculares (**Figuras 8.16-8.21**).

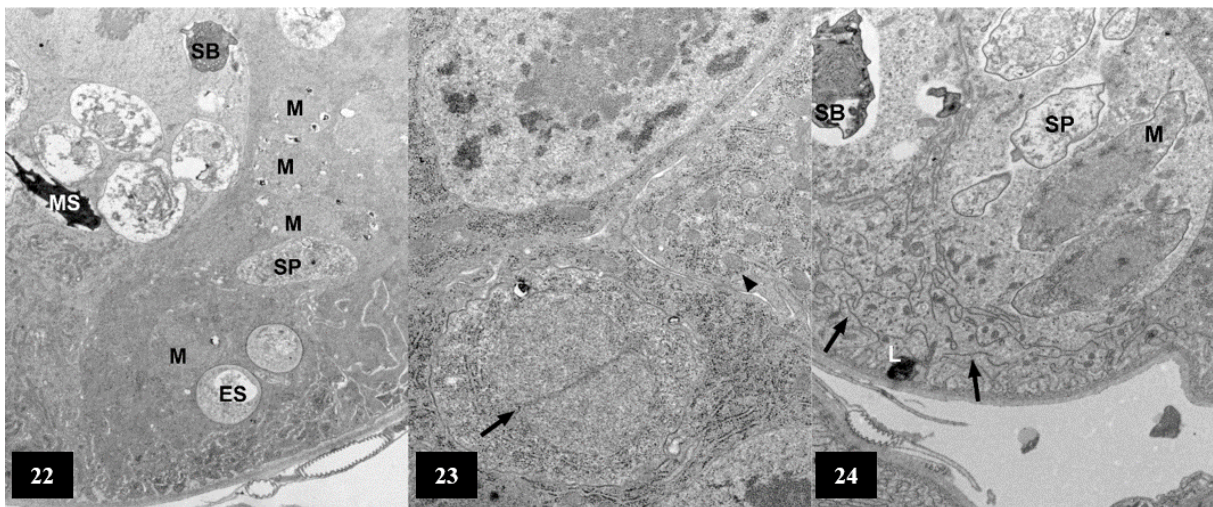
Como era de esperar, a los 7 d.p.i. la afección en el epitelio fue claramente mayor en las abejas que recibieron una dosis mayor de esporas (A10 y C10). Además, en el punto de muestreo posterior (10 d.p.i.) las células ventriculares mostraron una amplia afección, con rotura y fragmentación de las membranas peritróficas (**Figuras 8.5-8.9**), independientemente de la especie de *Nosema* y de la dosis de esporas administrada.

Generalmente se acepta que la infección por *N. apis* se origina en regiones distales del epitelio ventricular (Fries, 1988). Sin embargo, en este estudio encontramos que las regiones proximales son las primeras en infectarse, ya que la infección de esta región del ventrículo fue evidente a los 7 d.p.i. (A5 y A10). Sin embargo, la infección distal temprana se observó en las abejas de los grupos C5 y C10, como se indicó anteriormente (Higes *et al.*, 2007).

8.5.3. Microscopía electrónica de transmisión

Nuevamente, los hallazgos ultraestructurales en las células epiteliales ventriculares fueron similares, independientemente del microsporidio utilizado para la infección experimental. En las células epiteliales del ventrículo parasitadas en las abejas de los grupos A5, A10, C5 y C10, e incluso de los grupos de células regenerativas de las mismas abejas, el examen ultraestructural permitió identificar estructuras parasitarias correspondientes a diferentes etapas del ciclo biológico de *N. apis* o *N. ceranae*, tales como merontes, esporas primarias, esporas maduras y esporas vacías (**Figura 8.22**). No se observaron

diferencias histopatológicas entre la infección por *N. apis* y *N. ceranae*. Todas las etapas del ciclo biológico de *N. apis* y *N. ceranae* mostraron núcleos diplocarióticos y un número variable de mitocondrias de la célula hospedadora a su alrededor (**Figura 8.23**). Tanto las células epiteliales del ventrículo como los grupos de células regenerativas infectadas tenían vacuolas citoplasmáticas electrolúcidas, lisosomas y un retículo endoplásmico rugoso (RER) fragmentado y desorganizado (**Figura 8.24**); signos de degeneración celular debido a la acción patógena de los microsporidios.



Figuras 8.22 a 8.24. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) de los grupos de células regenerativas infectadas con esporas y formas vegetativas de las especies del género *Nosema*.

Figura 8.22. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. apis* a los 7 d.p.i. Imagen que muestra un grupo de células de los núcleos de regeneración junto a los pliegues basales parasitadas con diferentes estadios del ciclo biológico del microsporidio: merontes (M), esporonte (SP), esporoblasto (SB), esporas maduras (MS) y esporas vacías (ES). Aumento: 8.000x.

Figura 8.23. Abeja infectada con 100.000 esporas de *N. ceranae* a los 7 d.p.i. Detalle de una célula hospedadora que tiene un meronte con un núcleo diplocariótico (flecha), rodeada por el retículo endoplásmico rugoso y numerosas mitocondrias de la célula de la abeja (punta de flecha). Aumento: 30.000x.

Figura 8.24. Abeja infectada con 50.000 esporas de *N. ceranae* a los 7 d.p.i. Detalle de una célula hospedadora con dos merontes (M), algunos esporontes (SP) y un esporoblasto (SB), rodeados por un retículo endoplásmico rugoso discontinuo y desorganizado (RER: flechas) y con algunos ribosomas sueltos. Se puede observar inflamación celular moderada y un lisosoma secundario (L). Aumento: 12.000x

8.6. DISCUSIÓN

Este trabajo representa el primer estudio histopatológico basado en imágenes de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión de diferentes órganos y tejidos, intentando dilucidar el tropismo de *Nosema* spp. para localizaciones extraventriculares en abejas melíferas. En general se acepta que el ventrículo representa el órgano diana específico de *N. apis* (Fries, 1988), aunque algunos trabajos sugieren la presencia de esporas de esta especie en las glándulas de abejas adultas y en la hemolinfa de cría de abeja (Steche, 1960; Sokolov y Grobov, 1963).

En un experimento reciente con abejas obreras híbridas canadienses (*A. mellifera*) naturalmente infectadas por *N. apis* y *N. ceranae*, ambos microsporidios fueron detectados por rt-qPCR en el tracto intestinal, el saco del veneno y en varias estructuras glandulares exocrinas de las abejas adultas, solos o en combinación (Copley y Jabaji, 2012), pero no se realizaron estudios histológicos de estos órganos.

En otro trabajo, la capacidad de *N. ceranae* para infectar órganos fuera del sistema digestivo fue estudiada en abejas melíferas europeas naturalmente infectadas y criadas en Maryland, EE.UU. (Chen *et al.*, 2009b). La proliferación de *N. ceranae* fue evidente en las células epiteliales del ventrículo pero, a pesar de la detección por PCR, este microsporidio no pudo ser observado directamente en otras partes del tracto digestivo (canal alimentario), túbulos de Malpighi, glándulas hipofaríngeas y salivales o en el cuerpo graso de las abejas infectadas. En dicho estudio, sólo se muestran imágenes de MET de los ventrículos parasitados, similares a las mostradas anteriormente por Higes *et al.* (2007), pero no se muestran imágenes de los grupos de células regenerativas parasitadas, como han sido puestos de manifiesto en el presente estudio (**Figuras 8.22-8.24**).

Por otra parte, las vías esenciales para controlar la renovación del epitelio ventricular se han visto perturbadas por la infección por *N. ceranae* (Copley y Jabaji, 2012; Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al* 2018) y el hecho de que los grupos de células regenerativas no estuvieran parasitados (Panek *et al* 2018) sugiere un efecto indirecto de la parasitación a nivel de estos grupos y sobre la re-epitelización. Por lo tanto, este nuevo hallazgo (células regenerativas parasitadas; **Figura 8.22**) representa un avance importante en nuestra comprensión de los mecanismos patógenos utilizados por *Nosema* spp. y, de hecho, las lesiones a este nivel tienen un impacto importante en la capacidad de regeneración del epitelio intestinal y en su funcionalidad, lo que refleja algunos efectos directos del parásito, mientras que también es probable que la infección de estos centros regenerativos influya indirectamente a nivel transcripcional (Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al* 2018).

El tropismo tisular de *N. ceranae* también fue investigado en abejas melíferas muestreadas como parte de un gran estudio de campo en Alemania (Gisder *et al.*, 2010), donde se detectaron esporas en frotis de ventrículos que fueron teñidos y observados por MO. En esas abejas, también se detectó *N. ceranae* por PCR-RFLP en glándulas hipofaríngeas, cerebro, túbulos de Malpighi y cuerpo graso, pero nuevamente no realizó un análisis histológico de los órganos estudiados. De hecho, las infecciones

extraventriculares fueron deducidas por la detección de ADN de *N. ceranae*, pero nunca se observaron etapas específicas del ciclo biológico del patógeno directamente en los especímenes examinados, por lo que la detección molecular puede deberse a contaminaciones durante la disección de las abejas.

Los resultados presentados en este trabajo son consistentes con los obtenidos previamente en abejas melíferas infectadas artificialmente con *N. apis* o *N. ceranae*, criadas bajo condiciones de laboratorio controladas (Huang y Solter, 2013). En este caso se tomaron medidas específicas para prevenir la contaminación las muestras de tejido durante la disección, antes de ser teñidas y colocadas en portaobjetos para su examen por MO. De esta manera solo se encontraron esporas de los microsporidios en el canal alimentario y no en el cerebro, las glándulas hipofaríngeas o salivales, la bolsa del veneno, el cuerpo graso, los túbulos de Malpighi y la hemolinfa, recolectados de la cabeza y del abdomen. Sin embargo, el trabajo no incluía imágenes histológicas, ya que la metodología utilizada para la observación de los tejidos no lo permitió. Significativamente, el ADN de *Nosema* spp. pudo ser detectado en varios casos por PCR. Asimismo, en dicho trabajo se informó de la contaminación superficial de los órganos diseccionados: las medidas más estrictas para prevenir la contaminación de las abejas infectadas por *N. ceranae* dieron lugar a una señal de PCR por debajo del nivel de detección fiable.

Como ya se ha señalado (Copley y Jabaji, 2012), una técnica de disección cuidadosa es esencial a la hora de analizar estos parásitos, aunque este tipo de medidas no permiten descartar completamente la contaminación de la muestra durante su preparación, la cual puede producir falsos positivos cuando se utilizan métodos analíticos altamente sensibles (p. ej. PCR). La contaminación por esporas desde un frágil intestino infectado puede originar su aparición en órganos externos cuando se trabaja con especímenes diseccionados, tal y como ha sido previamente discutido (Huang y Solter, 2013).

El hecho de que dos experimentos diferentes (Huang y Solter, 2013 y este estudio), desarrollados en condiciones controladas de laboratorio, converjan en no detectar afecciones tisulares o etapas del ciclo biológico de los microsporidios atribuibles a cualquiera de las especies de *Nosema*, en órganos fuera del canal alimentario, parece indicar su alta especificidad para el epitelio ventricular y la falta de tropismo para otros tejidos.

El daño tisular fue similar cuando se compararon *N. apis* y *N. ceranae* y no se obtuvo ninguna evidencia de órganos diana alternativos al ventrículo, lo que confirma un tropismo tisular similar de las dos especies. Sin embargo, la enfermedad producida a nivel individual de abeja, así como a nivel de la colonia, es muy diferente entre ambos agentes causales (Higes *et al.*, 2010b, 2013; Martín-Hernández *et al.*, 2018). Se sabe que *N. apis* induce la liberación a gran escala de heces diarreicas en los individuos infectados, con implicaciones importantes en la transmisión de la enfermedad (Fries, 1993), pero esto no ocurre después de la infección por *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008a, 2009a; 2010b; Hatjina *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 2014; Cepero *et al.*, 2014).

La tendencia de *N. apis* y *N. ceranae* a infectar respectivamente las áreas epiteliales proximal y distal del ventrículo no tiene una conexión obvia con la sintomatología distintiva asociada a su aparición. La notable similitud histopatológica entre las dos infecciones contrasta con las profundas diferencias en la sintomatología y transmisión de las nosemosis tipo A y tipo C, lo que pone de manifiesto la necesidad de seguir investigando para dilucidar las diferencias en los mecanismos patógenos que se asocian con estos dos microsporidios de las abejas melíferas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la participación del equipo técnico del Laboratorio de Patología Apícola del CIAPA (IRIAF-JCCM), a las técnicas de laboratorio Teresa Corrales, María Gajero y Carmen Uceta y a los peones agrícolas Javier Almagro y Jesús García. La autora agradece la supervisión del análisis microscópico a la Dra. Pilar García-Palencia y al Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) de la UCM por su ayuda en la obtención de las imágenes MET, especialmente a Marisa García. y la contribución de Antonio Nanetti del Centro de Investigación para la Agricultura y el Medio Ambiente (CREA) de Bolonia, Italia.

Este trabajo contó con el apoyo de los fondos del INIA-FEDER (Proyecto nacional de investigación pública RTA2013-00042-06) y la ayuda pre-doctoral FPI-INIA CC.AA: RTA2012-00076-C02-01. La investigación, autoría y/o publicación del artículo de este capítulo en la revista *Veterinary Pathology* no supuso ningún posible conflicto de interés.



DISCUSIÓN GENERAL

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinants of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

10. DISCUSIÓN GENERAL

Los microsporidios *N. apis* y *N. ceranae* producen las enfermedades de abeja conocidas como nosemosis tipo A y tipo C, respectivamente (COLOSS, 2009; Higes *et al.*, 2010c). Son agentes entomopatógenos presentes en la apicultura de todo el mundo (Fries *et al.*, 2003; Higes *et al.*, 2009b; Huang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Nabian *et al.*, 2011; Whitaker *et al.*, 2011; Higes *et al.*, 2006; Paxton *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2008a; Calderón *et al.*, 2008; Invernizzi *et al.*, 2009; Giersch *et al.*, 2009). Cada especie difiere en los efectos que producen sobre el hospedador (COLOSS, 2009; Higes *et al.*, 2010c; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Van der Zee *et al.*, 2014; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Goblirsch, 2018) y presentan un cuadro clínico diferente que afecta de una manera desigual a la viabilidad de las colmenas (COLOSS, 2009; Higes *et al.*, 2010c).

Se han reportado numerosos efectos negativos para la salud de las abejas adultas y las colonias de abejas melíferas derivadas de la infección, tanto por *N. ceranae* como por *N. apis*, en muchas regiones del mundo. *Nosema ceranae* es el microsporidio predominante en *A. mellifera* y su actual prevalencia va en aumento en muchos países del mundo (Klee *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2009a; Martín-Hernández *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2013a; Lodesani *et al.*, 2014; Emsen *et al.*, 2016; Ghoyounchi *et al.*, 2017; Ostroverkhova *et al.*, 2019). Su patogenicidad ha sido demostrada en todas las castas de la colonia, así como en otros polinizadores (Martín-Hernández *et al.*, 2018; Goblirsch, 2018) y se ha relacionado con las altas pérdidas de colmenas, especialmente en zonas de clima cálido (Klee *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008a; Bacandritsos *et al.*, 2010; Soroker *et al.*, 2011; Hatjina *et al.*, 2011; Botías *et al.*, 2012d; Lodesani *et al.*, 2014).

A pesar de los grandes avances en el conocimiento de la enfermedad, la nosemosis sigue siendo un desafío para quienes estudian la patología de los insectos y para quienes trabajan en el campo de la apicultura y la agricultura (Martín-Hernández *et al.*, 2018; Goblirsch, 2018).

A lo largo de la presente tesis doctoral se han abordado novedosos aspectos de la epidemiología y la patología de la infección por ambos microsporidios (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2007), que no habían sido estudiados hasta el momento y presentan un alto interés veterinario (Higes *et al.*, 2010c, Martín-Hernández *et al.*, 2018), ganadero (MAGRAMA, 2019), ecológico (MITECO, 2019) y cultural en la apicultura ibérica (Crane, 1999).

El trabajo sintetizado en esta memoria aporta nuevo conocimiento sobre la prevalencia natural de los microsporidios en colonias naturalmente infectadas. También contribuye significativamente a esclarecer hipótesis previas sobre el tropismo tisular en abejas melíferas (*A. m. iberiensis*). Además, amplía nuestro conocimiento acerca del desarrollo de la carga parasitaria de *N. ceranae* en abejas de diferentes edades y aporta nueva información sobre la respuesta temprana del hospedador a la infección por este microsporidio, a lo largo del tiempo.

A través de los estudios realizados se ha demostrado, por primera vez, que la infección por *Nosema* spp. no solo se produce en abejas adultas bajo condiciones naturales, sino que la infección afecta también a individuos inmaduros en colmenas naturalmente infectadas y se han explorado las posibles vías de infección de la cría de abeja (**Capítulo I**). Asimismo, se ha estudiado el efecto que tienen tanto la edad de las abejas obreras en el momento de la infección, como el método de infección experimental, en el desarrollo de la carga parasitaria de *N. ceranae* y la importancia de estos factores, biológico y experimental, a la hora de interpretar los datos en estudios de laboratorio y, especialmente, cuando se comparan los resultados (**Capítulo II**). Además, la variación de la expresión de genes del hospedador en respuesta a la infección de *N. ceranae* ha demostrado ser prolongada en el tiempo, encontrándose que la modulación de genes del hospedador en beneficio del patógeno ocurre especialmente en las fases tempranas de la infección (**Capítulo III**). Finalmente, se ha demostrado histológicamente el tropismo tisular de los microsporidios de abejas, *N. ceranae* y *N. apis*, y su afinidad específica por el epitelio ventricular del tracto digestivo en abejas adultas, confirmando que solo infectan las células epiteliales y regenerativas de este tejido (**Capítulo IV**).

Una colonia de abejas melíferas es un súper-organismo. Como tal, en el estudio de la epidemiología de las enfermedades de estos insectos sociales, así como en el estudio de sus implicaciones, debe tenerse en cuenta la transmisión de enfermedades tanto a nivel individual como de la colonia (OIE, 2018). A menudo, las enfermedades de las abejas se han clasificado de acuerdo a la etapa de desarrollo de los individuos susceptibles a ellas y, particularmente, como enfermedades de abejas adultas y/o cría de abeja. Tradicionalmente, las nosemosis se han encuadrado específicamente en el grupo de enfermedades de adultas a pesar de que todas las castas de *A. mellifera* (obreras, reinas y zánganos) son susceptibles a la infección por *Nosema* spp. (Higes *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009c; Traver y Fell, 2011; Martín-Hernández *et al.*, 2012; Traver y Fell, 2012). El concepto adquirido acerca de las nosemosis como enfermedades desarrolladas en individuos adultos desde su detección en las abejas melíferas (Zander, 1909; Fries *et al.*, 1996) atiende por un lado a factores biológicos y metodológicos (súper-organismo, clasificación de enfermedades y muestreo de abejas adultas muertas), pero también responde a aspectos epidemiológicos propios de la enfermedad (Urbietta *et al.*, 2019), así como al mayor conocimiento que se tiene de las abejas obreras adultas, debido a su significativa abundancia en la colmena durante todo el año y a su mayor utilización en estudios experimentales (Martín-Hernández *et al.*, 2018, Goblirsh *et al.*, 2018).

Desde las primeras descripciones de la infección natural de cría de abeja por microsporidios (Gilliam y Shimanuki, 1967; Clark 1979), esta ha pasado desapercibida al seguir considerándose como una enfermedad de abejas adultas, sin embargo había ciertos indicios que podían indicar que este hecho se estaba produciendo. Pupas de zángano y reina naturalmente infectadas por *N. ceranae* se han detectado mediante técnicas moleculares (Traver y Fell 2011, 2012) y tanto *N. apis* como *N. ceranae* se detectaron en larvas de reina y/o pupas de obreras (Rodríguez *et al.*, 2014). Estudios experimentales

recientes han demostrado que la cría de *A. mellifera* es susceptible a la infección, proporcionando microfotografías histológicas de la infección en larvas y pupas pre-emergentes (Eiri *et al.*, 2015). Además, la infección en los estadios inmaduros afecta a las mismas abejas en su estadio adulto, de tal modo que se acorta la vida, se retrasa el polietismo temporal y se modifica la morfología de la abeja adulta tras la metamorfosis (Eiri *et al.*, 2015; Benvau y Nieh, 2017). No obstante, la infección natural de la cría por ambas especies de microsporidios y la prevalencia de los mismos en dichos estadios, no habían sido estudiadas con anterioridad.

En el trabajo desarrollado en el **Capítulo I** se demuestra la ocurrencia natural de la infección en todos los estadios inmaduros de las abejas melíferas, desde larvas recién operculadas a pupas pre-emergentes. La infección se confirmó mediante la expresión de genes relacionados con la multiplicación activa de los microsporidios.

El novedoso enfoque del trabajo epidemiológico reside, también, en la metodología aplicada. Se examinaron un gran número de individuos inmaduros (N=1.433) de colonias naturalmente infectadas por *N. ceranae* y *N. apis*, y el total de las muestras se analizaron para detectar la presencia/ausencia de los microsporidios en la cría, y en abejas adultas (de interior y pecoreadoras). *Nosema ceranae* fue el agente más frecuentemente detectado en la cría y *N. apis* tuvo una frecuencia mucho más baja y fue más frecuente en co-detecciones junto con *N. ceranae*, como era de esperar dada su alta prevalencia en nuestro país (Garrido-Bailón, 2012b; Cepero *et al.*, 2014; 2016). Se implementó la metodología para extraer cuidadosamente a los individuos inmaduros de las celdas de los panales de cría, reduciendo la probabilidad de falsos positivos por contaminación.

La técnica estándar para determinar la infección de los tejidos es el examen histológico de los mismos, empleada para detectar la presencia de esporas y varias etapas de desarrollo de los microsporidios en los tejidos del hospedador (**Capítulo IV**). Alternativamente, la utilización de la rt-PCR, altamente sensible y específica, como método para demostrar la multiplicación activa de los microsporidios en la cría de abeja se apoya, por un lado, en la expresión de genes relacionados con varios procesos celulares cruciales de Microsporidia (Katinka *et al.*, 2001; Brosson *et al.*, 2006; Belkorchia *et al.*, 2017) y, por el otro, en la ausencia de la expresión de los mismos genes en esporas ambientales. Así, la técnica permitió descartar que los parásitos que se encuentran fuera de las abejas produzcan una señal bajo las mismas condiciones de rt-PCR y demuestra la infección activa en las crías. Nuestros datos confirmaron que ambos microsporidios pueden así desarrollarse bajo condiciones naturales de campo, aunque a niveles bajos para *N. ceranae* y casi anecdóticos para *N. apis*. De hecho, la metodología aplicada permitió la detección de estos bajos niveles que quizá no lo habrían sido en exámenes histopatológicos en los que necesariamente se habría analizado un número mucho menor de muestras.

No obstante, el riesgo de infección de la cría fue bajo incluso cuando la prevalencia de la infección en las abejas adultas era relativamente alta, lo cual sugiere algún tipo de estrategia del súper-organismo para reducir la contaminación de la cría por esporas de *Nosema* spp. y con ello también la infección de la abeja reina (Chaimanee *et al.*, 2014). La incidencia de la infección en dichos individuos (cría y reina) puede tener consecuencias catastróficas para la supervivencia de la colonia (Higes *et al.*, 2009a; Benvau y Nieh, 2017; Bigansky *et al.*, 2017).

La infección por *Nosema* spp. se produce tras la ingestión de esporas maduras a través del alimento y/o el agua y se transmite principalmente por trofalaxis (Smith *et al.*, 2012), o por la vía fecal-oral (Webster *et al.*, 1993). La detección de esporas en la cera (MacInnis, 2017) y en la jalea real (Cox-Foster *et al.* 2007; Traver y Fell, 2012), apoyan ambas vías de infección de la cría. No obstante, la ausencia de la detección de cría infectada en celdas positivas a los microsporidios, junto con la detección de insectos infectados ocupando celdas ausentes de esporas en nuestro estudio, centra la atención en el papel de las abejas jóvenes (nodrizas) como la fuente principal de exposición de la cría a través del contacto directo y la alimentación.

Dado que la cría de abeja melífera se infecta de manera natural por *Nosema* spp., se abre un nuevo escenario de investigación, con la necesidad de entender los efectos de la infección en las etapas inmaduras de desarrollo, así como en las abejas adultas resultantes dentro del contexto de la colonia como súper-organismo biológico.

La mayoría de los estudios han confirmado que las abejas pecoreadoras (generalmente abejas más maduras) tienen mayores niveles de infección y prevalencia de *Nosema* spp. en condiciones naturales, mientras que las abejas más jóvenes, en el interior de la colmena, tienen una carga parásita media y una prevalencia menor de la infección (L'Arrivée, 1963; Higes *et al.*, 2008b; Meana *et al.*, 2010; Botías *et al.*, 2012b; Smart and Sheppard, 2012; Li *et al.*, 2017b; OIE, 2018) y sólo unos pocos estudios se han centrado en las abejas recién nacidas, confirmando la ausencia de infección en estas abejas (Smart y Sheppard, 2012; Jack *et al.*, 2016b; Li *et al.*, 2017b). Hasta la fecha, no se dispone de datos que apoyen una mayor susceptibilidad al microsporidio en las abejas más mayores.

Este hecho, a nivel de colonia, se debe a que la infección por *N. ceranae* perturba los fundamentos básicos del polietismo temporal (Higes *et al.*, 2008a). El comportamiento de búsqueda de alimento (pecorea) se acelera (Higes *et al.*, 2008b; Goblirsch *et al.*, 2013; Holt *et al.*, 2013; Lecocq *et al.*, 2016; Fleites-Ayil *et al.*, 2018) y se acorta la esperanza de vida de las abejas obreras infectadas (Goblirsch *et al.*, 2013; Bordier *et al.*, 2017). Por lo tanto, en las abejas pecoreadoras infectadas, de forma general, la infección lleva más tiempo que en las abejas jóvenes de interior, por lo que el número de abejas infectadas y la intensidad de la infección también es también mayor.

De hecho, la edad de las abejas en infecciones experimentales con esporas de *N. apis* se ha correlacionado con el inicio de la búsqueda de alimento (Woyciechowski y Morón, 2009), como una

variable central en la ontología de las abejas obreras, y por tanto de su envejecimiento, incluso más que la edad cronológica natural (Rueppell *et al.*, 2007). Bajo condiciones de campo la estimación de la edad biológica de las abejas puede resultar como un método útil y eficaz para evaluar el estado demográfico de las colmenas y los efectos perjudiciales de los factores estresantes (Alaux *et al.*, 2018).

En relación a esto, en la presente memoria hemos constatado que la edad de las abejas en el momento de la infección y el método de administración de las esporas del microsporidio influye significativamente tanto en la carga parasitaria de *N. ceranae*, como en la prevalencia de la infección en abejas obreras jóvenes bajo condiciones controladas de laboratorio (**Capítulo II**).

Así, se demuestra que la multiplicación del microsporidio en abejas infectadas experimentalmente con la misma dosis de esporas no es uniforme, y varía individualmente entre abejas de una misma edad, y significativamente entre grupos de abejas de diferentes edades. Las abejas recién nacidas, de 0-48 horas post-emergencia, mostraron la mayor carga parasitaria tras 7 días de infección. La intensidad de la infección disminuyó al aumentar la edad de las abejas, independientemente del método aplicado para la administración de esporas. Resultados similares se han obtenido con anterioridad, tanto en abejas obreras (Woyciechowski y Morón, 2009), como en reinas (Chaimanee *et al.*, 2014).

Las variaciones en la susceptibilidad a la infección dependiente de la edad de las abejas puede atribuirse a variaciones en el hologenoma abeja/microbiota/patofera (Evans, 2006; Schmid *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2015; Engle *et al.*, 2016; Anderson *et al.*, 2018) y a la mayor disponibilidad de nutrientes (aminoácidos esenciales, entre otros) en abejas jóvenes (Crailsheim y Leonhard, 1997). Estos aminoácidos disminuyen en abejas infectadas (Aliferis *et al.*, 2012; Benvau y Nieh, 2017; Li *et al.*, 2018). Dada la alta dependencia de los microsporidios por compuestos esenciales del hospedador (Weidner *et al.*, 1999; Burri *et al.*, 2006; Cornman *et al.*, 2009), la multiplicación de *N. ceranae* podría verse favorecida en edades tempranas del hospedador.

Es probable que la fase proliferativa exponencial de *N. ceranae* requiera de una mayor disponibilidad de aminoácidos u otros nutrientes del hospedador, de modo que el mayor éxito en la germinación intracelular y/o en la multiplicación de esporas en las abejas de 0 a 1 día post-emergencia puede verse favorecido por la mayor disponibilidad de metabolitos esenciales y constituyentes del túbulo polar y la pared de las esporas, tales como la prolina (Weiss, 2001). Este aminoácido es también esencial para las abejas y predomina en la hemolinfa de abejas no infectadas (Crailsheim y Leonhard, 1997; Aliferis *et al.*, 2012), con concentraciones medias del 50% y hasta el 80% del total de aminoácidos en abejas de 0-3 días post-emergencia que, a partir del tercer día, disminuye al aumentar la edad de las abejas (Crailsheim y Leonhard, 1997).

Del mismo modo, la respuesta inmune de los insectos varía con la edad (Hillyer, 2016) y puede dar lugar a diferentes formas de resistencia a las enfermedades y de susceptibilidad a los agentes

trasmisibles, especialmente en abejas melíferas sociales (Wilson-Rich *et al.*, 2009). En esta memoria hemos observado que las alteraciones en la expresión de genes relacionados con la apoptosis y el ciclo celular de las abejas infectadas por *N. ceranae* se modifica con la edad y el tiempo transcurrido tras la infección (**Capítulo III**). Resultados similares en la modulación diferencial de genes de inmunidad han sido publicados con anterioridad (Antunez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012; Kurze *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017b). Se ha descrito que las abejas melíferas disminuyen la inmunidad celular con la edad y aumentan la humoral (Amdam *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2008), lo que puede explicar por qué las abejas mayores desarrollan infecciones más intensas cuando tienen niveles bajos de PPO (Roberts y Hughes, 2014). Los niveles de esporas de *Nosema* spp. en las abejas infectadas naturalmente se correlacionan positivamente con la respuesta inmune de las abejas (Li *et al.*, 2017b) y, es probable que, en condiciones naturales, una fuerte respuesta inmunológica en las abejas melíferas adultas jóvenes oculte su mayor susceptibilidad a la infección, en comparación con las abejas de mayor edad (Bull *et al.*, 2012), o bien que estas al infectarse, envejecen y pasen a realizar las tareas de pecoreo, por lo que son rápidamente repuestas para cubrir las tareas en el área reproductiva de la colmena.

No obstante, nuestros resultados acerca de la susceptibilidad y el éxito de la infección en abejas de diferentes edades se basan en la cuantificación de la carga parasitaria y en la frecuencia de la infección en abejas obreras jóvenes (de 0 a 16 días post-emergencia). Futuros trabajos podrán ir encaminados al estudio de la respuesta inmune y del metabolismo de las abejas infectadas bajo las mismas condiciones de estudio.

Por otra parte, y en concordancia con trabajos anteriores (Pettis *et al.*, 2013; Lecocq *et al.*, 2016; Badaoui *et al.*, 2017; Brodschneider *et al.*, 2017), la intensidad y la frecuencia de la infección en abejas obreras infectadas colectivamente a través de la administración de esporas en el alimento no fue homogénea ni productiva al 100%. El comportamiento de la trofalaxia es la base fundamental en el mantenimiento de la cohesión de una colonia de abejas melíferas (Haydak, 1970) y, en el **Capítulo II** se postula como un factor determinante de la distribución heterogénea de las esporas del microsporidio en abejas infectadas colectivamente.

El intercambio de alimento entre las abejas de una misma colmena y, homológamente, la transmisión de alimento entre abejas enjauladas juntas, es un comportamiento social que depende del número, la edad y el origen de las abejas, la duración del experimento, y la cantidad y calidad de alimento disponible (Free 1957; Moritz y Hallmen, 1986; Brodschneider *et al.*, 2017). Nuestros resultados demuestran que la infección experimental de las abejas de forma colectiva es menos uniforme y exitosa que la infección experimental de las abejas de forma individual, especialmente en las abejas más jóvenes. Además, los niveles de *N. ceranae* en abejas infectadas colectivamente fue significativamente menor que los niveles de parasitación en las abejas infectadas individualmente.

Considerando los dos factores estudiados paralelamente y la variabilidad de los resultados (**Capítulo II**), se considera que la edad de una abeja en el momento de infección influye más en el nivel de infección que en el desarrollo de la enfermedad, tal como ha sido descrito anteriormente en la infección por *N. apis* (Rueppell *et al.*, 2007; Woyciechowski y Morón, 2009). Aunque la heterogeneidad en el desarrollo de la infección por *N. ceranae* entre abejas mantenidas en una misma jaula es incontrolable, es importante estandarizar la edad de las mismas para interpretar adecuadamente los resultados, especialmente en términos de susceptibilidad de las abejas individuales a *N. ceranae* y del éxito de la infección y la multiplicación del parásito.

Dado que la infección natural de abejas recién nacidas no es frecuente (Smart y Sheppard, 2012; Jack *et al.*, 2016b; Li *et al.*, 2017b) y de forma similar el riesgo de infección de la cría es bajo en colonias altamente infectadas por *N. ceranae* (**Capítulo I**: Urbietta *et al.*, 2019), nuevamente es razonable sugerir que en el súper-organismo gobierna algún tipo de inmunidad social para disminuir la exposición de las abejas recién nacidas que son claramente más susceptibles a la infección bajo nuestras condiciones experimentales.

A la luz de los resultados observados (**Capítulos I y II**), esta nueva hipótesis en el comportamiento social de las abejas melíferas bajo condiciones naturales, podría estar limitando la incidencia de la infección en el área reproductiva de la colmena, cuyas consecuencias finales podrían verse además aceleradas basándonos en las observaciones de que; en abejas adultas emergentes de larvas infectadas experimentalmente los niveles elevados de Vg podrían retrasar el polietismo de edad normal y alterar el equilibrio de la colonia (BenVau *et al.*, 2017). Las abejas jóvenes infectadas en la zona de cría de la colmena aumentan la probabilidad de infección de la reina reproductiva, con consecuencias muy negativas para la supervivencia de la colonia (Higes *et al.*, 2009a).

Por otra parte, en la presente memoria se demuestra el tropismo tisular de *N. apis* y *N. ceranae* por las células epiteliales del ventrículo de las abejas obreras adultas a través del primer estudio histopatológico realizado hasta la fecha, basado en imágenes de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión de diferentes órganos y tejidos (**Capítulo IV**).

Anteriormente, se había sugerido un amplio número de órganos, diferentes al intestino medio, como órganos diana de los microsporidios (Chen *et al.* 2009; Gisder *et al.* 2010; Copley y Jabaji 2012; Huang y Solter 2013). Estas hipótesis previas sobre la diversa especificidad tisular de *Nosema* spp. en *A. mellifera* se han apoyado en la detección del ADN de los microsporidios en diferentes órganos extraventriculares. Nuestros resultados demuestran que la infección de las especies del género *Nosema* ocurre con específica afinidad en las células epiteliales y de los centros regenerativos del ventrículo de abejas obreras adultas, sin causar lesión en tejidos circundantes.

La infección por *N. ceranae* reduce la apoptosis de las células epiteliales en las abejas adultas (Higes *et al.*, 2013; Martín-Hernández *et al.*, 2017) y es capaz de inhibir genes implicados en la

señalización celular y en la autorrenovación de las células intestinales (Dussaubat *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016; Panek *et al.*, 2018). Los resultados aquí mostrados (**Capítulo IV**) representan un avance importante en nuestra comprensión de los mecanismos patógenos utilizados por *Nosema* spp., dado que por primera vez se observan imágenes de la infección activa en las células responsables de la re-epitelización intestinal en los centros regenerativos del ventrículo. Las lesiones a este nivel tienen un impacto sobre la resiliencia del órgano digestivo y por tanto afectan a su funcionalidad, lo cual refleja el efecto negativo directo de la infección parasitaria sobre la viabilidad del hospedador. Asimismo, es probable que *N. ceranae* module en este tejido, y a nivel transcripcional, algunos procesos metabólicos de su hospedador en las células de los centros regenerativos (Martín-Hernández *et al.*, 2017; Panek *et al.* 2018). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el estudio sobre la respuesta celular de las abejas (**Capítulo III**) durante los primeros 5 días de desarrollo del parásito.

Además, las imágenes aportadas en el **Capítulo IV** muestran que las esporas y diversas formas inmaduras de *Nosema* spp. dentro de las células infectadas se rodean de numerosas mitocondrias y alteran el retículo endoplásmico rugoso del hospedador. Estas observaciones concuerdan con las anteriormente descritas por el equipo del CIAPA (Higes *et al.* 2007; García-Palencia *et al.* 2010; Rodríguez-García, 2017), así como con las características propias de los microsporidio que, carentes de algunos orgánulos celulares, dependen de la maquinaria energética y constructora del hospedador para reproducirse rápidamente en su interior (Burri *et al.*, 2006; Cornman *et al.*, 2009). Sin embargo, el estrés energético que *N. ceranae* produce en el hospedador no parece compensarse con la ingesta de una mayor cantidad de alimento bajo condiciones experimentales cuando se mide en periodos largos (**Capítulo III**), aunque en éste caso los valores del consumo entre réplicas fueron tan dispersos que no resultaron en diferencias estadísticamente significativas. Todas estas evidencias demuestran la fuerte interacción entre las células hospedadoras y este grupo de parásitos intracelulares (**Capítulos III y IV**).

Las imágenes de microscopía también mostraron que las regiones proximales del ventrículo de las abejas infectadas fueron las primeras en infectarse por *N. apis*, al contrario que en observaciones anteriores (Fries, 1988) y de forma similar a *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2007). De manera que la diferente sintomatología que presentan ambas enfermedades (COLOSS, 2009; Higes *et al.*, 2010c) y particularmente la inducción de la liberación de heces diarreicas asociada solo a *N. apis*, (Fries, 1993), no se explica a través de las diferentes zonas del ventrículo afectadas dado que, transcurridos los primeros momentos de la infección, estas fueron la misma. Sin embargo, es posible que la inhibición de los genes de la apoptosis y la activación de los genes del ciclo celular observada en las abejas infectadas por *N. ceranae* (**Capítulo III**), esté relacionada con la ausencia de la expulsión de las células infectadas al no activarse en estas el proceso de suicidio celular, y dado que no son destruidas, tampoco deberán ser expulsadas por las heces (Panek *et al.*, 2018). No obstante, en nuestros estudios de histopatología tanto los daños celulares como la ausencia de lesiones en tejidos diferentes al epitelio ventricular fue similar en abejas infectadas con *N. apis* o *N. ceranae* y, dado que otros estudios anteriores también han

demostrado la inhibición de la apoptosis en las células del intestino de abejas infectadas por *N. apis*, aunque por vías diferentes a las activadas en abejas infectadas por *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2017), la causa de la sintomatología desigual en las abejas infectadas por ambos microsporidios queda aún sin resolver.

En este estudio histopatológico (**Capítulo IV**) también se constata que la dosis de esporas administrada tiene un efecto sobre la intensidad de la infección, así como sobre la mortalidad de las abejas enjauladas a lo largo del tiempo, e independientemente de la especie de *Nosema*. Las abejas expuestas a mayores dosis de esporas mostraron una mayor densidad de diferentes fases intracelulares de los parásitos. El hecho de que al final del experimento (15 días después de la infección) no se dispusiese de abejas supervivientes a la infección por 100.000 esporas de *N. ceranae* y solo dos hubiesen sobrevivido a la infección por *N. apis*, junto con el hecho de que en el mismo punto de muestreo se pudiesen utilizar abejas infectadas con 50.000 esporas de los microsporidios, demuestra que la dosis infectante afecta de forma diferente a la viabilidad de las abejas adultas, tal y como ha sido constatado anteriormente en otras subespecies de *A. mellifera* (Huang *et al.*, 2014), aunque con una tasa de mortalidad inferior a la publicada en abejas ibéricas primeramente (Martín-Hernández *et al.*, 2011).

Todos los trabajos desarrollados en la presente memoria confirman el carácter patógeno de *N. apis* y *N. ceranae* y demuestran que, tanto la edad de las abejas en el momento de la infección y a lo largo de los estudios, como la dosis de esporas y el método de infección experimental influyen en el desarrollo y éxito de la infección, y por ello, probablemente también, en las consecuencias en la abeja individual y en la colonia de abejas melíferas. Asimismo, en la búsqueda de nuevos métodos de control de las nosemosis se deberá tener en cuenta la infección de la cría de abeja como fuente y vector de la enfermedad, en el interior de las colonias.

Conclusions

CONCLUSIONES

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinant factors of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

10. CONCLUSIONES GENERALES

Integrando los resultados de los cuatro capítulos de esta memoria de tesis doctoral, se han extraído las siguientes conclusiones:

1. En condiciones naturales, los microsporidios entomopatógenos *N. ceranae* y *N. apis* pueden multiplicarse activamente en los estadios inmaduros de la cría de abeja; desde larvas recién operculadas hasta pupas maduras pre-emergentes.
2. Aunque el nivel de infección natural de una colmena sea relativamente alto, la frecuencia de la infección por *Nosema* spp. en la cría de abeja obrera es baja, por lo que existe poco riesgo de infección de los estadios inmaduros en los que, sin embargo, se puede mantener la infección.
3. La detección del ARNm de los genes *N. ceranae-PTP3* y *N. apis-RPBI* es una herramienta útil para confirmar la multiplicación de *N. ceranae* y *N. apis*, y por tanto sirve para confirmar la infección activa de los microsporidios, permitiendo detectar bajas prevalencias al facilitar el análisis de un gran número de muestras individualmente.
4. Las abejas obreras jóvenes de 0 y 1 día de edad, son más susceptibles a la infección por *N. ceranae* que abejas más maduras. La intensidad de la infección disminuye al aumentar la edad, por lo que la edad del hospedador en el momento de la exposición al patógeno es un factor determinante de la infección.
5. El nivel de infección por *N. ceranae* en abejas obreras jóvenes depende del método de administración de las esporas. La administración individual de esporas de *N. ceranae* en condiciones controladas de laboratorio es más exitosa y produce mayores niveles de parasitación que cuando se administran de forma colectiva, independientemente de la edad de las abejas.
6. La infección con dosis relativamente bajas de esporas de *N. ceranae* acorta la vida de las abejas rápidamente sin favorecer un mayor consumo de alimento a lo largo del tiempo, y modula la expresión de genes del ciclo celular y la apoptosis del hospedador con un patrón dinámico y complejo en el tiempo.
7. *Nosema apis* y *N. ceranae* tienen un tropismo tisular similar por las células epiteliales del ventrículo y las células de los centros regenerativos de las abejas melíferas. La infección con altas dosis de esporas de microsporidios es evidente a los 7 días post-infección, comenzando por las regiones proximal y distal, respectivamente, y extendiéndose rápidamente, en ambos casos, a lo largo del epitelio ventricular.

CONCLUSIONS

Integrating the results of the four chapters of this doctoral thesis report, the following conclusions have been drawn:

1. Under natural conditions, the entomopathogenic microsporidia *N. ceranae* and *N. apis* can be actively multiplied in the immature stages of bee breeding; from newly operculated larvae to pre-emergent mature pupae.
2. Although the natural infection level of a colony can be relatively high, the frequency of infection by *Nosema* spp. in worker bee brood is low, so there is little risk of infection of immature stages in which, however, the infection can be maintained.
3. The mRNA detection of the *N. ceranae-PTP3* and *N. apis-RPB1* genes is a useful tool to confirm the multiplication of *N. ceranae* and *N. apis*, and therefore serves to confirm the active infection of the microsporidia, allowing detection of low prevalence by simplifying the analysis of a large number of samples individually.
4. Young worker bees, 0 to 1 day old, are more susceptible to infection by *N. ceranae* than more mature bees. The intensity of infection decreases with increasing age, so the age of the host at the time of exposure to the pathogen is a determining factor of the infection.
5. The level of infection by *N. ceranae* in young worker bees depends on the method of administration of the spores. Individual administration of *N. ceranae* spores under controlled laboratory conditions is more successful and produces higher levels of parasitization than when administered collectively, regardless of the age of the bees.
6. Infection with relatively low doses of *N. ceranae* spores quickly shortens the life of the bees without favoring an increased consumption of food over time, and modulates the expression of cell cycle genes and host apoptosis with a dynamic and complex pattern throughout time.
7. *Nosema apis* and *N. ceranae* have similar tissue tropism for the ventricular epithelial cells and the clusters of regenerative cells of honey bees. Infection with high doses of microsporidia spores is evident 7 days post-infection, starting in the proximal and distal regions, respectively, and spreading swiftly, in both cases, along the ventricular epithelium.

Summary

RESUMEN

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinants of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

12. RESUMEN

Nosema apis y *Nosema ceranae* producen las enfermedades de abeja conocidas como nosemosis tipo A y tipo C, respectivamente. Ambas especies difieren en los efectos que produce sobre el hospedador y presentan un cuadro clínico característico que afecta de una manera desigual a la viabilidad de las colmenas. Sin embargo, todavía no se conocen algunos de los mecanismos que se asocian con estos dos microsporidios.

En esta tesis se han estudiado factores determinantes de la infección, relacionados con el parásito y el hospedador, con el fin de estimar el origen de las variaciones individuales en el desarrollo de la enfermedad a nivel de abeja adulta y sus fases de desarrollo, y explicar algunas de las diferencias en el desarrollo de las nosemosis en los diferentes individuos de las colonias afectadas.

Por primera vez, se ha demostrado que la infección por ambos agentes afecta a individuos inmaduros en colmenas naturalmente infectadas, que pueden sobrevivir a la edad adulta, e incrementar el número de abejas recién nacidas parasitadas. Las abejas adultas jóvenes, a la edad de 0-1 días, son claramente más susceptibles a la infección por *N. ceranae* que las abejas más maduras. Sin embargo, la frecuencia de la infección por *Nosema* spp. en la cría es baja, por lo que existe poco riesgo de infección de los estadios inmaduros en los que, sin embargo, se pueden mantener la infección en la colonia. La inmunidad social podría estar detrás de los bajos porcentajes de infección natural en cría operculada y la mayor susceptibilidad de las abejas recién nacidas, encargadas de limpiar las celdas de cría, y que una vez infectadas inhiben su comportamiento normal y maduran precozmente, manteniendo así la integridad reproductiva del súper-organismo frente a la infección patógena. Un nuevo método desarrollado para la detección de la multiplicación activa de los microsporidios permite confirmar bajos porcentajes de parasitación en infecciones naturales.

La variación de la expresión de genes del hospedador en respuesta a la infección de *N. ceranae* es prolongada en el tiempo, y la modulación de genes del hospedador en beneficio del patógeno ocurre especialmente en las fases tempranas de la infección. El estrés energético que produce *N. ceranae* en el hospedador no se compensa con una mayor ingesta de alimento en periodos largos y bajo condiciones experimentales.

Las especies del género *Nosema* tienen una afinidad específica por las células epiteliales y las células de los centros regenerativos del ventrículo de abejas obreras adultas, sin causar lesión en tejidos circundantes. Las lesiones a este nivel tienen un impacto sobre la resiliencia del órgano digestivo y afectan a su funcionalidad, demostrando el efecto negativo directo de la infección parasitaria sobre la viabilidad del hospedador. Sin embargo, la diferente sintomatología que presentan ambas enfermedades no se explica a través de la histopatología observada.

En la búsqueda de nuevos métodos de control deberá considerarse la cría operculada como otra fuente de esporas infectivas dentro de las colonias. En los estudios *in vitro* deberá considerarse la edad de las abejas, la dosis de esporas y el método de infección en la interpretación de los datos y la deducción de las patologías asociadas.

SUMMARY

Nosema apis and *Nosema ceranae* produce the bee diseases known as nosemosis type A and type C, respectively. Both species differ in the effects they produce on the host and in the characteristic clinical picture that affects unequally the viability of the honey bee colonies. However, some of the mechanisms associated with these two microsporidia are not yet known.

Some determinant infection factors, related to the parasite and the host, have been studied to assess the origin of individual variations in the development of the disease at both adult bee and bee brood levels, in order to explain some of the differences in the development of nosemosis in the members from infected colonies.

For the first time, it has been demonstrated that infection by both agents affects immature individuals in naturally infected colonies, which can survive to adulthood, and increase the number of newly born parasitized bees. Young adult bees, at the age of 0-1 days, are clearly more susceptible to the infection of *N. ceranae* than the older ones. However, the frequency of *Nosema* spp. infection in the bee brood was low, so there is little risk of infection of immature stages in which, however, the infection can be maintained inside the colony. The honey bee social immunity could explain the low percentages of natural infection in operculated brood and the greater susceptibility of the new-born bees, which clean the brood cells, and once infected their normal polyethism it's accelerated, thus the reproductive of the super-organism would remain intact in facing the pathogenic infection. A new method has been developed for the detection of the active multiplication of microsporidia that allows to confirm a low parasite prevalence in naturally infected colonies.

Variation of host gene expression in response to *N. ceranae* infection is prolonged over time, and host gene modulation for its own benefit occurs especially in the early stages of infection. The energetic stress produced by *N. ceranae* in the host is not compensated by the bee's food intake over a long period, and under experimental conditions.

Both *Nosema* species have a high tropism for the ventricular epithelium cells and the clusters of regenerative cells in the adult worker bees, without causing overt damages in surrounding tissues. The lesions at that level have an impact on the resilience of the digestive tissue and affect to its functionality, so the direct negative effect of parasitism on host viability have been shown. However, the different symptomatology of both diseases could not be explained by the histopathology observations.

In the search for new control methods of nosemosis, the operculated brood should be considered as a source of infective spores within the colonies. Additionally, the bee age, the spore's dose and the method of bee infection should be attended in laboratory studies and especially when comparing results associated with the pathologies.

References

REFERENCIAS

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinant factors of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. y Taylor, M. F. J. R.** (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**, 399-451. doi: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A., Spiegel, F. W. y Spiegel, F. W.** (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **59**, 429-514. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
- Aizen, M. A. y Harder, L. D.** (2009). The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Current Biology* **19**, 915-918. doi: 10.1016/j.cub.2009.03.071.
- Al Toufailia, H., Alves, D. A., Bená, D. de C., Bento, J. M. S., Iwanicki, N. S. A., Cline, A. R., Ellis, J. D. y Ratnieks, F. L. W.** (2017). First record of small hive beetle, *Aethina tumida* Murray, in South America. *Journal of Apicultural Research* **56**, 76-80. doi: 10.1080/00218839.2017.1284476.
- Alaux, C., Brunet, fr J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L. P. y Le Conte, Y.** (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* **12**, 774-782. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x.
- Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J. L. y Conte, Y. Le** (2011). Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **106**, 380-385. doi: 10.1016/j.jip.2010.12.005.
- Alaux, C., Crauser, D., Pioz, M., Saulnier, C. y Le Conte, Y.** (2014). Parasitic and immune modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. *Journal of Experimental Biology* **217**, 3416-3424. doi: 10.1242/jeb.105783.
- Alaux, C., Soubeyrand, S., Prado, A., Peruzzi, M., Maisonnasse, A., Vallon, J., Hernandez, J., Jourdan, P. y Le Conte, Y.** (2018). Measuring biological age to assess colony demographics in honeybees. doi: 10.1371/journal.pone.0209192.
- Aliferis, K. A., Copley, T. y Jabaji, S.** (2012). Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Insect Physiology* **58**, 1349-1359. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.07.010.
- Alvarez-Suarez, J. M.** (2017). *Bee products - chemical and biological properties*. ed. Facultad de Ciencias de la Salud, U. de L. A. Springer International Publishing AG, Quito Ecuador doi: 10.1007/978-3-319-59689-1.
- Amdam, G. V. y Omholt, S. W.** (2002). The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*. doi: 10.1006/jtbi.2002.2545.

- Amdam, G. V., Aase, A. L. T. O., Seehuus, S.-C., Kim Fondrk, M., Norberg, K. y Hartfelder, K.** (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental gerontology* **40**, 939-47. doi: 10.1016/j.exger.2005.08.004.
- Anderson, K. E. y Ricigliano, V. A.** (2017). Honey bee gut dysbiosis: a novel context of disease ecology. *Current Opinion in Insect Science*. doi: 10.1016/j.cois.2017.05.020.
- Anderson, D. L. y Trueman, J. W.** (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & applied acarology* **24**, 165-89.
- Anderson, K. E., Rodrigues, P. A. P., Mott, B. M., Maes, P. y Corby-Harris, V.** (2016). Ecological Succession in the Honey Bee Gut: Shift in Lactobacillus Strain Dominance During Early Adult Development. *Microbial Ecology*. doi: 10.1007/s00248-015-0716-2.
- Anderson, K. E., Ricigliano, V. A., Mott, B. M., Copeland, D. C., Floyd, A. S. y Maes, P.** (2018). The queen's gut refines with age: longevity phenotypes in a social insect model. *Microbiome* **6**, 108. doi: 10.1186/s40168-018-0489-1.
- Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Nuru, A., Khan, K. A. y Alattal, Y.** (2017). Geographical distribution and molecular detection of *Nosema ceranae* from indigenous honey bees of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* **24**, 983-991. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.01.054.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. y Higes, M.** (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* **11**, 2284-2290. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x.
- Antúnez, K., Mendoza, Y., Santos, E. y Invernizzi, C.** (2013). Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research* **52**, 227-234. doi: 10.3896/IBRA.1.52.5.09.
- Arbogast, R. T., Torto, B., Willms, S. y Teal, P. E. A.** (2009). Trophic Habits of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae): Their Adaptive Significance and Relevance to Dispersal. *Environmental Entomology* **38**, 561-568. doi: 10.1603/022.038.0307.
- Arbulo, N., Antúnez, K., Salvarrey, S., Santos, E., Branchiccela, B., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Invernizzi, C.** (2015). High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* **130**, 165-168. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.018.
- Ares, A. M., Nozal, M. J., Bernal, J. L., Martín-Hernández, R., M.Higes y Bernal, J.** (2012). Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **899**, 146-153. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.05.016.
- Auerswald, L., Schneider, P. y Gäde, G.** (1998). Utilisation of substrates during tethered flight with and without lift generation in the African fruit beetle *Pachnoda sinuata* (Cetoniinae). *The Journal of experimental biology*

201, 2333-42.

- Aufauvre, J., Biron, D. G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzunces, L. P., Delbac, F. y Blot, N.** (2012). Parasite-insecticide interactions: A case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports* **2**, 1-7. doi: 10.1038/srep00326.
- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F. y Blot, N.** (2014). Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS ONE* **9**, e91686. doi: 10.1371/journal.pone.0091686.
- Ayres, J. S. y Schneider, D. S.** (2009). The role of anorexia in resistance and tolerance to infections in *Drosophila*. *PLoS Biology* **7**,. doi: 10.1371/journal.pbio.1000150.
- Bacandritsos, N., Granato, A., Budge, G., Papanastasiou, I., Roinioti, E., Caldon, M., Falcaro, C., Gallina, A. y Mutinelli, F.** (2010). Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* **105**, 335-340. doi: 10.1016/j.jip.2010.08.004.
- Badaoui, B., Fougeroux, A., Petit, F., Anselmo, A., Gorni, C., Cucurachi, M., Cersini, A., Granato, A., Cardeti, G., Formato, G., Mutinelli, F., Giuffra, E., Williams, J. L. y Botti, S.** (2017). RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **12**, 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0173438.
- Bailey, L.** (1952). The action of the proventriculus of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Experimental Biology* **29**, 310-327.
- Bailey, L.** (1955). The Infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). *Parasitology* **45**, 86. doi: 10.1017/S0031182000027451.
- Bailey, L. y Ball, B. V.** (1991). *Honey bee pathology*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich Publisher, Harpenden, Herts., UK.
- Bass, D., Czech, L., Williams, B. A. P., Berney, C., Dunthorn, M., Mahé, F., Torruella, G., Stentiford, G. D. y Williams, T. A.** (2018). Clarifying the Relationships between Microsporidia and Cryptomycota. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **65**, 773-782. doi: 10.1111/jeu.12519.
- Basualdo, M., Barragán, S. y Antúnez, K.** (2014). Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental Microbiology Reports* **6**, 396-400. doi: 10.1111/1758-2229.12169.
- Becnel, J. J. y Andreadis, T. G.** (1999). Microsporidia in Insects. En *The Microsporidia and Microsporidiosis*, pp. 447-501. American Society of Microbiology doi: 10.1128/9781555818227.ch14.
- Bekele, A. Z., Mor, S. K., Phelps, N. B. D., Goyal, S. M. y Armién, A. G.** (2015). A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Veterinary Quarterly* **35**, 48-50. doi: 10.1080/01652176.2014.981766.
- Belkorchia, A., Pombert, J. F., Polonais, V., Parisot, N., Delbac, F., Brugère, J. F., Peyret, P., Gaspin, C. y**

- Peyretaillade, E.** (2017). Comparative genomics of microsporidian genomes reveals a minimal non-coding RNA set and new insights for transcription in minimal eukaryotic genomes. *DNA Research* **24**, 251-260. doi: 10.1093/dnares/dsx002.
- Benvau, L. R. y Nieh, J. C.** (2017). Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Scientific Reports* **7**, 1-8. doi: 10.1038/s41598-017-14702-4.
- Bernklau, E., Bjostad, L., Hogeboom, A., Carlisle, A. y H. S., A.** (2019). Dietary Phytochemicals, Honey Bee Longevity and Pathogen Tolerance. *Insects* **10**, 14. doi: 10.3390/insects10010014.
- Bertazzini, M., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Maistrello, L. y Forlani, G.** (2010). Amino acid content and nectar choice by forager honeybees (*Apis mellifera* L.). *Amino Acids* **39**, 315-318. doi: 10.1007/s00726-010-0474-x.
- Betti, M. I., Wahl, L. M. y Zamir, M.** (2014). Effects of Infection on Honey Bee Population Dynamics: A Model. *PLoS ONE* **9**, e110237. doi: 10.1371/journal.pone.0110237.
- Biganski, S., Kurze, C., Müller, M. Y. y Moritz, R. F. A. A.** (2017). Social response of healthy honeybees towards *Nosema ceranae*-infected workers: care or kill? *Apidologie*. doi: 10.1007/s13592-017-0557-8.
- Bigliardi, E. y Sacchi, L.** (2001). Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection* **3**, 373-379. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01393-4.
- Blacquièrre, T., Smaghe, G., Van Gestel, C. A. M. y Mommaerts, V.** (2012). Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*. doi: 10.1007/s10646-012-0863-x.
- Blažytė-Čereškienė, L., Skrodenytė-Arbačiauskienė, V. y Būda, V.** (2014). Microsporidian parasites of honey bees *Nosema ceranae* and *N. apis* in Lithuania: supplementary data on occurrence along Europe. *Journal of Apicultural Research*. doi: 10.3896/ibra.1.53.3.04.
- Blažytė-Čereškienė, L., Skrodenytė-Arbačiauskienė, V., Radžiūtė, S., Nedveckytė, I. y Būda, V.** (2016). Honey bee infection caused by *Nosema* spp. in Lithuania. *Journal of Apicultural Science*. doi: 10.1515/JAS-2016-0019.
- BOE-A-2010-19035** (2010). Resolución de 10 de noviembre de 2010, de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la modificación de la Denominación de Origen Protegida «Miel de La Alcarria». *Boletín Oficial del Estado* 102248-102254.
- Bohne, W., Ferguson, D. J. P., Kohler, K. y Gross, U.** (2000). Developmental Expression of a Tandemly Repeated, Glycine- and Serine-Rich Spore Wall Protein in the Microsporidian Pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infection and Immunity* **68**, 2268-2275. doi: 10.1128/IAI.68.4.2268-2275.2000.
- Bordier, C., Pioz, M., Crauser, D., Le Conte, Y. y Alaux, C.** (2017). Should I stay or should I go: honeybee drifting behaviour as a function of parasitism. *Apidologie* **48**, 286-297. doi: 10.1007/s13592-016-0475-1.
- Borneck, R., Viry, A., Martín-Hernández, R. y Higes, M.** (2010). Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *Journal of Apicultural Research* **49**, 334-336. doi: 10.3896/IBRA.1.49.4.06.

- Borsuk, G., Ptaszyńska, A. A., Olszewski, K., Domaciuk, M., Krutmuang, P. y Paleolog, J.** (2017). A new method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. *PLoS ONE* **12**, 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0170487.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Meana, A. y Higes, M.** (2012a). Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitology Research* **110**, 2557-2561. doi: 10.1007/s00436-011-2760-2.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Garrido-Bailón, E., Nanetti, A., Meana, A. y Higes, M.** (2012b). *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apirar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology Reports* **4**, 57-65. doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00299.x.
- Botías, C., Anderson, D. L., Meana, A., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R. y Higes, M.** (2012c). Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **110**, 108-113. doi: 10.1016/j.jip.2012.02.014.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De La Rúa, P., Meana, A. y Higes, M.** (2012d). The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science* **93**, 150-155. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.08.002.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Días, J., García-Palencia, P., Matabuena, M., Juarranz, Á., Barrios, L., Meana, A., Nanetti, A. y Higes, M.** (2012e). The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology* **14**, 845-859. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02647.x.
- Botías, C., Martín-hernández, R., Barrios, L., Meana, A. y Higes, M.** (2013a). *Nosema* spp . infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* **44**, 1-14. doi: 10.1186/1297-9716-44-25.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Meana, A. y Higes, M.** (2013b). Screening alternative therapies to control Nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Research in Veterinary Science* **95**, 1041-1045. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.09.012.
- Botías Talamantes, C.** (2013). Patrón epidemiológico y nuevos métodos de control de las nosemosis de *Apis mellifera* L. en España.
- Bourgeois, L., Beaman, L., Holloway, B. y Rinderer, T. E.** (2012a). External and internal detection of *Nosema ceranae* on honey bees using real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 323-325. doi: 10.1016/j.jip.2012.01.002.
- Bourgeois, A. L., Rinderer, T. E., Sylvester, H. A., Holloway, B. y Oldroyd, B. P.** (2012b). Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects. *Apidologie* **43**, 539-548. doi: 10.1007/s13592-012-0121-5.

- Branchiccela, B., Arredondo, D., Higes, M., Invernizzi, C., Martín-Hernández, R., Tomasco, I., Zunino, P. y Antúnez, K.** (2017). Characterization of *Nosema ceranae* Genetic Variants from Different Geographic Origins. *Microbial Ecology* **73**, 978-987. doi: 10.1007/s00248-016-0880-z.
- Bravo, J., Carbonell, V., Valdebenito, J. T., Figueroa, C., Valdovinos, C. E., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Delporte, C.** (2014). Identification of *Nosema ceranae* in the Valparaíso District, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* **46**, 487-491. doi: 10.4067/S0301-732X2014000300021.
- Brodtschneider, R., Libor, A., Kupelwieser, V. y Crailsheim, K.** (2017). Food consumption and food exchange of caged honey bees using a radioactive labelled sugar solution. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0174684.
- Brodtschneider, R., Gray, A., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J. D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Dahle, B., de Graaf, D. C., Maja Dražić, M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., Grzęda, U., Hetzroni, A., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Aurelio Medina-Flores, C., Mutinelli, F., Raudmets, A., A Ryzhikov, V., Simon-Delso, N., Stevanovic, J., Uzunov, A., Vejsnæs, F., Wöhl, S., Zammit-Mangion, M. y Danihlák, J.** (2018). Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research* **57**, 452-457. doi: 10.1080/00218839.2018.1460911.
- Brosemer, R. W. y Veerabhadrapa, P. S.** (1965). Pathway of proline oxidation in insect flight muscle. *Biochimica et biophysica acta* **110**, 102-12.
- Brosson, D., Kuhn, L., Delbac, F., Garin, J., Vivarès, C. P. y Texier, C.** (2006). Proteomic analysis of the eukaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia): A reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics* **6**, 3625-3635. doi: 10.1002/pmic.200500796.
- Bruckner, S., Steinhauer, N., Karen, Rennich, K., Aurell, S. D., Caron, D. M., Ellis, J. D., Fauve, A. M., Kulhanek, K., Nelson, K. C., Rangel, J., Rose, R., Sagili, R., Slater, G. P., Snyder, R., Thoms, C. A., Wilkes, J. T., Wilson, M. E., VanEngelsdorp, D. y Williams, G. R.** (2018). Honey Bee Colony Losses 2017-2018: Preliminary Results | Bee Informed Partnership. *Bee Informed Team*.
- Brutscher, L. M. y Flenniken, M. L.** (2015). RNAi and antiviral defense in the honey bee. *Journal of Immunology Research* **2015**,. doi: 10.1155/2015/941897.
- Buchon, N., Silverman, N. y Cherry, S.** (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology* **14**, 796-810. doi: 10.1038/nri3763.
- Bull, J. C., Ryabov, E. V., Prince, G., Mead, A., Zhang, C., Baxter, L. A., Pell, J. K., Osborne, J. L. y Chandler, D.** (2012). A Strong Immune Response in Young Adult Honeybees Masks Their Increased Susceptibility to Infection Compared to Older Bees. *PLoS Pathogens* **8**, e1003083. doi: 10.1371/journal.ppat.1003083.
- Burnham, A. J.** (2019). Scientific Advances in Controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) Infections in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Frontiers in Veterinary Science*. doi: 10.3389/fvets.2019.00079.

- Burri, L., Williams, B. A. P., Bursac, D., Lithgow, T. y Keeling, P. J.** (2006). Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15916-15920. doi: 10.1073/pnas.0604109103.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. y Wittwer, C. T.** (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Buys, B.** (1977). A nosema disease averting honeybee brood. En *A nosema disease averting honeybee brood* (ed. Apimondia Symposium of Bee Biology and Pathology), pp. 73-76. Colibaba, S., Merelbeke, Belgium.
- Calderón, R. A., Sanchez, L. A., Yañez, O. y Fallas, N.** (2008). Presence of *Nosema ceranae* in africanized honey bee colonies in Costa Rica. *Journal of Apicultural Research* **47**, 328-329. doi: 10.1080/00218839.2008.11101485.
- Campbell, J., Kessler, B., Mayack, C. y Naug, D.** (2010). Behavioural fever in infected honeybees: parasitic manipulation or coincidental benefit? *Parasitology* **137**, 1487-1491. doi: 10.1017/S0031182010000235.
- Candy, D. ., Becker, A. y Wegener, G.** (1997). Coordination and Integration of Metabolism in Insect Flight. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **117**, 497-512. doi: 10.1016/S0305-0491(97)00212-5.
- Carreck, N. L., Andree, M., Brent, C. S., Cox-Foster, D., Dade, H. A., Ellis, J. D., Hatjina, F. y van Engelsdorp, D.** (2013). Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection. *Journal of Apicultural Research* **52**, 1-40. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.03.
- Carter, C., Shafir, S., Yehonatan, L., Palmer, R. G. y Thornburg, R.** (2006). A novel role for proline in plant floral nectars. *Naturwissenschaften* **93**, 72-79. doi: 10.1007/s00114-005-0062-1.
- Cepero, A., Ravoet, J., Gómez-Moracho, T., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., González-Porto, A. V., De Graaf, D. C., Martín-Hernández, R. y Higes, M.** (2014). Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: A case study. *BMC Research Notes* **7**,. doi: 10.1186/1756-0500-7-649.
- Cepero, A., Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Gómez-Moracho, T., Barrios, L., Bernal, J., Teresa Martín, M., Meana, A. y Higes, M.** (2016). Passive laboratory surveillance in Spain: pathogens as risk factors for honey bee colony collapse. *Journal of Apicultural Research* **54**, 525-531. doi: 10.1080/00218839.2016.1162978.
- Chaimanee, V., Warrit, N. y Chantawannakul, P.** (2010). Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of Invertebrate Pathology* **105**, 207-210. doi: 10.1016/j.jip.2010.06.005.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D. y Pettis, J. S.** (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* **58**, 1090-1095. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.04.016.

- Chaimanee, V., Pettis, J. S., Chen, Y., Evans, J. D., Khongphinitbunjong, K. y Chantawannakul, P.** (2013). Susceptibility of four different honey bee species to *Nosema ceranae*. *Veterinary Parasitology* **193**, 260-265. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.004.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D. y Pettis, J. S.** (2014). Effects of host age on susceptibility to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie* **45**, 451-463. doi: 10.1007/s13592-013-0258-x.
- Chaimanee, V., Evans, J. D., Chen, Y., Jackson, C. y Pettis, J. S.** (2016). Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology* **89**, 1-8. doi: 10.1016/J.JINSPHYS.2016.03.004.
- Charbonneau, L. R., Hillier, N. K., Rogers, R. E. L., Williams, G. R. y Shutler, D.** (2016). Effects of *Nosema apis*, *N. ceranae*, and coinfections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory. *Scientific Reports* **6**,. doi: 10.1038/srep22626.
- Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R. y de Graaf, D. C.** (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European Journal of Protistology* **61**, 13-19. doi: 10.1016/j.ejop.2017.07.002.
- Chen, Y. P. y Huang, Z. Y.** (2010). *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie* **41**, 364-374. doi: 10.1051/apido/2010021.
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B. y Pettis, J. S.** (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 186-188. doi: 10.1016/j.jip.2007.07.010.
- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M. y Pettis, J. S.** (2009a). Asymmetrical Coexistence of *Nosema ceranae* and *N. apis* in Honey Bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**, 204-209. doi: 10.1016/j.jip.2009.05.012.
- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D. y Pettis, J. S.** (2009b). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **56**, 142-7. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Zhao, Y., Liu, X., Tallon, L. J., Sadzewicz, L. D., Li, R., Zheng, H., Huang, S., Zhang, X., Hamilton, M. C., Pernal, S. F., Melathopoulos, A. P., Yan, X. y Evans, J. D.** (2013). Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics* **14**, 451. doi: 10.1186/1471-2164-14-451.
- Chymkowitz, P. y Enserink, J. M.** (2013). The cell cycle rallies the transcription cycle Cdc28/Cdk1 is a cell cycle-regulated transcriptional CDK. *Transcription* **4**, 3-6. doi: 10.4161/trns.22456.
- Cilia, G., Emanuel Jarmela dos Santos, P., Nanetti, A., Cardaio, I., Emanuel Jarmela dos Santos, P., Ellis,**

- J. D., dos Santos, P. E. J., Ellis, J. D. y Nanetti, A.** (2018). The first detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in the small hive beetle, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae). *Apidologie*. doi: 10.1007/s13592-018-0589-8.
- Clark, T. B.** (1980). A second microsporidian in the honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology*. doi: 10.1016/0022-2011(80)90164-0.
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R. M., Biswas, S., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R., Feyereisen, R. y Oakeshott, J. G.** (2006). A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*. doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x.
- Collins** (2010). *The beekeeper's bible : bees, honey, recipes and other home uses*. HarperCollins.
- COLOSS** (2009). *Nosema disease: lack of knowledge and work standardization*, 20 Nov 2009.
- Comisión Europea** (2017). *REGLAMENTO (UE) 2017/269 DE LA COMISIÓN, de 16 de febrero de 2017, por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las estadísticas de plaguicidas, con respecto a la lista de sustancias activas*.
- Copley, T. R. y Jabaji, S. H.** (2012). Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *Journal of Applied Microbiology* **112**, 15-24. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05192.x.
- Copley, T. R., Giovenazzo, P. y Jabaji, S. H.** (2012a). Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives. *Apidologie* **43**, 753-760. doi: 10.1007/s13592-012-0147-8.
- Copley, T. R., Chen, H., Giovenazzo, P., Houle, E. y Jabaji, S. H.** (2012b). Prevalence and seasonality of *Nosema* species in Québec honey bees. *Canadian Entomologist* **144**, 577-588. doi: 10.4039/tce.2012.46.
- Cornman, R. S., Chen, Y. P., Schatz, M. C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J. S., Lipkin, W. I. y Evans, J. D.** (2009). Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens* **5**. doi: 10.1371/journal.ppat.1000466.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V., VanEngelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S. K., Simons, J. F., Egholm, M., Pettis, J. S. y Lipkin, W. I.** (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**, 283-287. doi: 10.1126/science.1146498.
- Crailsheim, K.** (1990). The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie* **21**, 417-429. doi: 10.1051/apido:19900504.
- Crailsheim, K.** (1998). Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **29**, 97-112. doi: 10.1051/apido:19980106.
- Crailsheim, K. y Leonhard, B.** (1997). Amino acids in honeybee worker haemolymph. *Amino Acids* **13**, 141-

153. doi: 10.1007/BF01373212.
- Crane, E.** (1999). *The world history of beekeeping and honey hunting*. Duckworth, Duckworth, London doi: 0715628275.
- Cremer, S., Armitage, S. A. O. y Schmid-Hempel, P.** (2007). Social Immunity. *Current Biology* **17**, 693-702. doi: 10.1016/j.cub.2007.06.008.
- Currie, R. W., Pernal, S. F. y Guzmán-Novoa, E.** (2010). Honey bee colony losses in Canada. *Journal of Apicultural Research* **49**, 104-106. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.18.
- da Silva, M. J. V.** (2014). The First Report Of *Aethina tumida* In The European Union, Portugal, 2004. *Bee World* **91**, 90-91. doi: 10.1080/0005772X.2014.11417619.
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L. y Neumann, P.** (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE* **7**,. doi: 10.1371/journal.pone.0032151.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. y Hyatt, A. D.** (2000). Emerging Infectious Diseases of Wildlife-Threats to Biodiversity and Human Health.
- De Graaf, D. C., Raes, H., Sabbe, G., De Rycke, P. H. y Jacobs, F. J.** (1994). Early Development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the Midgut Epithelium of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **63**, 74-81. doi: 10.1006/jipa.1994.1012.
- De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'olio, R., Muñoz, I. y Serrano, J.** (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie, Springer Verlag* **40**, 263-284. doi: 10.1051/apido/2009027i.
- De Marco, R.** (2003). Obtención de néctar, trofalaxia, y comunicación en *Apis mellifera*.
- De Smet, L., Hatjina, F., Ioannidis, P., Hamamtzoglou, A., Schoonvaere, K., Francis, F., Meeus, I., Smagghe, G. y De Graaf, D. C.** (2017). Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0171529.
- De Souza, D. A., Kaftanoglu, O., De Jong, D., Page Jr, R. E., Amdam, G. V y Wang, Y.** (2018). Differences in the morphology, physiology and gene expression of honey bee queens and workers reared in vitro versus in situ. *Biology open* **7**, bio036616. doi: 10.1242/bio.036616.
- Desai, S. D. y Currie, R. W.** (2015). Genetic diversity within honey bee colonies affects pathogen load and relative virus levels in honey bees, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **69**, 1527-1541. doi: 10.1007/s00265-015-1965-2.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.-L. L. y Alaux, C.** (2013). Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE* **8**, 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0072016.
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G. y Pennacchio, F.** (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral

- pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 18466-18471. doi: 10.1073/pnas.1314923110.
- Dickel, F., Münch, D., Amdam, G. V., Mappes, J. y Freitak, D.** (2018). Increased survival of honeybees in the laboratory after simultaneous exposure to low doses of pesticides and bacteria. *PLoS ONE* **13**, 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0191256.
- Didier, E. S., Stovall, M. E., Green, L. C., Brindley, P. J., Sestak, K. y Didier, P. J.** (2004a). Epidemiology of microsporidiosis: Sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology* **126**, 145-166. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.006.
- Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Stovall, M. E., Green, L. C., Bowers, L., Fredenburg, A. y Didier, P. J.** (2004b). Diagnosis and epidemiology of microsporidia infections in humans. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **35**, 65-81. doi: 10.1186/bcr2486.
- DIRECTIVE 2010/63/EU** (2010). DIRECTIVE 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* **EN**, L276/33.
- Dolgikh, V. V., Tsarev, A. A., Timofeev, S. A. y Zhuravlyov, V. S.** (2019). Heterologous overexpression of active hexokinases from microsporidia *Nosema bombycis* and *Nosema ceranae* confirms their ability to phosphorylate host glucose. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-019-06279-w.
- Doublet, V., Natsopoulou, M. E., Zschiesche, L. y Paxton, R. J.** (2015a). Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **124**, 31-34. doi: 10.1016/j.jip.2014.10.007.
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J. R., Moritz, R. F. A. y Paxton, R. J.** (2015b). Bees under stress: Sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology* **17**, 969-983. doi: 10.1111/1462-2920.12426.
- Duquesne, V. y Cvetkova, S.** (2018). An inter-laboratory comparison of molecular methods for the identification of *Nosema* species in honeybee samples Adenoviridae classification View project Development of molecular diagnostic tools for honeybee diseases View project. doi: 10.5281/zenodo.1172008.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J. L., Plettner, E., Belzunces, L. P. y Le Conte, Y.** (2010). *Nosema* spp. Infection Alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* **36**, 522-525. doi: 10.1007/s10886-010-9786-2.
- Dussaubat, C., Brunet, J. L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J. H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L. P., Moritz, R. F. A., Le Conte, Y. y Alaux, C.** (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**,. doi: 10.1371/journal.pone.0037017.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretzchmar, A. y Le Conte, Y.** (2013a). Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of

- honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* **113**, 42-51. doi: 10.1016/j.jip.2013.01.002.
- Dussaubat, C., Sagastume, S., Gómez-Moracho, T., Botías, C., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Le Conte, Y. y Higes, M.** (2013b). Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Veterinary Microbiology* **162**, 670-678. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.012.
- Eiri, D. M., Suwannapong, G., Endler, M. y Nieh, J. C.** (2015). *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS ONE* **10**, 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0126330.
- Ellis, J.** (2012). The honey bee crisis the honey bee crisis. 5-10. doi: 10.1564/22feb10.
- Emsen, B., Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Eccles, L., Lacey, B., Ruiz-Pérez, R. A. y Nasr, M.** (2016). Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitology Research* **115**, 175-181. doi: 10.1007/s00436-015-4733-3.
- Engel, M. S.** (1999). The Taxonomy of Recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). *Journal of Hymenoptera Research* **8**, 165-196.
- Engel, P., Bartlett, K. D. y Moran, N. A.** (2015). The bacterium *frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host. *mBio* **6**, e00193-15. doi: 10.1128/mBio.00193-15.
- Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q., Anderson, K. E., Barribeau, S. M., Chandler, J. A., Cornman, R. S., Dainat, J., de Miranda, J. R., Doublet, V., Emery, O., Evans, J. D., Farinelli, L., Flenniken, M. L., Granberg, F., Grasis, J. A., Gauthier, L., Hayer, J., Koch, H., Kocher, S., Martinson, V. G., Moran, N., Munoz-Torres, M., Newton, I., Paxton, R. J., Powell, E., Sadd, B. M., Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., Schwarz, Se Jin Song, R. S., VanEngelsdorp, D. y Dainat, B.** (2016). The Bee Microbiome: Impact on Bee Health and Model for Evolution and Ecology of Host-Microbe Interactions. *mBio* **7**, 1-9. doi: 10.1128/mBio.02164-15.Invited.
- EPILOBEE 2012-2014** (2016). *A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014*, Version 2. ed. Laurent, M., Hendrikx, P., Ribiere-Chabert, M., y Chauzat, M.-P. European Union Reference Laboratory for honeybee health (EURL), Honeybee pathology Unit, Anses.
- European Commission** (2017). EU Pollinators Initiative: Roadmap. 1-3. doi: Ref. Ares(2017)5895634.
- Evans, J. D.** (2006). Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology* **93**, 135-139. doi: 10.1016/j.jip.2006.04.004.
- Even, N., Devaud, J.-M. y Barron, A.** (2012). General Stress Responses in the Honey Bee. *Insects* **3**, 1271-1298. doi: 10.3390/insects3041271.
- Farina, W. M. y Núñez, J. A.** (1991). Trophallaxis in the honeybee, *Apis mellifera* (L.) as related to the profitability of food sources. *Animal Behaviour* **42**, 389-394. doi: 10.1016/S0003-3472(05)80037-5.
- Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R. y Del Aguila, C.** (2009). High-level resistance of

- Nosema ceranae, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6886-6889. doi: 10.1128/AEM.01025-09.
- Ferroglio, E., Zanet, S., Peraldo, N., Tachis, E., Trisciuglio, A., Laurino, D. y Porporato, M.** (2013). *Nosema ceranae* has been infecting honey bees *Apis mellifera* in Italy since at least 1993. *Journal of Apicultural Research* **52**, 60-61. doi: 10.3896/IBRA.1.52.2.11.
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. y Gurr, S. J.** (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186-194. doi: 10.1038/nature10947.
- Fleites-Ayil, F. A., Quezada-Euán, J. J. G. y Medina-Medina, L. A.** (2018). Onset of foraging and lifespan of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) infected with different levels of *Nosema ceranae* spores in Neotropical Mexico. *Apidologie*. doi: 10.1007/s13592-018-0602-2.
- Fontbonne, R., Garnery, L., Vidau, C., Aufauvre, J., Texier, C., Tchamitchian, S., Alaoui, H. El, Brunet, J. L., Delbac, F. y Biron, D. G.** (2013). Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution* **17**, 188-194. doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.016.
- Forsgren, E. y Fries, I.** (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* **170**, 212-217. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.010.
- Forsgren, E. y Fries, I.** (2013). Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 78-82. doi: 10.1111/j.1758-2229.2012.00386.x.
- Francis, R. M., Amiri, E., Meixner, M. D., Kryger, P., Gajda, A., Andonov, S., Uzunov, A., Topolska, G., Charistos, L., Costa, C., Berg, S., Bienkowska, M., Bouga, M., Büchler, R., Dyrba, W., Hatjina, F., Ivanova, E., Kezic, N., Korpela, S., Conte, Y. Le, Panasiuk, B., Pechhacker, H., Tsoktouridis, G. y Wilde, J.** (2014). Effect of genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary—a case study. *Journal of Apicultural Research* **53**, 230-232. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.14.
- Fries, I.** (1988). Infectivity and Multiplication of *Nosema apis* Z. in the Ventriculus of the Honey Bee. *Apidologie* **19**, 319-328. doi: 10.1051/apido:19880310.
- Fries, I.** (1989). Observations on the Development and Transmission of *Nosema Apis* Z. In the Ventriculus of the Honeybee. *Journal of Apicultural Research* **28**, 107-117. doi: 10.1080/00218839.1989.11100830.
- Fries, I.** (1993). *Nosema apis*—A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World* **74**, 5-19. doi: 10.1080/0005772X.1993.11099149.
- Fries, I.** (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 73-79. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.017.
- Fries, I., Granados, R. R. y Morse, R. A.** (1992). Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie* **23**, 61-70.

- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B. y Pieniasek, N. J.** (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* **32**, 356-365. doi: 10.1016/S0932-4739(96)80059-9.
- Fries, I., Slemenda, S. B., da Silva, A. y Pieniasek, N. J.** (2003). African honey bees (*Apis mellifera scutellata*) and nosema (*Nosema apis*) infections. *Journal of Apicultural Research* **42**, 13-15. doi: 10.1080/00218839.2003.11101080.
- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D. P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R. J., Tanner, G., Webster, T. C. y Williams, G. R.** (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* **52**, 1-28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.14.
- Furgala, B. y Maunder, M. J.** (1961). A Simple Method of Feeding *Nosema Apis* Inoculum to Individual Honeybees. *Bee World*. doi: 10.1080/0005772X.1961.11096894.
- Furgala, B. F. y Mussen, E. C.** (1990). *Protozoa*, Cornell Un. ed. Morse, R. A. y Nowogrodzki, R.
- Fürst, M. A., McMahon, D. P., Osborne, J. L., Paxton, R. J. y Brown, M. J. F.** (2014). Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* **506**, 364-366. doi: 10.1038/nature12977.
- Gage, S. L., Kramer, C., Calle, S., Carroll, M., Heien, M. y DeGrandi-Hoffman, G.** (2018). *Nosema ceranae* parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). *The Journal of Experimental Biology* **221**, jeb161489. doi: 10.1242/jeb.161489.
- Galindo, L. J., Torruella, G., Moreira, D., Timpano, H., Paskerova, G., Smirnov, A., Nasonova, E. y López-García, P.** (2018). Evolutionary Genomics of *Metchnikovella incurvata* (Metchnikovellidae): An Early Branching Microsporidium. *Genome biology and evolution*. doi: 10.1093/gbe/evy205.
- García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., González-Porto, A.-V., Marin, P., Meana, A. y Higes, M.** (2010). Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* **49**, 278-283. doi: 10.3896/IBRA.1.49.3.08.
- Garibaldi, L. A. y Álvarez, C.** (2019). ENTREVISTA | Lucas Garibaldi, coordinador del informe IPBES. *eldiario.es BIODIVERSIDAD*.
- Garrido-Bailón, E.** (2012). Repercusión potencial en la cabaña apícola española de agentes nosógenos detectados en colonias de *Apis mellifera iberiensis*.
- Garrido-Bailón, E., Bartolomé, C., Prieto, L. y Botías, C.** (2012). The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental Parasitology* **132**, 530-536.
- Garrido, P. M., Porrini, M. P., Antúnez, K., Branchiccela, B., Martínez-Noël, G. M. A., Zunino, P., Salerno, G., Eguaras, M. J. y Ieno, E.** (2016). Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees. *Veterinary Research* **47**, 1-9. doi: 10.1186/s13567-016-0335-

Z.

- Gätschenberger, H., Azzami, K., Tautz, J. y Beier, H.** (2013). Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks. *PLoS ONE* **8**, e66415. doi: 10.1371/journal.pone.0066415.
- Ghoyouchi, R., Ahmadpour, E., Spotin, A., Mahami-Oskouei, M., Rezamand, A., Aminisani, N., Ghojzadeh, M., Berahmat, R. y Mikaeili-Galeh, T.** (2017). Microsporidiosis in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **10**, 341-350. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.03.017.
- Gibbs, J.** (2013). Neonicotinoids in Australia. *The Australasian Beekeeper*.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F. y Hornitzky, M.** (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* **40**, 117-123. doi: 10.1051/apido/2008065.
- Gilliam, M. y Shimanuki, H.** (1967). In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* **9**, 387-389. doi: 10.1016/0022-2011(67)90074-2.
- Gisder, S. y Genersch, E.** (2013). Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *Journal of Invertebrate Pathology* **113**, 1-6. doi: 10.1016/j.jip.2013.01.004.
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M. C., Linde, A. y Genersch, E.** (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 3032-3038. doi: 10.1128/AEM.03097-09.
- Gisder, S., Mockel, N., Linde, A. y Genersch, E.** (2011). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology* **13**, 404-413. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x.
- Gisder, S., Schüler, V., Horchler, L. L., Groth, D. y Genersch, E.** (2017). Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**, 1-14. doi: 10.3389/fcimb.2017.00301.
- Goblirsch, M.** (2018). *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* **49**, 131-150. doi: 10.1007/s13592-017-0535-1.
- Goblirsch, M., Huang, Z. Y. y Spivak, M.** (2013). Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS ONE* **8**,. doi: 10.1371/journal.pone.0058165.
- Gómez-Moracho, T., Maside, X., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Bartolomé, C.** (2014). High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. *Parasitology* **141**, 475-481. doi: 10.1017/S0031182013001790.
- Gómez-Moracho, T., Bartolomé, C., Bello, X., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Maside, X.** (2015a). Recent

- worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infection, Genetics and Evolution* **31**, 87-94. doi: 10.1016/j.meegid.2015.01.002.
- Gómez-Moracho, T., Bartolomé, C., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Maside, X.** (2015b). Evidence for weak genetic recombination at the PTP2 locus of *Nosema ceranae*. *Environmental Microbiology* **17**, 1300-1309. doi: 10.1111/1462-2920.12574.
- Gómez Moracho, T.** (2015). Análisis de los patrones de diversidad genética de *Nosema ceranae*, un patógeno emergente de *Apis mellifera*.
- Granato, A., Zecchin, B., Baratto, C., Duquesne, V., Negrisol, E., Chauzat, M.-P., Ribière-Chabert, M., Cattoli, G. y Mutinelli, F.** (2017). Introduction of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in the regions of Calabria and Sicily (southern Italy). *Apidologie* **48**, 194-203. doi: 10.1007/s13592-016-0465-3.
- Gray, F. H., Cali, A. y Briggs, J. D.** (1969). Intracellular stages in the life cycle of the microsporidian *Nosema apis*. *Journal of invertebrate pathology* **14**, 391-4.
- Graystock, P., Yates, K., Darvill, B., Goulson, D. y Hughes, W. O. H.** (2013). Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology* **114**, 114-119. doi: 10.1016/j.jip.2013.06.005.
- Graystock, P., Goulson, D. y Hughes, W. O. H.** (2014). The relationship between managed bees and the prevalence of parasites in bumblebees. *PeerJ* **2**, e522. doi: 10.7717/peerj.522.
- Graystock, P., Goulson, D. y Hughes, W. O. H.** (2015). Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**, 20151371. doi: 10.1098/rspb.2015.1371.
- Gregorc, A., Silva-Zacarin, E. C. M., Carvalho, S. M., Kramberger, D., Teixeira, E. W. y Malaspina, O.** (2016). Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere* **147**, 328-336. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.030.
- Grisdale, C. J., Bowers, L. C., Didier, E. S. y Fast, N. M.** (2013). Transcriptome analysis of the parasite *Encephalitozoon cuniculi*: an in-depth examination of pre-mRNA splicing in a reduced eukaryote. *BMC Genomics* **14**, 207. doi: 10.1186/1471-2164-14-207.
- Guerrero-Molina, C., Correa-Benítez, A., Hamiduzzaman, M. M. y Guzman-Novoa, E.** (2016). *Nosema ceranae* is an old resident of honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico, causing infection levels of one million spores per bee or higher during summer and fall. *Journal of Invertebrate Pathology* **141**, 38-40. doi: 10.1016/j.jip.2016.11.001.
- Habel, J. C., Samways, M. J. y Schmitt, T.** (2019). Mitigating the precipitous decline of terrestrial European insects : Requirements for a new strategy. *Biodiversity and Conservation*. doi: 10.1007/s10531-019-01741-8.
- Hacker, C., Howell, M., Bhella, D. y Lucocq, J.** (2014). Strategies for maximizing ATP supply in the

- microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. *Cellular Microbiology* **16**, 565-579. doi: 10.1111/cmi.12240.
- Haddad, N. J.** (2014). First Detection of *Nosema ceranae* in Jordan. *European Scientific Journal* **10**, 1857-7881.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford University Press -Nucleic Acid Symposium* **41**, 95-98. doi: 10.12691/ajidm-4-3-3.
- Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., Stenmans, W., Müller, A., Sumser, H., Hörren, T., Goulson, D. y De Kroon, H.** (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS ONE* **12**,. doi: 10.1371/journal.pone.0185809.
- Hassanein, M. H.** (1953). The influence of infection with *Nosema apis* on the activities and longevity of the worker Honeybee. *Annals of Applied Biology* **40**, 418-423. doi: 10.1111/j.1744-7348.1953.tb01093.x.
- Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzis, D., Meeus, I., Brunain, M., Smagghe, G. y De Graaf, D. C.** (2011). Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**, 131-134. doi: 10.1016/j.jip.2011.07.003.
- Haydak, M. H.** (1970). Honey bee nutrition. *Annual Reviews of Entomology* **15**,. doi: 10.1146/annurev.en15.010170.001043.
- Hedtke, K., Jensen, P. M., Jensen, A. B. y Genersch, E.** (2011). Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**, 167-173. doi: 10.1016/j.jip.2011.08.006.
- Higes, M., Martín, R. y Meana, A.** (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**, 93-95. doi: 10.1016/j.jip.2006.02.005.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R. y Meana, A.** (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* **94**, 211-217. doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., Palencia, P. G. y Meana, A.** (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* **10**, 2659-2669. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Botías, C., García-Palencia, P. y Meana, A.** (2008b). Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environmental Microbiology* **10**, 1374-1379. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01548.x.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P. y Meana, A.** (2008c). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 76-78. doi: 10.1016/j.jip.2007.06.002.

- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M. J., Mayo, R. y Bernal, J. L.** (2009a). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports* **1**, 110-113. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Botías, C. y Meana, A.** (2009b). The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research* **48**, 217-219. doi: 10.3896/IBRA.1.48.3.12.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Martín, P. y Meana, A. M.** (2009c). Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* **1**, 495-498. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00052.x.
- Higes, M., García-Palencia, P., Botías, C., Meana, A. y Martín-Hernández, R.** (2010a). The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environmental Microbiology Reports*. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00170.x.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., Meana, A., Bernal, J. L., del Nozal, M. J. y Bernal, J. L.** (2010b). A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports* **2**, 243-250. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00099.x.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., Higes, M., Martín-Hernández, R. y Meana, A.** (2010c). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* **41**, 375-392. doi: 10.1051/apido/2010019.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C. y Martín-Hernández, R.** (2013a). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 17-29. doi: 10.1111/1758-2229.12024.
- Higes, M., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Lucena, S., Botías, C., Meana, A., García-Palencia, P. y Martín-Hernández, R.** (2013b). Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* **5**, 530-536. doi: 10.1111/1758-2229.12059.
- Higes, M., Gómez-Moracho, T., Rodríguez-García, C., Botías, C. y Martín-Hernández, R.** (2015). Preliminary effect of an experimental treatment with “Nozevit®”, (a phyto-pharmacological preparation) for *Nosema ceranae* control. *Journal of Apicultural Research* **53**, 472-474. doi: 10.3896/IBRA.1.53.4.03.
- Hillyer, J. F.** (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology* **58**, 102-118. doi: 10.1016/j.dci.2015.12.006.
- Hillyer, J. F., Schmidt, S. L., Fuchs, J. F., Boyle, J. P. y Christensen, B. M.** (2004). Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cellular Microbiology* **7**, 39-51. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00430.x.
- Holt, H. L. y Grozinger, C. M.** (2016). Approaches and Challenges to Managing *Nosema* (Microspora:

- Nosematidae) Parasites in Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Journal of Economic Entomology* **109**, 1487-1503. doi: 10.1093/jee/tow103.
- Holt, H. L., Aronstein, K. A. y Grozinger, C. M.** (2013). Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* **14**, doi: 10.1186/1471-2164-14-799.
- Huang, W. F. y Solter, L. F.** (2013). Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **113**, 35-41. doi: 10.1016/j.jip.2013.01.001.
- Huang, W.-F., Jiang, J.-H. y Wang, C.-H.** (2005). *Nosema ceranae* infection in *Apis mellifera*. En *38th Annual Meeting Society For Invertebrate Pathology Program and Abstracts* (ed. Vlak, J., Gelernter, W., Thiem, S., Krell, P., y Kaya, H.), p. 78. Anchorage, Alaska.
- Huang, W.-F., Jiang, J.-H., Chen, Y.-W. y Wang, C.-H.** (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* **38**, 30-37. doi: 10.1051/apido.
- Huang, W. F., Bocquet, M., Lee, K. C., Sung, I. H., Jiang, J. H., Chen, Y. W. y Wang, C. H.** (2008). The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 9-13. doi: 10.1016/j.jip.2007.07.001.
- Huang, Q., Kryger, P., Le Conte, Y. y Moritz, R. F. A. A.** (2012). Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 297-302. doi: 10.1016/j.jip.2012.01.004.
- Huang, W. F., Solter, L. F., Yau, P. M. y Imai, B. S.** (2013). *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. *PLoS Pathogens* **9**, doi: 10.1371/journal.ppat.1003185.
- Huang, W. F., Solter, L., Aronstein, K. y Huang, Z.** (2015). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **124**, 107-113. doi: 10.1016/j.jip.2014.10.006.
- Huang, Q., Chen, Y. P., Wang, R. W., Cheng, S. y Evans, J. D.** (2016). Host-Parasite Interactions and Purifying Selection in a Microsporidian Parasite of Honey Bees. *PLoS ONE* **11**, 6-8. doi: 10.1371/journal.pone.0147549.
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F.-L., Jaffé, R., Jensen, A. B., Köhler, A., Magyar, J. P., Özkýrým, A., Pirk, C. W. W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D. R., van der Steen, J. J. M., Vaudo, A., Vejsnæs, F., Wilde, J., Williams, G. R. y Zheng, H.-Q.** (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* **52**, 1-53. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.10.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G. y Mendoza, Y.** (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**, 150-153. doi: 10.1016/j.jip.2009.03.006.
- IPBES** (2017). *The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and*

- Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production*. ed. Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., y Ngo, H. T.
- IPBES** (2019). *Media Release: Nature's Dangerous Decline 'Unprecedented'; Species Extinction Rates 'Accelerating'* | IPBES. ed. Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services.
- Jack, C. J., Uppala, S. S., Lucas, H. M. y Sagili, R. R.** (2016a). Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of Insect Physiology* **87**, 12-19. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.01.004.
- Jack, C. J. C. J., Lucas, H. M. H. M., Webster, T. C. T. C. y Sagili, R. R. R. R.** (2016b). Colony level prevalence and intensity of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS ONE* **11**, 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0163522.
- James, R. R. y Xu, J.** (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 175-182. doi: 10.1016/j.jip.2011.12.005.
- James, T. Y., Pelin, A., Bonen, L., Ahrendt, S., Sain, D., Corradi, N. y Stajich, J. E.** (2013). Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite cryptomycota and microsporidia. *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2013.06.057.
- Jara, L., Cepero, A., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Higes, M. y De la Rúa, P.** (2012). Linking evolutionary lineage with parasite and pathogen prevalence in the Iberian honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology* **110**, 8-13. doi: 10.1016/j.jip.2012.01.007.
- Jara Nicolás, L.** (2012). Diversidad genética e incidencia de agentes nosógenos (*Varroa destructor*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*) en colonias de abejas ibéricas (*Apis mellifera iberiensis*).
- Jones, J. C., Fruciano, C., Hildebrand, F., Al Toufalilia, H., Balfour, N. J., Bork, P., Engel, P., Ratnieks, F. L. y Hughes, W. O.** (2018a). Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and Evolution* **8**, 441. doi: 10.1002/ece3.3597.
- Jones, J. C., Fruciano, C., Marchant, J., Hildebrand, F., Forslund, S., Bork, P., Engel, P. y Hughes, W. O. H.** (2018b). The gut microbiome is associated with behavioural task in honey bees. *Insectes Sociaux* **65**, 419-429. doi: 10.1007/s00040-018-0624-9.
- Kaminski, M. V, Armstrong, M. K. y Cherny, E.** (2018). Anorexia of infection as a mechanism of host defense. *The American Journal of Clinical Nutrition* **32**, 2167-2167. doi: 10.1093/ajcn/32.11.2167.
- Keeling, P. J. y Fast, N. M.** (2002). Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology* **56**, 93-116. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160854.
- Khezri, M., Moharrami, M., Modirrousta, H., Torkaman, M., Salehi, S., Rokhzad, B. y Khanbabai, H.** (2018). Molecular detection of *Nosema ceranae* in the apiaries of Kurdistan province, Iran. *Veterinary Research Forum* **9**, 273-278. doi: 10.30466/vrf.2018.32086.
- Khoury, D. S., Myerscough, M. R. y Barron, A. B.** (2011). A Quantitative Model of Honey Bee Colony

- Population Dynamics. *PLoS ONE* **6**, e18491. doi: 10.1371/journal.pone.0018491.
- Khoury, D. S., Barron, A. B. y Myerscough, M. R.** (2013). Modelling Food and Population Dynamics in Honey Bee Colonies. *PLoS ONE* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0059084.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A. y Posyniak, A.** (2016). Pesticide poisoning of honeybees: A review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *Journal of Apicultural Science*. doi: 10.1515/JAS-2016-0024.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Gawel, M., Semeniuk, S., Borzęcka, M., Posyniak, A. y Pohorecka, K.** (2017). Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – Preliminary exposure assessment. *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.028.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R. J., Kryger, P., Genersch, E., Paxton, R. J., Klee, J., Besana, A. M., Ruz, J. M., Nanetti, A., Message, D., Chinh, T. X., Fries, I., Tam, D. Q., Puerta, F. y Hatjina, F.** (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**, 1-10. doi: 10.1016/j.jip.2007.02.014.
- Klowden, M. J.** (2002). *Physiological systems in insects*, Third edit. Elsevier Inc.
- Kohl, P. L. y Rutschmann, B.** (2018). The neglected bee trees: European beech forests as a home for feral honey bee colonies. *PeerJ* **6**, e4602. doi: 10.7717/peerj.4602.
- Kralj, J. y Fuchs, S.** (2009). *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* **41**, 21-28. doi: 10.1051/apido/2009046.
- Krebes, L., Zeidler, L., Frankowski, J. y Bastrop, R.** (2014). (Cryptic) sex in the microsporidian *Nosema granulosis* – Evidence from parasite rDNA and host mitochondrial DNA. *Infection, Genetics and Evolution* **21**, 259-268. doi: 10.1016/j.meegid.2013.11.007.
- Kudo, R.** (1918). Experiments on the Extrusion of Polar Filaments of Cnidosporidian Spores. *Journal of Parasitology* **4**, 141-147. doi: 10.2307/3271239.
- Kurze, C., Le Conte, Y., Dussaubat, C., Erler, S., Kryger, P., Lewkowski, O., Müller, T., Widder, M. y Moritz, R. F. A.** (2015). *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. *PLoS ONE* **10**, 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0140174.
- Kurze, C., Routtu, J. y Moritz, R. F. A.** (2016a). Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology* **119**, 290-297. doi: 10.1016/j.zool.2016.03.007.
- Kurze, C., Mayack, C., Hirche, F., Stangl, G. I., Le Conte, Y., Kryger, P. y Moritz, R. F. A.** (2016b). *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitology Research* **115**, 2381-2388. doi: 10.1007/s00436-016-4988-3.
- Kyriazakis, I., Tolkamp, B. J. y Hutchings, M. R.** (1998). Towards a functional explanation for the occurrence

- of anorexia during parasitic infections. *Animal Behaviour* **56**, 265-274. doi: 10.1006/anbe.1998.0761.
- L'Arrivée, J. C. M.** (1963). The effect of sampling sites on *Nosema* determination. *J Insect Pathol* **5**, 349-355.
- Lautenbach, S.** (2019). Provisioning Ecosystem Services at Risk: Pollination Benefits and Pollination Dependency of Cropping Systems at the Global Scale. En *Atlas of Ecosystem Services* (ed. Schröter, M., Bonn, A., Klotz, S., Seppelt, R., y Baessler, C.), pp. 97-104. Springer, Cham doi: 10.1007/978-3-319-96229-0_16.
- Lecocq, A., Jensen, A. B., Kryger, P. y Nieh, J. C.** (2016). Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific Reports* **6**, 1-11. doi: 10.1038/srep22042.
- Lee, S. C., Corradi, N., Doan, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J. y Heitman, J.** (2010). Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi. *PLoS ONE* **5**, e10539. doi: 10.1371/journal.pone.0010539.
- Lee, S., Hong, K.-J., Cho, Y. S., Choi, Y. S., Yoo, M.-S. y Lee, S.** (2017). Review of the subgenus *Aethina* Erichson s. str. (Coleoptera: Nitidulidae: Nitidulinae) in Korea, reporting recent invasion of small hive beetle, *Aethina tumida*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **20**, 553-558. doi: 10.1016/J.ASPEN.2017.03.006.
- Li, J., Chen, W., Wu, J., Peng, W., An, J., Schmid-Hempel, P. y Schmid-Hempel, R.** (2012a). Diversity of nosema associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China. *International Journal for Parasitology* **42**, 49-61. doi: 10.1016/j.ijpara.2011.10.005.
- Li, J., Qin, H., Wu, J., Sadd, B. M., Wang, X., Evans, J. D., Peng, W. y Chen, Y.** (2012b). The Prevalence of Parasites and Pathogens in Asian Honeybees *Apis cerana* in China. *PLoS ONE* **7**, 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0047955.
- Li, J. H., Evans, J. D., Li, W. F., Zhao, Y. Z., DeGrandi-Hoffman, G., Huang, S. K., Li, Z. G., Hamilton, M. y Chen, Y. P.** (2017a). New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PloS one* **12**, e0187505. doi: 10.1371/journal.pone.0187505.
- Li, W., Evans, J. D., Li, J., Su, S., Hamilton, M. y Chen, Y.** (2017b). Spore load and immune response of honey bees naturally infected by *Nosema ceranae*. *Parasitology Research* **116**, 3265-3274. doi: 10.1007/s00436-017-5630-8.
- Li, W., Chen, Y. y Cook, S. C.** (2018). Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. *International Journal for Parasitology* 1-12. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.11.004.
- Li, Z., He, J., Yu, T., Chen, Y., Huang, W.-F., Huang, J., Zhao, Y., Nie, H. y Su, S.** (2019). Transcriptional and physiological responses of hypopharyngeal glands in honeybees (*Apis mellifera* L.) infected by *Nosema ceranae*. *Apidologie*. doi: 10.1007/s13592-018-0617-8.
- Lodesani, M. y Costa, C. eds.** (2005). Beekeeping for maintaining biodiversity. En *Beekeeping and Conserving*

Biodiversity of Honeybees, pp. 1-14. Hebden Bridge.

- Lodesani, M., Costa, C., Besana, A., Dall'Olio, R., Franceschetti, S., Tesoriero, D. y Giacomo, D.** (2014). Impact of control strategies for *Varroa destructor* on colony survival and health in northern and central regions of Italy. *Journal of Apicultural Research* **53**, 155-164. doi: 10.3896/IBRA.1.53.1.17.
- Lotmar, R.** (1944). Über den Einfluss der Temperatur auf den Parasiten *Nosema apis*. *Beih Schweiz Bienen-ztg* **67**, 17-19.
- Lourenço, A. P., Guidugli-Lazzarini, K. R., Freitas, F. C. P., Bitondi, M. M. G. y Simões, Z. L. P.** (2013). Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**, 474-482. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.03.001.
- Lundie** (1940). The Small Hive Beetle, *Aethina tùmida*. *Science Bull* **220**, 40.
- MacInnis, C. I.** (2017). *Nosema ceranae*: A sweet surprise? Investigating the viability and infectivity of the honey bee (*Apis mellifera* L.) parasite *N. ceranae*.
- Maes, P. W., Rodrigues, P. A. P., Oliver, R., Mott, B. M. y Anderson, K. E.** (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology* **25**, 5439-5450. doi: 10.1111/mec.13862.
- MAGRAMA** (2015). *Programas Sanitarios - Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad*.
- MAGRAMA** (2018). Informe de resultados del programa de vigilancia 2016-2017 sobre las pérdidas de colonias de abejas. *Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad*.
- MAGRAMA** (2019). Estadística anual de consumo de productos fitosanitarios y Estadística quinquenal de utilización de productos fitosanitarios en la Agricultura.
- Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G., Caldon, M., Mutinelli, F. y Granato, A.** (2008). Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. doi: 10.1051/apido:2008022.
- Malone, L. A. y Gatehouse, H. S.** (1998). *Effects of Nosema apis Infection on Honey Bee (Apis mellifera) Digestive Proteolytic Enzyme Activity*.
- Malone, L. a, Giacon, H. a y Newton, M. R.** (1995). Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. *Apidologie* **26**, 495-502. doi: 10.1051/apido:19950606.
- Malone, L. A., Gatehouse, H. S. y Tregidga, E. L.** (2001). Effects of time, temperature, and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **77**, 258-268. doi: 10.1006/jipa.2001.5028.
- Malysh, J. M., Ignatieva, A. N., Artokhin, K. S., Frolov, A. N. y Tokarev, Y. S.** (2018). Natural infection of the beet webworm *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Crambidae) with three Microsporidia and host switching in *Nosema ceranae*. *Parasitology Research* **117**, 3039-3044. doi: 10.1007/s00436-018-5987-3.

- Marringa, W. J., Krueger, M. J., Burritt, N. L. y Burritt, J. B.** (2014). Honey bee hemocyte profiling by flow cytometr. *PLoS ONE* **9**, 39-41. doi: 10.1371/journal.pone.0108486.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E. y Higes, M.** (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6331-6338. doi: 10.1128/AEM.00270-07.
- Martín-Hernández, R., Aránzazu Meana, García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Barrios, L. y Higes, M.** (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2554-2557. doi: 10.1128/AEM.02908-08.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C. y Higes, M.** (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research* **109**, 605-612. doi: 10.1007/s00436-011-2292-9.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A. y Higes, M.** (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: Coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology* **14**, 2127-2138. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x.
- Martín-Hernández, R., Higes, M., Sagastume, S., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Budge, G. E., Meana, A. y Boonham, N.** (2017). Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS ONE* **12**, 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0170183.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M. A., Soroker, V. y Higes, M.** (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years post-detection perspective. *Environmental Microbiology* **20**, 1302-1329. doi: 10.1111/1462-2920.14103.
- Martínez, J., Leal, G. y Conget, P.** (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitology Research* **111**, 601-607. doi: 10.1007/s00436-012-2875-0.
- Martínez Pozo, M. A.** (2004). Flora melífera conquense. Asociación provincial de apicultores de Cuenca. *Diputación provincial de Cuenca, España*.
- Maside, X., Gómez-Moracho, T., Jara, L., Martín-Hernández, R., De La Rúa, P., Higes, M. y Bartolomé, C.** (2015). Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: One host (*apis mellifera*) and two different histories. *PLoS ONE* **10**, 1-21. doi: 10.1371/journal.pone.0145609.
- Mayack, C. y Naug, D.** (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **100**, 185-188. doi: 10.1016/j.jip.2008.12.001.
- Mayack, C. y Naug, D.** (2010). Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of Insect Physiology* **56**, 1572-1575. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.05.016.
- Mayack, C. y Naug, D.** (2013). Individual energetic state can prevail over social regulation of foraging in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **67**, 929-936. doi: 10.1007/s00265-013-1517-6.

- Mayack, C., Natsopoulou, M. E. y McMahon, D. P.** (2015). *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Molecular Biology* **24**, 662-670. doi: 10.1111/imb.12190.
- McDonnell, C. M., Alaux, C., Parrinello, H., Desvignes, J. P., Crauser, D., Durbesson, E., Beslay, D. y Le Conte, Y.** (2013). Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecology* **13**. doi: 10.1186/1472-6785-13-25.
- McGowan, J., De la Mora, A., Goodwin, P. H., Habash, M., Hamiduzzaman, M. M., Kelly, P. G. y Guzman-Novoa, E.** (2016). Viability and infectivity of fresh and cryopreserved *Nosema ceranae* spores. *Journal of Microbiological Methods* **131**, 16-22. doi: 10.1016/j.mimet.2016.09.021.
- McNamara-Bordewick, N. K., McKinstry, M. y Snow, J. W.** (2019). Robust Transcriptional Response to Heat Shock Impacting Diverse Cellular Processes despite Lack of Heat Shock Factor in Microsporidia. *mSphere* **4**, 1-15. doi: 10.1128/msphere.00219-19.
- Meana, A. M., Martín-Hernández, R. y Higes, M.** (2010). The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research* **49**, 212-214. doi: 10.3896/IBRA.1.49.2.12.
- Meana, A., Llorens-Picher, M., Euba, A., Bernal, J. L., Bernal, J., García-Chao, M., Dagnac, T., Castro-Hermida, J. A., Gonzalez-Porto, A. V., Higes, M. y Martín-Hernández, R.** (2017). Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* **15**, e0501. doi: 10.5424/sjar/2017151-9652.
- Mendoza, Y., Antúnez, K., Branchiccela, B., Anido, M., Santos, E. y Invernizzi, C.** (2014). *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie* **45**, 224-234. doi: 10.1007/s13592-013-0241-6.
- Mendoza, Y., Diaz-Cetti, S., Ramallo, G., Santos, E., Porrini, M. y Invernizzi, C.** (2017). *Nosema ceranae* Winter Control: Study of the Effectiveness of Different Fumagillin Treatments and Consequences on the Strength of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Journal of economic entomology* **110**, 1-5. doi: 10.1093/jee/tow228.
- Micheu, S., Crailsheim, K. y Leonhard, B.** (2000). Importance of proline and other amino acids during honeybee flight--*Apis mellifera carnica* POLLMANN). *Amino acids* **18**, 157-75.
- Milbrath, M. O., Xie, X. y Huang, Z. Y.** (2013). *Nosema ceranae* induced mortality in honey bees (*Apis mellifera*) depends on infection methods. *Journal of Invertebrate Pathology* **114**, 42-44. doi: 10.1016/j.jip.2013.05.006.
- Milbrath, M. O., van Tran, T., Huang, W. F., Solter, L. F., Tarpy, D. R., Lawrence, F. y Huang, Z. Y.** (2015). Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **125**, 9-15. doi: 10.1016/j.jip.2014.12.006.
- MITECO** (2019). Borrador de plan de acción nacional para la conservación de los polinizadores - Versión 1. 18 de enero de 2019. *Ministerio para La Transición Ecológica* **1**, 1-73.

- Morimoto, T., Kojima, Y., Toki, T., Komeda, Y., Yoshiyama, M., Kimura, K., Nirasawa, K. y Kadowaki, T.** (2011). The habitat disruption induces immune-suppression and oxidative stress in honey bees. *Ecology and Evolution* **1**, 201-217. doi: 10.1002/ece3.21.
- Moritz, R. F. A. y Hallmen, M.** (1986). Trophallaxis of worker honeybees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Insectes Sociaux* **33**, 26-31. doi: 10.1007/BF02224032.
- Moritz, R. F. A. A. y Heisler, T.** (1992). Super and half-sister discrimination by honey bee workers (*Apis mellifera* L.) in a trophallactic bioassay. *Insectes Sociaux* **39**, 365-372. doi: 10.1007/BF01240621.
- Moritz, R. F. A., de Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P. y Paxton, R. J.** (2010). Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* **41**, 227-242. doi: 10.1051/apido/2010010.
- Müller, U., McMahon, D. P. y Rolff, J.** (2019). Exposure of the wild bee *Osmia bicornis* to the honey bee pathogen *Nosema ceranae*. *Agricultural and Forest Entomology*. doi: 10.1111/afe.12338.
- Nabian, S., Ahmadi, K., Nazem Shirazi, M. H. y Gerami Sadeghian, A.** (2011). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian protozoa of European honeybees (*Apis mellifera*) in Iran. *Iranian Journal of Parasitology* **6**, 89-95. doi: 10.1093/etrology/39.1.125.
- Nanetti, A., Rodríguez-García, C., Meana, A., Martín-Hernández, R. y Higes, M.** (2015). Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Research in Veterinary Science* **102**, 167-172. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.08.003.
- Natsopoulou, M. E., McMahon, D. P., Doublet, V., Bryden, J. y Paxton, R. J.** (2014). Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**, 20141896-20141896. doi: 10.1098/rspb.2014.1896.
- Natsopoulou, M. E., Doublet, V. y Paxton, R. J.** (2016). European isolates of the Microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees. *Apidologie* **47**, 57-65. doi: 10.1007/s13592-015-0375-9.
- Naug, D.** (2014). Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. *Biology Letters* **10**, 20140731-20140731. doi: 10.1098/rsbl.2014.0731.
- Naug, D. y Gibbs, A.** (2009). Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* **40**, 595-599. doi: 10.1051/apido/2009039.
- Neumann, P. y Blacquièrre, T.** (2017). The Darwin cure for apiculture? Natural selection and managed honeybee health. *Evolutionary Applications* **10**, 226-230. doi: 10.1111/eva.12448.
- Neumann, P., Pettis, J. S. y Schäfer, M. O.** (2016). Quo vadis *Aethina tumida*? Biology and control of small hive beetles. *Apidologie* **47**, 427-466. doi: 10.1007/s13592-016-0426-x.
- Nieto, A., Roberts, S. P. M., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., Criado, M. G., Biesmeijer, J. C., Bogusch, P., Dathe, H. H., Rúa, P. D. La, Meulemeester, T. De, Dehon, M., Dewulf, A., Ortiz-Sánchez,**

- F. J., Lhomme, P., Pauly, A., Potts, S. G., Praz, C., Quaranta, M., Radchenko, V. G., Scheuchl, E., Smit, J., Straka, J., Terzo, M., Tomozii, B., Window, J. y Michez, D.** (2014). *European Red List of Bees*. ed. Publications Office of the European Union IUCN Global Species Programme IUCN; European Union Representative Office, Luxembourg doi: 10.2779/77003.
- Nilsen, K.-A., Ihle, K. E., Frederick, K., Fondrk, M. K., Smedal, B., Hartfelder, K. y Amdam, G. V.** (2011). Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *Journal of Experimental Biology* **214**, 1488-1497. doi: 10.1242/jeb.050393.
- Nixon, H. L. y Ribbands, C. R.** (1952). Food transmission within the honeybee community. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* **140**, 43-50. doi: 10.1098/rspb.1952.0042.
- OIE** (2018). Nosemosis of Honey Bess. En *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, pp. 744-749.
- Osanai, M. y Yonezawa, Y.** (1986). Changes in amino acid pools in the silkworm, *Bombyx mori* during embryonic life. Alanine accumulation and its conversion to proline during diapause. *Insect Biochemistry* **16**, 373-379. doi: 10.1016/0020-1790(86)90050-8.
- Ostroverkhova, N. V., Kucher, A. N., Golubeva, E. P., Rosseykina, S. A. y Konusova, O. L.** (2019). Study Of Nosema spp. In The Tomsk Region, Siberia: Co-Infection Is Widespread In Honeybee Colonies. *Far Eastern Entomologist Number* **378**, 12-22. doi: 10.25221/fee.378.3.
- Ozgor, E., Celebier, I., Ulusoy, M. y Keskin, N.** (2017). First Detection of Nosema ceranae and Nosema apis in Greater Wax Moth Galleria mellonella. *Journal of Apicultural Science*. doi: 10.1515/JAS-2017-0015.
- Özgör, E., Güzerin, E. y Keskin, N.** (2015). Determination and Comparison of Nosema apis and Nosema ceranae in Terms of Geographic and Climatic Factors. *Hacettepe J. Biol. & Chem. Hacettepe J. Biol. & Chem* **43**, 9-15. doi: 10.15671/HJBC.20154311200.
- Paldi, N., Glick, E., Oliva, M., Zilberberg, Y., Aubin, L., Pettis, J., Chen, Y. y Evans, J. D.** (2010). Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 5960-5964. doi: 10.1128/AEM.01067-10.
- Palmeri, V., Scirtò, G., Malacrinò, A., Laudani, F. y Campolo, O.** (2015). A scientific note on a new pest for European honeybees: first report of small hive beetle *Aethina tumida*, (Coleoptera: Nitidulidae) in Italy. *Apidologie* **46**, 527-529. doi: 10.1007/s13592-014-0343-9.
- Panek, J., Paris, L., Roriz, D., Mone, A., Dubuffet, A., Delbac, F., Diogon, M. y El Alaoui, H.** (2018). Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **159**, 121-128. doi: 10.1016/j.jip.2018.09.007.
- Paxton, R. J.** (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research* **49**, 80-84. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.11.
- Paxton, R., Fries, I., Pieniasek, N., Tengö, J., Paxton, R. J. y Pieniasek, N. J.** (1997). *High incidence of infection of an undescribed microsporidium (Microspora) in the communal bee Andrena scotica*

- (*Hymenoptera, Andrenidae*). Springer Verlag.
- Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S. y Fries, I.** (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* **38**, 558-565. doi: 10.1051/apido.
- Pelin, A., Selman, M., Aris-Brosou, S., Farinelli, L. y Corradi, N.** (2015). Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen *Nosema ceranae*. *Environmental Microbiology* **17**, 4443-4458. doi: 10.1111/1462-2920.12883.
- Peng, Y., Baer-Imhoof, B., Harvey Millar, A. y Baer, B.** (2015). Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports* **5**, 1-11. doi: 10.1038/srep10565.
- Pernal, S. F., Ibrahim, A. y Melathopoulos, A. P.** (2010). Disinfection of *Nosema ceranae* Infected Comb by Irradiation Acetic Acid and Heat. En *American Bee Research Conference 2010*, p. 505. Florida, USA.
- Perry, C. J., Søvik, E., Myerscough, M. R. y Barron, A. B.** (2015). Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 3427-3432. doi: 10.1073/pnas.1422089112.
- Pettis, J. S., Vanengelsdorp, D., Johnson, J. y Dively, G.** (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **99**, 153-158. doi: 10.1007/s00114-011-0881-1.
- Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R. y vanEngelsdorp, D.** (2013). Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **8**,. doi: 10.1371/journal.pone.0070182.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. y Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**, 36e - 36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36.
- Piironen, S., Botías, C., Nicholls, E. y Goulson, D.** (2016). No effect of low-level chronic neonicotinoid exposure on bumblebee learning and fecundity. *PeerJ*. doi: 10.7717/peerj.1808.
- Pipan, N. y Rakovec, V.** (1980). Cell death in the midgut epithelium of the worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) during metamorphosis. *Zoomorphologie* **94**, 217-224. doi: 10.1007/BF01081936.
- Plischuk, S., Antúnez, K., Haramboure, M., Minardi, G. M. y Lange, C. E.** (2017). Long-term prevalence of the protists *Crithidia bombi* and *Apicystis bombi* and detection of the microsporidium *Nosema bombi* in invasive bumble bees. *Environmental Microbiology Reports* **9**, 169-173. doi: 10.1111/1758-2229.12520.
- Porrini, M. P., Sarlo, E. G., Medici, S. K., Garrido, P. M., Porrini, D. P., Damiani, N. y Eguaras, M. J.** (2011a). *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera* : influence of diet and infective inoculum. *Journal of Apicultural Research*. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.04.

- Porrini, M. P., Fernández, N. J., Garrido, P. M., Gende, L. B., Medici, S. K. y Eguaras, M. J.** (2011b). In vivo evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Apidologie* **42**, 700-707. doi: 10.1007/s13592-011-0076-y.
- Porrini, C., Mutinelli, F., Bortolotti, L., Granato, A., Laurenson, L., Roberts, K., Gallina, A., Silvester, N., Medrzycki, P., Renzi, T., Sgolastra, F. y Lodesani, M.** (2016). The status of honey bee health in Italy: Results from the nationwide bee monitoring network. *PLoS ONE* **11**, 1-22. doi: 10.1371/journal.pone.0155411.
- Porrini, M. P., Porrini, L. P., Garrido, P. M., de Melo e Silva Neto, C., Porrini, D. P., Muller, F., Nuñez, L. A., Alvarez, L., Iriarte, P. F. y Eguaras, M. J.** (2017). *Nosema ceranae* in South American Native Stingless Bees and Social Wasp. *Microbial Ecology* **74**, 761-764. doi: 10.1007/s00248-017-0975-1.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. y Kunin, W. E.** (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J. y Vanbergen, A. J.** (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*. doi: 10.1038/nature20588.
- Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K. y Moran, N. A.** (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.01861-14.
- Ptaszyńska, A. A., Paleolog, J. y Borsuk, G.** (2016). *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honey bee intestines. *PLoS ONE* **11**, 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0164477.
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G. y de Graaf, D. C.** (2013). Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. *PLoS ONE* **8**,. doi: 10.1371/journal.pone.0072443.
- Regan, T., Barnett, M. W., Laetsch, D. R., Bush, S. J., Wragg, D., Budge, G. E., Hight, F., Dainat, B., de Miranda, J. R., Watson, M., Blaxter, M. y Freeman, T. C.** (2018). Characterisation of the British honey bee metagenome. *Nature communications* **9**, 4995. doi: 10.1038/s41467-018-07426-0.
- Reglamento de la Comisión UE no. 37/2010** (2010). *REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal (Texto pert.*
- Requier, F., Garnery, L., Kohl, P. L., Njovu, H. K., Pirk, C. W. W., Crewe, R. M. y Steffan-Dewenter, I.** (2019). The Conservation of Native Honey Bees Is Crucial. *Trends in Ecology and Evolution* **xx**, 1-10. doi: 10.1016/j.tree.2019.04.008.
- Retschnig, G., Neumann, P. y Williams, G. R.** (2014). Thiacloprid-*Nosema ceranae* interactions in honey bees: Host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *Journal of Invertebrate*

- Pathology* **118**, 18-19. doi: 10.1016/j.jip.2014.02.008.
- Retschnig, G., Williams, G. R., Odemer, R., Boltin, J., Di Poto, C., Mehmman, M. M., Retschnig, P., Winiger, P., Rosenkranz, P. y Neumann, P.** (2015). Effects, but no interactions, of ubiquitous pesticide and parasite stressors on honey bee (*Apis mellifera*) lifespan and behaviour in a colony environment. *Environmental Microbiology* **17**, 4322-4331. doi: 10.1111/1462-2920.12825.
- Ricigliano, V. A., Mott, B. M., Maes, P. W., Floyd, A. S., Fitz, W., Copeland, D. C., Meikle, W. G. y Anderson, K. E.** (2019). Honey bee colony performance and health are enhanced by apiary proximity to US Conservation Reserve Program (CRP) lands. *Scientific Reports* **9**, 4894. doi: 10.1038/s41598-019-41281-3.
- Rinderer, T. E.** (1976). Honey Bees: Individual Feeding of Large Numbers of Adult Workers123. *Journal of Economic Entomology* **69**, 489-491. doi: 10.1093/jee/69.4.489.
- Rivas-Martinez, S., Gutiérrez, G., Andrade, J. M. A., Montero, J. L. y González Rebollar, B. J. L.** (1987). *Memoria del mapa de series de vegetación de España*, ICONA. ed. MAGRAMA, I. Madrid.
- Roberts, K. E. y Hughes, W. O. H.** (2014). Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **121**, 1-6. doi: 10.1016/j.jip.2014.06.004.
- Roberts, K. E. y Hughes, W. O. H.** (2015). Horizontal transmission of a parasite is influenced by infected host phenotype and density. *Parasitology* **142**, 395-405. doi: 10.1017/S0031182014001243.
- Roberts, K. E., Evison, S. E. F., Baer, B. y Hughes, W. O. H.** (2015). The cost of promiscuity: Sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports* **5**, 1-7. doi: 10.1038/srep10982.
- Rodríguez-García, C., Cabbri, C., Higes, M., Meana, A., Nanetti, A. y Martín-Hernández, R.** (2014). *Nosema ceranae* gene expresión to study the intracellular cell cycle in the honey bee host. En (ed. De La Rúa, P.), p. 139. Murcia.
- Rodríguez-García, C.** (2017). Nuevas estrategias para el control de la nosemosis en *Apis mellifera* L. . doi: 10.1128/AEM.70.2.1031.
- Rodríguez-García, C., Higes, M., De La Rúa, P. y Martín-Hernández, R.** (2014). Comparative analysis of different methods for gDNA extraction and detection of *Nosema ceranae*, *Nosema apis* and *Nosema bombi*. En *Proceedings of the Sixth European Conference of Apidologie* (ed. De la Rúa, P.), pp. 211-212. Universidad de Murcia, Murcia, Spain.
- Rodríguez-García, C., Evans, J. D., Li, W., Branchiccela, B., Li, J. H., Heerman, M. C., Banmeke, O., Zhao, Y., Hamilton, M., Higes, M., Martín-Hernández, R. y Chen, Y. P.** (2018). Nosemosis control in European honey bees, *Apis mellifera*, by silencing the gene encoding *Nosema ceranae* polar tube protein 3. *The Journal of Experimental Biology* **221**, jeb184606. doi: 10.1242/jeb.184606.
- Rodríguez, M., Vargas, M., Antúnez, K., Gerding, M., Ovidio Castro, F. y Zapata, N.** (2014). Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biobío Region of Chile and their association with other

- honey bee pathogens. *Chilean journal of agricultural research* **74**, 170-177. doi: 10.4067/S0718-58392014000200007.
- Roger, N., Michez, D., Wattiez, R., Sheridan, C. y Vanderplanck, M.** (2017). Diet effects on bumblebee health. *Journal of Insect Physiology* **96**, 128-133. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.11.002.
- Roudel, M., Aufauvre, J., Corbara, B., Delbac, F. y Blot, N.** (2013). New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology* **140**, 1346-1356. doi: 10.1017/S0031182013001133.
- Rubanov, A., Russell, K. A., Rothman, J. A., Nieh, J. C. y McFrederick, Q. S.** (2019). Intensity of *Nosema ceranae* infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure. *Scientific Reports* **9**, 3820. doi: 10.1038/s41598-019-40347-6.
- Rueppell, O., Bachelier, C., Fondrk, M. K., Page, R. E. y Jr.** (2007). Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Experimental gerontology* **42**, 1020-32. doi: 10.1016/j.exger.2007.06.002.
- Russell, S., Barron, A. B. y Harris, D.** (2013). Dynamic modelling of honey bee (*Apis mellifera*) colony growth and failure. *Ecological Modelling* **265**, 158-169. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2013.06.005.
- Ruttner, F.** (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg doi: 10.1007/978-3-642-72649-1.
- Sagastume, S., Del Águila, C., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Henriques-Gil, N.** (2011). Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environmental Microbiology* **13**, 84-95. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02311.x.
- Sagastume, S., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Henriques-Gil, N.** (2014). Ribosomal gene polymorphism in small genomes: Analysis of different 16s rRNA sequences expressed in the honeybee parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Eukaryotic Microbiology* **61**, 42-50. doi: 10.1111/jeu.12084.
- Sagastume, S., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Henriques-Gil, N.** (2016). Genotype diversity in the honey bee parasite *Nosema ceranae*: multi-strain isolates, cryptic sex or both? *BMC Evolutionary Biology* **16**, 216. doi: 10.1186/s12862-016-0797-7.
- Sánchez-Bayo, F. y Wyckhuys, K. A. G.** (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation* **232**, 8-27. doi: 10.1016/J.BIOCON.2019.01.020.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K. y Desneux, N.** (2016). Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environment International* **89-90**, 7-11.
- Sánchez Collado, J. G., Higes, M., Barrio, L. y Martín-Hernández, R.** (2014). Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitology Research* **113**, 1695-1701. doi: 10.1007/s00436-014-3814-z.
- Sarıbiyik, C. y Özkırım, A.** (2018). The Transition Ratio of *Nosema* spp. Spores From Colonies to Honey Versus

- Honey to Colonies. *Journal of Agricultural Science*. doi: 10.5539/jas.v11n1p72.
- Schmid-Hempel, P. y Loosli, R.** (1998). A contribution to the knowledge of Nosema infections in bumble bees, *Bombus* spp. *Apidologie* **29**, 525-535. doi: 10.1051/apido:19980605.
- Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. W. W., Stanley, D. W. y Ju"rgen Tautz, J.** (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology* **54**, 439-444. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.11.002.
- Schmoke, M. D.** (1974). *A study of Aethina tumida: the small hive beetle*. Project Report.
- Schwarz, R. S. y Evans, J. D.** (2013). Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental and Comparative Immunology* **40**, 300-310. doi: 10.1016/j.dci.2013.03.010.
- Schwarz, R. S., Huang, Q. y Evans, J. D.** (2015). Hologenome theory and the honey bee pathosphere. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 1-7. doi: 10.1016/j.cois.2015.04.006.
- Simeunovic, P., Stevanovic, J., Cirkovic, D., Radojicic, S., Lakic, N., Stanisic, L. y Stanimirovic, Z.** (2014). Nosema ceranae and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apicultural Research* **53**, 545-554. doi: 10.3896/IBRA.1.53.5.09.
- Smart, M. D. y Sheppard, W. S.** (2012). Nosema ceranae in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 148-151. doi: 10.1016/j.jip.2011.09.009.
- Smirnov, A. M.** (1978). Research results obtained in USSR concerning aetiology, pathogenesis, epizootiology, diagnosis and control of Varroa disease in bees. En *Apiacta. An international technical magazine of apicultural and economic information* (ed. Apiacta), pp. 13: 149-162. International Federation of Beekeepers' Associations «Apimondia.»
- Smith, M. L.** (2012). The honey bee parasite Nosema ceranae: Transmissible via food exchange? *PLoS ONE* **7**, 1-6. doi: 10.1371/journal.pone.0043319.
- Snow, J. W., Ceylan Koydemir, H., Karınca, D. K., Liang, K., Tseng, D. y Ozcan, A.** (2019). Rapid imaging, detection, and quantification of Nosema ceranae spores in honey bees using mobile phone-based fluorescence microscopy. *Lab on a Chip* **19**, 789-797. doi: 10.1039/c8lc01342j.
- Sokolov, V. P. y Grobov, O. F.** (1963). Nosema spores in the hemolymph of the bee. *Pchelovodstvo* **7**, 39.
- Soroker, V., Hetzroni, A., Yakobson, B., David, D., David, A., Voet, H., Slabezki, Y., Efrat, H., Levski, S., Kamer, Y., Klinberg, E., Zioni, N., Inbar, S. y Chejanovsky, N.** (2011). Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie* **42**, 192-199. doi: 10.1051/apido/2010047.
- Stabentheiner, A., Kovac, H. y Brodschneider, R.** (2010). Honeybee colony thermoregulation - Regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PLoS ONE* **5**,. doi: 10.1371/journal.pone.0008967.

- Starks, P. T., Blackie, C. A. y Seeley, T. D.** (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* **87**, 229-231. doi: 10.1007/s001140050709.
- Steche, W. A.** (1960). Ätiologie und Therapie der Nosematose der Honigbiene. *Zeitschr F Bienenforschung* **5**, 49-92.
- Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Feist, S. W., Chambers, E. y Stone, D. M.** (2013). Plastic parasites: Extreme dimorphism creates a taxonomic conundrum in the phylum Microsporidia. *International Journal for Parasitology* **43**, 339-352. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.11.010.
- Stentiford, G. D., Becnel, J. J., Weiss, L. M., Keeling, P. J., Didier, E. S., Williams, B. A. P., Bjornson, S., Kent, M. L., Freeman, M. A., Brown, M. J. F., Troemel, E. R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K. F. y Solter, L.** (2016). Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends in Parasitology*. doi: 10.1016/j.pt.2015.12.004.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S. R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M. y Aleksic, N.** (2011). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* **42**, 49-58. doi: 10.1051/apido/2010034.
- Suwannapong, G., Yemor, T., Boonpakdee, C. y Benbow, M. E.** (2011). *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* **106**, 236-241. doi: 10.1016/j.jip.2010.10.003.
- Suwannapong, G., Maksong, S., Phainchajoen, M., Benbow, M. E. y Mayack, C.** (2018). Survival and health improvement of *Nosema* infected *Apis florea* (Hymenoptera: Apidae) bees after treatment with propolis extract. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **21**, 437-444. doi: 10.1016/j.aspen.2018.02.006.
- Szumowski, S. C. y Troemel, E. R.** (2015). Microsporidia-host interactions. *Current Opinion in Microbiology* **26**, 10-16. doi: 10.1016/j.mib.2015.03.006.
- Tapasztó, Z., Forgách, P., Kővágyó, C., Békési, L., Bakonyi, T. y Rusvai, M.** (2009). First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Veterinaria Hungarica* **57**, 383-388. doi: 10.1556/AVet.57.2009.3.4.
- Taupin, V., Méténier, G., Vivarès, C. P. y Prensier, G.** (2006a). An improved procedure for Percoll gradient separation of sporogonial stages in *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitology Research* **99**, 708-714. doi: 10.1007/s00436-006-0231-y.
- Taupin, V., Méténier, G., Delbac, F., Vivarès, C. P. y Prensier, G.** (2006b). Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of *Encephalitozoon cuniculi*: an immunocytochemical and in situ hybridization study with ultrathin frozen sections. *Parasitology* **132**, 815-825. doi: 10.1017/S0031182005009777.
- Teixeira, E. W., dos Santos, L. G., Sattler, A., Message, D. M., Alves, M. L. T. M. F., Martins, M. F., Grassi-Sella, M. L. y Francoy, T. M.** (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **114**, 250-254. doi: 10.1016/j.jip.2013.09.002.

- Texier, C., Vidau, C., Viguès, B., El Alaoui, H. y Delbac, F.** (2010). Microsporidia: A model for minimal parasite-host interactions. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 443-449. doi: 10.1016/j.mib.2010.05.005.
- Tokarev, Y. S., Zinatullina, Z. Y., Ignatieva, A. N., Zhigileva, O. N., Malysh, J. M. y Sokolova, Y. Y.** (2018). Detection of two Microsporidia pathogens of the European honey bee *Apis mellifera* (Insecta: Apidae) in Western Siberia. *Acta Parasitologica*. doi: 10.1515/ap-2018-0086.
- Traver, B. E. y Fell, R. D.** (2011a). *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **107**, 234-236. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.016.
- Traver, B. E. y Fell, R. D.** (2011b). Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology* **107**, 43-49. doi: 10.1016/j.jip.2011.02.003.
- Traver, B. E. y Fell, R. D.** (2012). Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology* **110**, 408-410. doi: 10.1016/j.jip.2012.04.001.
- Traver, B. E. y Fell, R. D.** (2015). A scientific note: Survey for *Nosema* spp. in preserved *Apis* spp. *Apidologie* **46**, 194-196. doi: 10.1007/s13592-014-0306-1.
- Traynor, K. y Traynor, M.** (2008). Bee breeding around the world. *American Bee Journal* **148**, 135-139.
- Tritschler, M., Vollmann, J. J., Yañez, O., Chejanovsky, N., Crailsheim, K. y Neumann, P.** (2017a). Protein nutrition governs within-host race of honey bee pathogens. *Scientific Reports* **7**, 1-11. doi: 10.1038/s41598-017-15358-w.
- Tritschler, M., Retschnig, G., Yañez, O., Williams, G. R. y Neumann, P.** (2017b). Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*. *Ecology and Evolution* **7**, 1850-1857. doi: 10.1002/ece3.2796.
- Tsaousis, A. D., Kunji, E. R. S., Goldberg, A. V., Lucocq, J. M., Hirt, R. P. y Embley, T. M.** (2008). A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **453**, 553-556. doi: 10.1038/nature06903.
- Underwood, R. M. y Currie, R. W.** (2009). Indoor winter fumigation with formic acid for control of *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) and nosema disease, *Nosema* sp. *Journal of economic entomology* **102**, 1729-36.
- Urbietta-Magro, A., Higes, M., Meana, A., Gómez-Moracho, T., Rodríguez-García, C., Barrios, L. y Martín-Hernández, R.** (2019). The levels of natural *Nosema* spp. infection in *Apis mellifera iberiensis* brood stages. *International Journal for Parasitology* **49**, 657-667. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.04.002.
- Valera, F., Martín-Hernández, R. y Higes, M.** (2011). Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environmental Microbiology Reports* **3**, 47-53. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00186.x.
- Valera, F., Gómez-Moracho, T., Yuan, H. W., Muñoz, I., De la Rúa, P., Martín-Hernández, R., Chen, Y. L. y Higes, M.** (2017). Any role for the dissemination of *Nosema* spores by the blue-tailed bee-eater *Merops*

- philippinus? *Journal of Apicultural Research* **56**, 262-269. doi: 10.1080/00218839.2017.1306375.
- van den Eijnde, J. y Vette, N.** (1993). Nosema infection in honey bees (*Apis mellifera* L.) and bumble bees (*Bombus terrestris* L.). *Proc. Sect. Exp. Appl. Entomol* **4**, 205-208.
- van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Curtis, J. M., Ibrahim, A. y Pernal, S. F.** (2014). Fumagillin: An Overview of Recent Scientific Advances and Their Significance for Apiculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 2728-2737. doi: 10.1021/jf4055374.
- van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Crailsheim, K., Dahle, B., Gajda, A., Gray, A., Drazic, M. M., Higes, M., Kauko, L., Kence, A., Kence, M., Kezic, N., Kiprijanovska, H., Kralj, J., Kristiansen, P., Hernandez, R. M., Mutinelli, F., Nguyen, B. K., Otten, C., Özkırım, A., Pernal, S. F., Peterson, M., Ramsay, G., Santrac, V., Soroker, V., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnæs, F., Wei, S. y Wilkins, S.** (2012). Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *Journal of Apicultural Research* **51**, 100-114. doi: 10.3896/IBRA.1.51.1.12.
- Van der Zee, R., Gómez-Moracho, T., Pisa, L., Sagastume, S., García-Palencia, P., Maside, X., Bartolomé, C., Martín-Hernández, R. y Higes, M.** (2014). Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberiensis*). *Environmental Microbiology Reports* **6**, 401-413. doi: 10.1111/1758-2229.12133.
- Vanbergen, A. J. y Insect Pollinators Initiative** (2013). Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment* **11**, 251-259. doi: 10.1890/120126.
- vanEngelsdorp, D. y Meixner, M. D.** (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S80-S95. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.011.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J. L., Texier, C., Biron, D. G., Blot, N., Alaoui, H., Belzunces, L. P. y Delbac, F.** (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **6**,. doi: 10.1371/journal.pone.0021550.
- Vidau, C., Panek, J., Texier, C., Biron, D. G., Belzunces, L. P., Le Gall, M., Broussard, C., Delbac, F. y El Alaoui, H.** (2014). Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology* **121**, 89-96. doi: 10.1016/j.jip.2014.07.002.
- Wang, D.-I. y Moeller, F. E.** (1971). Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **17**, 308-320. doi: 10.1016/0022-2011(71)90002-4.
- Webster, T.** (1993). *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.* **133**, 869–870.
- Webster, T. C., Thacker, E. M., Pomper, K., Lowe, J. y Hunt, G.** (2008). *Nosema apis* infection in honey bee

- (*Apis mellifera*) queens. *Journal of Apicultural Research* **47**, 53-57. doi: 10.1080/00218839.2008.11101423.
- Weidner, E. y Byrd, W.** (1982). The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *The Journal of cell biology* **93**, 970-5. doi: 10.1083/JCB.93.3.970.
- Weidner, E., Findley, A. M., Dolgikh, V. y Sokolova, J.** (1999). Microsporidian Biochemistry and Physiology. En *The Microsporidia and Microsporidiosis* (ed. Wittne, M. y Weiss, L. M.), pp. 172-195. ASM Press, Washington doi: 10.1128/9781555818227.ch5.
- Weiss, L. M.** (2001). Microsporidia: Emerging pathogenic protists. *Acta Tropica* **78**, 89-102. doi: 10.1016/S0001-706X(00)00178-9.
- Whitaker, J., Szalanski, A. L. y Kence, M.** (2011). Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. *Apidologie* **42**, 174-180. doi: 10.1051/apido/2010045.
- Williams, B. A. P.** (2009). Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular Microbiology* **11**, 1551-1560. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01362.x.
- Williams, G. R., Shafer, A. B. A., Rogers, R. E. L., Shutler, D. y Stewart, D. T.** (2008a). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 189-192. doi: 10.1016/j.jip.2007.08.005.
- Williams, G. R., Sampson, M. A., Shutler, D. y Rogers, R. E. L.** (2008b). Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology* **99**, 342-344. doi: 10.1016/j.jip.2008.04.005.
- Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D. P., Medrzycki, P., Murray, T. E., Natsopoulou, M. E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R. J., Pernal, S. F., Shutler, D., Tanner, G., Van Der Steen, J. J. M., Brodschneider, R., McMahon, R. ;, Medrzycki, P. ;, Murray, P. ;, Natsopoulou, E. ;, Neumann, M. E. ;, Oliver, P. ;, Paxton, R. ;, Pernal, R. J. ;, Shutler, S. F. ;, Tanner, D. ;, Van Der Steen, G. ; y Brodschneider, M. ;** (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research* **52**,. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.04.
- Williams, G. R., Shutler, D., Burgher-MacLellan, K. L. y Rogers, R. E. L.** (2014). Intra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS ONE* **9**, 5-10. doi: 10.1371/journal.pone.0099465.
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T. y Starks, P. T.** (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **54**, 1392-1399. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.07.016.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N. H. y Starks, P. T.** (2009). Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annual Review of Entomology* **54**, 405-423. doi: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093301.
- Wilson, J. R. U., Dormontt, E. E., Prentis, P. J., Lowe, A. J. y Richardson, D. M.** (2009). Something in the

- way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 136-144. doi: 10.1016/j.tree.2008.10.007.
- Wittner, M. y Weiss, L. M.** (1999). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ed. Wittner y Weiss Bronx, New York doi: 10.1128/9781555818227.
- Wolf, S., McMahon, D. P., Lim, K. S., Pull, C. D., Clark, S. J., Paxton, R. J. y Osborne, J. L.** (2014). So near and yet so far: Harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees. *PLoS ONE* **9**,. doi: 10.1371/journal.pone.0103989.
- Wolf, S., Nicholls, E., Reynolds, A. M., Wells, P., Lim, K. S., Paxton, R. J. y Osborne, J. L.** (2016). Optimal search patterns in honeybee orientation flights are robust against emerging infectious diseases. *Scientific Reports* **6**, 1-10. doi: 10.1038/srep32612.
- Woolhouse, M. E. J., Haydon, D. T. y Antia, R.** (2005). Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 238-244. doi: 10.1016/j.tree.2005.02.009.
- Woyciechowski, M. y Czekońska, K.** (1999). The effect of temperature on *Nosema apis* Zander (Microsporida, Nosematidae) infection in honey bees (*Apis mellifera*). *Parasite* **6**, 185-187. doi: 10.1051/parasite/1999062185.
- Woyciechowski, M. y Moroń, D.** (2009). Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*. doi: 10.1007/s00040-009-0012-6.
- Wright, S. I., Bi, I. V., Schroeder, S. G., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D. y Gaut, B. S.** (2005). The Effects of Artificial Selection on the Maize Genome. *Science* **308**, 1310-1314. doi: 10.1126/science.1107891.
- Wu, J. Y., Smart, M. D., Anelli, C. M. y Sheppard, W. S.** (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 326-329.
- Xu, Y. y Weiss, L. M.** (2005). The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *International Journal for Parasitology* **35**, 941-953. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.04.003.
- Yoshiyama, M. y Kimura, K.** (2011). Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* **106**, 263-267. doi: 10.1016/j.jip.2010.10.010.
- Zander, E.** (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. En *Leipziger Bienenztg*, p. (10) 147-150, (11) 164-166. Vortrag in Weissenfels am 9.8.1909.
- Zayed, A.** (2009). Bee genetics and conservation. *Apidologie* **40**, 237-262. doi: 10.1051/apido/2009026.
- Zheng, H., Lin, Z., Huang, S., Sohr, A., Wu, L. y Chen, Y. A. N. P.** (2014). Spore Loads May Not be Used Alone as a Direct Indicator of the Severity of *Nosema ceranae* Infection in Honey Bees *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae). *Journal of Economic Entomology* **107**, 2037-2044.

APÉNDICES

Publicaciones (p. 213)

Afiliación de coautores (p. 257)

Agradecimientos (p. 259)

Factores determinantes de la nosemosis en *Apis mellifera iberiensis*

Determinants of nosemosis in *Apis mellifera iberiensis*



The levels of natural *Nosema* spp. infection in *Apis mellifera iberiensis* brood stages

Almudena Urbietta-Magro^a, Mariano Higes^a, Aránzazu Meana^b, Tamara Gómez-Moracho^{a,1}, Cristina Rodríguez-García^a, Laura Barrios^c, Raquel Martín-Hernández^{a,d,*}

^a Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo, Guadalajara, Spain

^b Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^c Statistics Department, Computing Center SGAI-CSIC, Madrid, Spain

^d Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT-FEDER), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Castilla – La Mancha, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2019

Received in revised form 8 April 2019

Accepted 10 April 2019

Available online 3 June 2019

Keywords:

Apis mellifera
Nosema ceranae
Nosema apis
Microsporidia
Epidemiology
Brood infection

ABSTRACT

Nosema ceranae is the most prevalent endoparasite of *Apis mellifera iberiensis* and it is a major health problem for bees worldwide. The infective capacity of *N. ceranae* has been demonstrated experimentally in honey bee brood, however no data are available about its prevalence in brood under natural conditions. Thus, brood combs from 10 different hives were analyzed over two consecutive years, taking samples before and after winter. A total of 1433 larvae/pupae were analyzed individually and *N. ceranae* (3.53%) was the microsporidian most frequently detected, as opposed to *Nosema apis* (0.42%) which was more frequently detected in conjunction with *N. ceranae* (0.71%). The active multiplication of both microsporidians was confirmed by the expression (real-time-PCR) of the *N. ceranae* polar tube protein 3 gene and/or the *N. apis* RNA polymerase II gene in 24% of the brood samples positive for *Nosema* spp. Both genes are related to microsporidian multiplication. As such, *N. ceranae* multiplication was confirmed in 1.06% of the samples, while *N. apis* multiplication was only observed in co-infections with *N. ceranae* (0.07%). Brood cells were analyzed for the presence of *Nosema* spp., as those are the immediate environment where the brood stages develop. The brood samples infected by *Nosema* spp. were in brood cells in which that microsporidians were not detected, while brood cells positive for *N. ceranae* hosted brood stages that were not apparently infected, indicating that this is unlikely to be the main pathway of infection. Finally, the colonies with brood infected by *N. ceranae* showed higher levels (numbers) of infected adult bees, although the differences were not significant before ($P = 0.260$), during ($P = 0.055$) or after ($P = 0.056$) brood sampling. These results show that *N. ceranae* is a bee parasite ubiquitous to all members of the colony, irrespective of the age of the bee. It is also of veterinary interest and should be considered when studying the epidemiology of the disease.

© 2019 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microsporidians are a truly diverse lineage of extremely reduced parasites that are related to the Order Rozellida (Rozellomycota = Rozellomycota = Cryptomycota) or that diverged at the branch below the fungi, within the Holomycota clade of

Opisthokonta (James et al., 2013; Bass et al., 2018; Galindo et al., 2018). These organisms are obligate intracellular parasites that infect a wide range of vertebrates and invertebrates (Didier et al., 2004). They are frequently found in domestically managed aquatic and terrestrial hosts, many of which are vulnerable to epizootics and all of which are crucial for the stability of the animal–human food chain (Stentiford et al., 2016). In economically relevant insects such as the silkworm (*Bombyx mori*) and honey bee (*Apis mellifera*), microsporidians can cause serious diseases and, as a result, important financial losses.

Some insects play a vital role as pollinators, regulating natural ecosystems. Globally, nearly 90% of wild flowering plant species to some extent depend on the transfer of pollen by animals, especially bees (IPBES, 2016, https://www.ipbes.net/system/tdf/spm_

* Corresponding author at: Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Laboratorio de Patología Apícola, Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo, Guadalajara, Spain.

E-mail address: rmhernandez@jccm.es (R. Martín-Hernández).

¹ Present address: Research Center on Animal Cognition (CRCA), Center for Integrative Biology (CBI), CNRS, University Paul Sabatier, 31062 Toulouse, France.

deliverable_3a_pollination_20170222.pdf?file=1&type=node&id=15248; European Commission, 2017, <http://ec.europa.eu/environment/nature/pdf/roadmap-for-the-eu-pollinators-initiative.pdf>).

To date, three microsporidian species have been described in *A. mellifera* honey bees: *Nosema apis* (Zander, 1909), *Nosema ceranae* (Fries et al., 1996), and *Nosema neumannii* (Chemurot et al., 2017). Due to its more recent identification, there is currently little information available about the effects of *N. neumannii* infection, while the other two *Nosema* spp. (*N. apis* and *N. ceranae*) have different clinical consequences in honey bee colonies. *Nosema apis* was first described over a century ago (Zander, 1909) and the consequences of its infection in honey bee colonies were first described many decades ago. Dysentery and bees crawling around the hive are among the most recognizable clinical signs of *N. apis* infection and, indeed, this disease is thought to cause significant economic losses to beekeepers around the world. By contrast, *N. ceranae* was first described in 1996 as a parasite of the eastern bee *Apis cerana* (Fries et al., 1996), although by the beginning of this century it was considered to be an epidemic for its new host, *A. mellifera* (Higes et al., 2006; Martín-Hernández et al., 2007; Paxton et al., 2007). The disease provoked by *N. ceranae* has clinical signs distinct from those caused by *N. apis*, and *N. ceranae* infection can be particularly unsettling for beekeepers because the infected colonies do not generally show outward manifestations of infection until their health is severely compromised (Higes et al., 2008a; Botías et al., 2012a). Because the diseases caused by both microsporidians are well differentiated, that produced by *N. apis* is now referred to as Nosemosis type A and that caused by *N. ceranae* as Nosemosis type C (Higes et al., 2010). Indeed, Nosemosis Type C has been associated with altered polyethism and a gradual loss of workers bees, ultimately exhausting the colony and causing its death (Higes et al., 2008a; Hatjina et al., 2011; Khoury et al., 2011, 2013; Botías et al., 2012a,b; Ravoet et al., 2013; Lodesani et al., 2014; Bekele et al., 2015; Lecocq et al., 2016).

Both *Nosema* spp. have now been reported across the five continents where apiculture practices involve the use of sub-species and variants of *A. mellifera*: Africa (Fries et al., 2003; Higes et al., 2009a); Asia (Huang et al., 2008; Chen et al., 2009); North America (Chen et al., 2008; Williams et al., 2008) and South America (Calderón et al., 2008; Invernizzi et al., 2009); Europe (Higes et al., 2006; Paxton et al., 2007); and Oceania (Giersch et al., 2009). In fact, globalization has provided parasites/pathogens opportunities to cross geographic boundaries and expand to new hosts in apiculture (Chen et al., 2009; Chen and Huang, 2010; Li et al., 2012; Vanbergen et al., 2013). Despite its more recent identification, *N. ceranae* is now not only more widespread but it is even more predominant in many regions (Klee et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2007; Giersch et al., 2009; Invernizzi et al., 2009; Fries, 2010; Copley et al., 2012; Porrini et al., 2016; Gisder et al., 2017; Khezri et al., 2018; Tokarev et al., 2018). In fact, the prevalence of *N. ceranae* is not only on an upward trend (Cox-Foster et al., 2007; Botías et al., 2012b; Cepero et al., 2016; Gisder et al., 2017) but since its prevalence could be favored at higher temperatures (Martín-Hernández et al., 2009; Paxton, 2010; Sánchez Collado et al., 2014; Özgör et al., 2015; Gisder et al., 2017), it represents an important challenge in the face of global warming.

Nosema infection occurs after the ingestion of mature spores in food or water, and it is mainly transmitted by trophalaxis (food sharing; Smith, 2012) or the fecal-oral route (fecal waste cleaning) via an infected nest mate (Webster, 1993; Higes et al., 2009b). The target tissue for both *N. apis* and *N. ceranae* is the bees' ventriculum (Higes et al., 2007; Huang and Solter, 2013), infecting the epithelial cells in which these microsporidian species produce their proliferative stages.

All *A. mellifera* castes (workers, queen and drones) are susceptible to *Nosema* spp. infection (Higes et al., 2007; Webster et al., 2008; Higes et al., 2009a,b; Traver and Fell, 2011, 2012; Martín-Hernández et al., 2012). Although Nosemosis has traditionally been considered an adult disease, drone and queen pupae were seen to be weakly infected by *N. ceranae* in naturally infected colonies (Traver and Fell, 2011, 2012), and both *N. apis* and *N. ceranae* were detected in spring workers and queen larvae and/or pupae in Chile (Rodríguez et al., 2012). A later study confirmed that pre-pupae of *A. mellifera* workers could be successfully infected under laboratory conditions (Eiri et al., 2015), producing a range of pathological problems in the adults that emerged from them after metamorphosis, shortening their life, delaying normal age polyethism and disrupting the balance of the colony (Eiri et al., 2015; Benvau and Nieh, 2017). Immature stages of other hymenopterans have previously been reported to be susceptible to experimental infection by microsporidians, eg *Bombus terrestris* to *Nosema bombi* (van den Eijnde and Vette, 1993; Schmid-Hempel and Loosli, 1998). Similarly, larvae of *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Crambidae) were successfully infected with fresh *N. ceranae* spores isolated from *A. mellifera* (Malysh et al., 2018), and *N. apis* and *N. ceranae* DNA was also recently isolated from the larvae of the honey bee pest *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) collected from honey bee hives in Turkey (Ozgor et al., 2017).

Due to the high prevalence of *N. ceranae* in Spain (Botías et al., 2012b; Cepero et al., 2014, 2016), the aim of this study was to determine if brood infection occurs naturally in *Nosema* spp. infected colonies, assessing two well-defined beekeeping moments: before and after winter cluster formation. Additionally, correlations with the levels of infection at different developmental bee stages were studied, as was the presence of the microsporidians in the brood cells, to evaluate this as a possible route of bee brood exposure.

2. Materials and methods

2.1. Colonies

Ten *Apis mellifera iberiensis* colonies located at an experimental apiary of the Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CIAPA) Research Center (Marchamalo, Spain) were used for this study. Two consecutive studies were carried out between 2015 and 2017, using five colonies in each assay. The colonies H1 to H5 were included in the first study (Assay 1: 2015–2016) and H6 to H10 in the second one (Assay 2: 2016–2017). All of them were positive for *N. ceranae* infection from previous DNA analyses.

2.2. Bee brood (BB) sampling

The sampling times are indicated in Table 1. In order to analyze bee brood (BB) samples before and after winter bee cluster formation, one comb with a BB was collected from each colony in October 2015 and February 2016 (Assay 1; colonies H1–H5), or in November 2016 and March 2017 (Assay 2; colonies H6–H10). Despite using different sampling months in the two assays, the samples were collected at the same beekeeping moment ie prior to the wintering cluster formation (pre-clustering; October/November) and after winter cluster formation (post-clustering; February/March). Brood combs were collected at the experimental apiary and immediately transported to the laboratory, where they were frozen at -80°C until analysis.

The total number of brood samples (including recently capped larvae, pupae and pre-emerging adult bees) is shown in Table 2.

Table 1

Study sampling design: months in which bee broods, adult bees and brood-cells were collected between September 2015 and July 2017.

	Assay 1							Assay 2					
	Pre-clustering			Post-clustering				Pre-clustering			Post-clustering		
	Sep 15	Oct 15	Nov 15	Jan 16	Feb 16	Mar 16	Apr 16	Oct 16	Nov 16	Dec 16	Mar 17	May 17	Jul 17
Bee brood (BB)		x			x				x			x	
Interior bees (IB)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Forager bees (FB)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Cells									x			x	
Hive identification	H1–H5							H6–H10					

At each sampling time, 90 capped BBs were analyzed from each colony when possible; post-clustering in Assay 1, three colonies (H1, H3 and H4) had died and thus brood samples were only taken from the remaining colonies. Similarly, the H7 colony was very weak in November 2016 (Assay 2), with no consistent brood, so no brood comb was taken from it.

To collect brood samples, frozen brood combs were thawed sufficiently to be able to carefully cut them and individually extract the different developmental bee stages (larvae and pupae) from their cells. Brood samples were selected randomly from the BB area, trying to include most of the developmental phases present in the combs. Each sample was aseptically removed from the cell one by one, with the aid of a sterile wooden stick and sterile tweezers to first completely open the operculum and break the cell wall. The samples were then extracted, avoiding any external contamination with *Nosema* spp. spores outside their own cells. Samples were discarded when larvae or pupae came into contact with the external surface of the cell or when there was any contact with an adjacent brood. To remove any spores on the brood surface, the brood sample was washed after it was taken out of the cell with MilliQ® H₂O (MilliQ® system, Merck, Darmstadt, Germany) using a sterile disposable Pasteur pipette.

The brood samples were then visually classified into seven groups according to their developmental post-capping time (pct) stage (Human et al., 2013): L (capped stretched larva; 2–3 days pct); P1 (white eye pupa stage; 4 days pct); P2 (pink eye stage; 5–6 days pct); P3 (dark pink-purple eye pupa stage; 7–8 days pct); P4 (dark purple eye pupa stage; 9 days pct); P5 (black eye pupa; 10–11 days pct) and P6 (resting adult pre-emergence stage; 12 days pct).

2.3. Brood cell sampling

The cells were examined during the second assay to evaluate the presence of *Nosema* spp. DNA in the area where the brood develops (Table 1). Having carefully removed the brood samples (Section 2.2), approximately 20 cells per brood comb were sampled by dripping 100 µl of doubled-distilled water (dd-H₂O; PCR quality) slowly onto the cell walls and subsequently recovering it from the bottom of the cell with a disposable sterile Pasteur pipette. A total of 164 cells were analyzed: 77 cells from four

colonies pre-clustering and 87 cells from all five colonies post-clustering (Table 2).

2.4. Adult bee sampling

Details of both interior bee (IB) and forager bee (FB) sampling collection can be seen in Table 1. In Assay 1, 25 IBs plus 25 FBs were sampled per honey bee colony at each of seven time points between September 2015 and April 2016. During Assay 2, in order to increase the detection limit of *Nosema* spp., the sample size was increased and 100 IBs plus 100 FBs were collected at each of six time points between September 2016 and July 2017, except in November 2016 when only 25 IBs were collected. The total number of worker bees sampled is shown in Table 2. The IBs were sampled from the brood chamber, brushing away the bees from the first combs with no brood, while the FBs were collected at the hive entrance at midday, blocked as described previously (Meana et al., 2010). During bee clustering in the coldest months of autumn and winter, no FBs were sampled since no foraging activity was observed (H1 November 2015 and January 2016; H4: November 2015; H6–H10: November and December 2016).

2.5. Sample processing and nucleic acid extraction

2.5.1. Brood samples

Each immature stage was placed individually into a well of a 96-well collection plate (Deltalab, Barcelona, Spain, No. 409004) over an ice surface. Every well contained 180 µl of 60% AL lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany No. 1014600), 1 µg/ml of RNA carrier (Qiagen, 148037710) and four 2 mm glass beads (Sigma®), as described previously (Cepero et al., 2014). One well in every 20 brood samples was left empty as a negative control (with milliQ® H₂O and the reagents only). The plates were sealed and shaken at 30 Hz for 6 min (TyssueLyser II, Qiagen®), and 180 µl of the resulting macerate were transferred to a new multi-well plate (Eppendorf® AG, Hamburg, Germany, No. 0030128.575), mixed with 200 µl of 60% AL buffer and 20 µl of protease (supplied with the BioSprint® 96 DNA Blood Kit, Qiagen®), and incubated for 10 min at 70 °C and 300 rpm. Total nucleic acid extraction was performed using the BioSprint® 96 DNA Blood Kit (Qiagen®, No. 940057) and the BS96 DNATissue® protocol (Qiagen®), in a

Table 2

Number of samples analyzed in this study.

Year	Hive ID	Season	Bee brood	Cells	Interior bees	Foragers	Total adult
2015–2016	H1–H5	Pre-clustering	447	–	350	300	650
		Post-clustering	179	–	225	175	400
2016–2017	H6–H10	Pre-clustering	360	77	1125	500	1625
		Post-clustering	447	87	1625	1400	3025
Total	H1–H10		1433	164	3325	2375	5700

Biosprint® 96 workstation (Martín-Hernández et al., 2012), with a final elution volume of 100 µl. Immediately after extraction, 25 µl of the 100 µl of the eluted nucleic acid sample was treated with RNase-free DNase I (Qiagen®, No. 79254) and used to generate first strand cDNAs using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, California, No. 1708891), according to the manufacturer's instructions. The cDNA was generated by maintaining the reaction mix at 25 °C for 5 min, 46 °C for 20 min and finally, 95 °C for 1 min (Mastercycler® ep gradient S; Eppendorf), storing the generated cDNA at –20 °C until use. Negative controls were run in parallel for each step (DNA and RNA extraction, and reverse transcription controls).

2.5.2. Brood cell samples

The double distilled (dd)-H₂O (100 µl) recovered from the bottom of the cells (Section 2.3) was placed individually into a well of a Deepwell-96 plate with 100 µl of 50% AL buffer and 1 µg/ml of RNA carrier (Cepero et al., 2014). The plates were then processed in the same way as those with the BB samples (Section 2.5.1) and again, one well with no sample was included with every 20 samples as a negative control.

2.5.3. Adult bee samples

Similarly, the abdomen of each adult bee (IB and FB) was placed individually into a well of a Deepwell-96 plate on ice, which contained 180 µl of 50% AL buffer and 1 µg/ml of RNA carrier (Cepero et al., 2014). The plates were then stored at –80 °C until further processing and again, one in every 20 wells was left with no sample and processed in parallel as a negative control. After maceration, the DNA was extracted from the adult samples collected in Assay 1 as indicated in Section 2.5.1. However, DNA was extracted from the adult bees from Assay 2 using a different method, transferring 50 µl of the bee macerate to a new multi-well plate with 50 µl of a Tris–HCl solution (10 mM Tris–HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) and 15 µl of Proteinase K (Qiagen®, No. 1019499), and incubating for 20 min at 95 °C. This method has a similar limit of detection for *Nosema* spp. as that used for the samples from Assay 1 but it is quicker and cheaper (Rodríguez-García, C., Higes, M., De La Rúa, P., Martín-Hernández, R., 2014. Comparative analysis of different methods for gDNA extraction and detection of *Nosema ceranae*, *Nosema apis* and *Nosema bombi*. In: Pilar de la Rúa (Ed.), Proceedings of the Sixth European Conference of Apidologie, Universidad de Murcia, Spain pp. 211–212. <http://www.eurbee.org/Files/book%20of%20abstracts%20Eurbee6.pdf>). Negative controls were run in parallel for each step of the two assays.

2.6. Molecular detection of *Nosema* spp. (PCR): BB, adult bees and brood cell samples

The presence of *N. apis* and *N. ceranae* spp. was assessed in all the samples using a triplex conventional PCR as described previously (Martín-Hernández et al., 2012), including the detection of *A. mellifera* DNA as an internal control (IPC) for the PCRs. All the PCRs were carried out in a volume of 25 µl containing the HotSplit DNA polymerase (1 U/µl: Biotools®, Madrid, Spain, cod. 10.531–10.533), 0.4 µM of each primer, 0.2 mg/ml of BSA, 0.1% Triton X-100 and 2.5 µL of DNA template in customized gelified plates (Biotools®). These reaction conditions had the same sensitivity as that described previously (Martín-Hernández et al., 2012): 2.5 spores of *N. ceranae* and/or 25 spores of *N. apis* in 150 µl of bee macerate. All reactions were carried out in a Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf) and analyzed in a QIAxcel Advanced System (Qiagen®) using a QIAxcel DNA Screening Kit (Qiagen®, No. 929004). The AM420 method was applied (sample uptake 10 s at 5 KV, separation 420 s at 5 KV), with QX Alignment Markers

15 bp/1 kb (Qiagen®, No. 929521) and QX Size Markers 50–800 pb at 20 ng/µl (Qiagen®, No. 929556). The electropherograms were analyzed with BioCalculator 3.0 (Qiagen®), and all samples that generated a fragment of the expected length and yielded ≥0.1 relative fluorescent units (RFU) were considered to be positive. Positive controls and no template controls were analyzed in parallel to detect possible contamination or amplification failures.

2.7. Multiplication of *Nosema* spp. in a BB (real-timePCR (RT-PCR))

The brood samples that proved positive for *Nosema* spp. by conventional triplex-PCR were analyzed by real-time-PCR (RT-PCR) to determine whether the detection did indeed correspond to an active infection (*Nosema* spp. multiplication) or if it was merely due to the presence of inactive spores or contamination. The cDNA from *Nosema* spp. positive brood samples was analyzed to detect the expression of genes from these microsporidians. The single-copy gene selected for *N. ceranae* encodes the polar tubule protein 3 (*PTP3*) and for *N. apis*, the largest subunit of RNA polymerase II (*RPB1*). Both genes were selected since they have been related to sporogonial phases (Brosson et al., 2006) or transcription (Katinka et al., 2001) and protein maturation processes (Belkorchia et al., 2017), and are therefore related to microsporidian multiplication.

To select the conserved areas for primer design, the sequences available in the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) were aligned using BioEdit® Sequence Alignment Editor software (Hall, 1999), and the primers and probes for *N. ceranae*-*PTP3* and *N. apis*-*RPB1* were designed using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center (https://lifescience.roche.com/en_es/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center). The specificity of primers was initially in silico verified by the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). MIQE (minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) guidelines were followed for the RT-PCR design (Bustin et al., 2009). The honey bee *β-actin* gene was also assayed in each sample as an internal control of mRNA preservation and cDNA synthesis, using the primers and probes described previously (Martín-Hernández et al., 2017). Controls with no template control (NTC) or with no reverse transcription (RTC) were run in parallel. The sequences of the primers and probes used in this study and the amplicon sizes are shown in Table 3.

All RT-PCRs were performed on a Roche LightCycler® 480 thermocycler using 20 µl reaction mixes with the LightCycler® 480 Probes Master Mix (Roche), according to the manufacturer's instructions: primers at 500 nM and universal probes at 10 nM (UPL, Roche®). The PCR program consisted of an initial step of 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1 s each, and a final cooling step at 40 °C for 30 s. Each amplification cycle was analyzed with the LightCycler® 480 software v1.5.1 (Roche Diagnostics) and the crossing point (Cp) was determined by the second derivative maximum of each curve, and it was recorded for all samples. Any Cp value over the threshold level was interpreted as multiplication of either *N. ceranae* or *N. apis*, while nil Cp values were considered to indicate uninfected BBs and the absence of microsporidian replication. Negative and positive controls were also included.

2.8. Validation of *Nosema* spp. multiplication

To test the reliability of the technique detecting the *Nosema* spp. multiplication (active infection; see Section 2.7), environmental spores of *N. ceranae* ($n = 6$) and *N. apis* ($n = 5$) were analysed. The *N. ceranae* spores came from naturally infected experimental colonies and *N. apis* spores came from the stocks kept at 4 °C in the CIAPA. Spores were purified by 95% isotonic-Percoll® and the

Table 3

Real Time PCR primers and probes used in this study to detect active multiplication of *Nosema* spp. in naturally infected bee brood samples: *PTP3*, the polar tubule protein 3 gene of *Nosema ceranae*; *RPB1*, the largest subunit of the RNA polymerase II gene of *Nosema apis*.

Target organism	Primer	Sequence (5'–3')	Reference	Amplicon length	GenBank reference
<i>N. ceranae</i>	PTP3	F: TGCTGATGTTATGGCTACAGAAG R: TACAGATTGCCGTGCTTTAA P: GCCAGGAA (UPL #72)	This study	90 bp	XM_002996713.1. <i>Nosema ceranae</i> BRL01 hypothetical protein (NCER_100083) mRNA, complete coding sequence
<i>N. apis</i>	RPB1	F: CCCGAATGGTTAATTTTACTG R: TCCCTCCATAACAATAGAAGGTCT P: CTCCTCCT (UPL #73)	This study	71 bp	DQ996230.1. <i>Nosema apis</i> RNA polymerase II largest subunit (RPB1) gene, partial coding sequence
<i>Apis mellifera</i>	β -Actin	F: GTATGCCAACACTGTCCTTCTG R: AAGAATTGACCCACCAATCCA P: CCTAGCACCATCCACCATGAAAATTAAGATCATC	Martín-Hernández et al., 2017		

species confirmed by PCR (Martín-Hernández et al., 2012). Spores were pelleted by centrifugation and they were processed for DNA extraction, DNase treatment and cDNA generation as described in Section 2.5.1. Controls for the extraction step were processed in parallel. In this case, all the samples were also processed with no reverse transcriptase enzyme (RTC) to later verify the DNase treatment had worked efficiently and no genomic DNA was present. All samples were analysed in duplicate and RT-PCRs were performed as described in Section 2.7. Additionally, the specificity of newly designed primers was tested in vitro by cross-analysis of *N. apis* DNA with NC-PTP3 primers and *N. ceranae* DNA with NA-RPB1 primers.

2.9. Parasitization levels and statistical analysis

The prevalence of BBs and adult bees (IBs and FBs) infected by *Nosema* spp. were analyzed for each assay (Assay 1 and 2) and sampling point (season: pre-clustering and post-clustering). The average infection in adult bees was calculated by determining the mean of the IBs and FBs in each colony. The distribution of the prevalence of BB microsporidians at each point analyzed (four levels: year and season) was compared, employing non-parametric tests (Kruskal–Wallis test), since the basal assumptions of parametric tests (normality and constant variance) were not satisfied.

The colonies were divided in two groups according to whether the colony had been detected with BBs positive or negative to *N. ceranae* infection. The level of infection in adult bees was compared between both groups using the Mann–Whitney test. $P < 0.05$ was considered significant and all statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics software V24.

3. Results

3.1. Prevalence of *Nosema* spp. in brood

Nosema ceranae was found more frequently than *N. apis* in brood of *A. mellifera iberiensis*.

3.1.1. Detection by conventional PCR

Brood samples from all stages of development were analyzed in this study ($n = 1,433$, Table 4), from recently sealed larvae (L; 2–3 days pct) up to pre-emergent adults (P6; 12 days pct). All NTC controls analyzed by conventional PCR were negative. The distribution of the samples for each developmental phase differed due to the random selection of the brood. Of the 1433 brood samples analyzed, amplification of the IPC indicated good DNA extraction and conservation in 1418 and thus, only these samples were analyzed further. Of these 1418 samples, *Nosema* spp. were detected

in 66 by triplex-PCR (see Tables 4 and 5), most frequently *N. ceranae*. This species was found in all immature stages ($n = 50$, Table 4), and pre- and post-clustering, with the highest prevalence at the L stage (6.41%). *Nosema apis* was detected alone in L and P2 stages ($n = 6$), although at levels below 1%, whereas *N. ceranae* and *N. apis* were detected together in L, P1 and P6 stages ($n = 10$), with the highest prevalence at P6 (1.72%).

The annual prevalence was assessed according to clustering (pre- or post-clustering, Table 5) and the relative detection of *N. ceranae* pre-clustering was very low in both assays. No immature stages were positive for *Nosema* spp. post-clustering in Assay 1 and only two colonies were still alive. However, the highest prevalence for *N. ceranae* was detected post-clustering in Assay 2, with a positive result in 10.45% of the BBs. This sampling point was also the only point when *N. apis* was detected, either alone (1.36%) or together with *N. ceranae* (1.82%).

3.1.2. *Nosema* spp. multiplication (RT-PCR)

Table 4 shows the number of positives and the prevalence of *Nosema* infection according to the larvae/pupae age. All brood samples analyzed by RT-PCR showed a correct amplification of the honey bee β -actin gene, showing the integrity of mRNA. The expression of the *N. ceranae*-PTP3 or *N. apis*-RPB1 gene was analyzed in the 66 brood samples in which *Nosema* spp. had been detected by conventional PCR. Multiplication of microsporidians was confirmed in only 16 of these samples (24%), of which 15 were positive for *N. ceranae* at a prevalence which was always lower than 2% (L, P1, P3, P4, P5 and P6 stages; range 1.12–1.60%; Table 4; Supplementary Table S1). Conversely, active multiplication of *N. apis* was only detected in one larva that was co-infected by *N. ceranae* (L stage, 0.18%, Table 4). Indeed, this was the only confirmed case of *N. apis* multiplication in immature stages in the 2 years of study, and only when accompanied by *N. ceranae* in a co-infection. All samples showed high Cp values (>34 cycles; Supplementary Table S1) although the extraction controls, RTC and NTC were negative, indicating the absence of any contamination or non-specific DNA amplification.

The annual prevalence of *Nosema* spp. in BBs (Table 5) was also calculated according to the total number of BBs analyzed in each season (pre- and post-clustering). The highest multiplication rate (2.27%) was observed for *N. ceranae* post-clustering in Assay 2, when the highest level of detection (10.45%) was registered. The only larvae positive to *N. apis* and *N. ceranae* (Table 4) corresponded to Assay 2 in the post-clustering season.

Six out of 10 beehives were positive for *Nosema* spp. in BBs at some point during the study (four colonies out of nine were found infected in pre-clustering and three out of six post-clustering; Supplementary Table S2) and the infection was only persistent in the BBs of a single colony (H8) in Assay 2.

Table 4

Number of positive samples and percentage (in brackets) to *Nosema* spp. detected by conventional PCR+ (detection) and by Real Time (RT) PCR (multiplication), according to the developmental phase of the bee brood: L (capped stretched larva; 2–3 days pct); P1 (white eye pupa stage; 4 days pct); P2 (pink eye stage; 5–6 days pct); P3 (dark pink-purple eye pupa stage; 7–8 days pct); P4 (dark purple eye pupa stage; 9 days pct); P5 (black eye pupa; 10–11 days pct) and P6 (resting adult pre-emergence stage; 12 days pct). Co-infection indicates brood with *N. ceranae* and *N. apis* together.

		Bee brood stage							Total
		L	P1	P2	P3	P4	P5	P6	
	<i>n</i>	562	179	233	210	117	59	58	1418
Detection (PCR+)	<i>N. ceranae</i>	36 (6.41)	6 (3.35)	1 (0.43)	3 (1.43)	1 (0.85)	1 (1.69)	2 (3.45)	50 (3.53)
	<i>N. apis</i>	5 (0.89)	0 (0.00)	1 (0.43)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	6 (0.42)
	Co-infection	8 (1.42)	1 (0.56)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.72)	10 (0.71)
Multiplication (RT-PCR+)	<i>N. ceranae</i>	9 (1.60)	2 (1.12)	0 (0.00)	1 (0.48)	1 (0.85)	1 (1.69)	1 (1.72)	15 (1.06)
	<i>N. apis</i>	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Co-infection	1 (0.18)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.07)

pct, post capping time.

Table 5

Percentage of brood samples positive for *Nosema* spp. detected by conventional PCR (detection) and by real time (RT) PCR (multiplication) according to the season (pre- and post-clustering). Co-infection indicates a brood infected with both *Nosema ceranae* and *Nosema apis*.

			Bee brood samples								
			<i>n</i>	Detection (% PCR+)			Multiplication (% RT-PCR+)				
Year	Hive ID	Season		<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>	Co-infection	No. positive samples	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>	Co-infection	No. positive samples
2015–2016	H1–H5	Pre-clustering	447	0.45	0.00	0.00	2	0.45	0.00	0.00	2
		Post-clustering	172	0.00	0.00	0.00	0	–	–	–	0
2016–2017	H6–H10	Pre-clustering	359	0.56	0.00	0.56	4	0.84	0.00	0.28	4
		Post-clustering	440	10.45	1.36	1.82	60	2.27	0.00	0.00	10
2015–2017	H1–H10	Study	1418	3.53	0.42	0.71	66	1.06	0.00	0.07	16

The analysis of the prevalence in BBs pre-clustering and post-clustering adopted a non-normal distribution. The frequency of the samples displaying active multiplication of *N. apis* (co-infected with *N. ceranae*) was very low (one sample) so no further statistical analyses were performed. The non-parametric Kruskal–Wallis test proved that there were no significant differences in the prevalence of natural *N. ceranae* infections of BBs in the two assays (year of study), or seasonally (pre- or post-clustering, $P > 0.05$).

3.2. Detection of *Nosema* spp. DNA in the brood cells

A total of 164 cells were studied, corresponding to 20.32% of the total brood analyzed in Assay 2. As the results on the BBs lodged in those cells were also available, both sets of data were represented together (Fig. 1). Of 164 cell samples analyzed, *Nosema* spp. were only detected in 26 cells (15.9%), of which *N. ceranae* was found in 17 cells (10.4%) and *N. apis* in four cells (2.4%), with both species detected in five cells (3.1%). Moreover, 12 cells (7.3%) that were negative for *Nosema* spp. DNA had hosted eight larvae/pupae in which *N. ceranae* was detected only by conventional PCR (4.9%), and another four brood samples (2.4%) were positive following RT-PCR which indicated the multiplication of this microsporidian. All controls (extraction and NTC) were negative; *N. apis* and *N. ceranae* positive controls showed amplicons of the expected size.

3.3. *Nosema* spp. prevalence in adult bees

A total of 5700 adult worker bees were analyzed individually to determine the number of infected bees in each colony and at each sampling time point (Tables 1 and 2). As only 5650 adult bees

(3348 IBs and 2302 FBs) were positive for the IPC, only these samples were analyzed further. Extraction controls PCR-NTC were negative, showing the absence of any contamination; *N. apis* and *N. ceranae* positive controls showed amplicons of the expected size. The mean prevalence of ABs in the colonies with BBs infected by *N. ceranae* was higher than in the colonies with BBs not infected, and these results were always observed, irrespective of whether they were analyzed pre- and post-clustering or if they were analyzed before, after or at the same time as brood comb sampling (Fig. 2). However those results were not statistically significant ($P > 0.5$).

3.4. Validation of *Nosema* spp. multiplication assay

Table 6 shows the results on DNA and cDNA obtained from *N. apis* and *N. ceranae* environmental spores and analyzed by RT-PCR. All the cDNA samples were negative, showing that the environmental spores of *N. apis* or *N. ceranae* demonstrated no activity of *RPB1* or *PTP3* genes, respectively. In addition, the same samples that had been processed with no reverse transcriptase enzyme (RTC) did not show any amplification, thus demonstrating that the DNase treatment had been efficient and no genomic DNA remained. Conversely, the DNA obtained from the same samples showed low amplification Cp values, thus confirming good preservation of spores (CIAPA stocks) used for this assay.

On the other hand, no cross-reaction was observed and NC-PTP3 primers specifically detected *N. ceranae* samples while NA-RPB1 primers detected only *N. apis* samples. NTCs were negative in all the analyses performed and positive controls indicated the right amplification in their respective reactions.

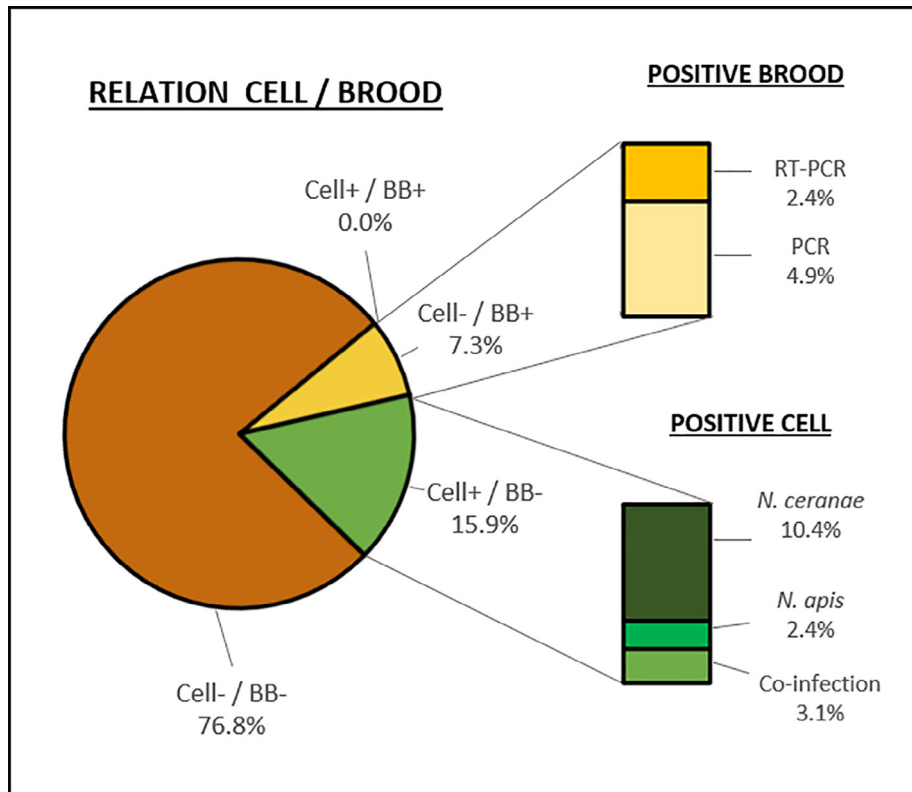


Fig. 1. Percentage of brood cells positive for *Nosema* spp. relative to the detection of *Nosema* spp. in the bee brood (BB). +, positive result; –, negative result. Positive brood: percentage of brood cells that were negative for *Nosema* spp., that were occupied with brood positive by PCR (*Nosema* spp. DNA detection) or by real-time-PCR (*Nosema* spp. multiplication). Positive cell: percentage of brood cells positive that were occupied with bee immature stages that had been found negative (uninfected brood).

4. Discussion

This work confirms that *Nosema* spp. infection occurs naturally in immature honey bees, as proposed previously based on laboratory studies (Eiri et al., 2015; Benvau and Nieh, 2017). Although nosemosis has been traditionally considered an adult disease since it was first described in *A. mellifera* (Zander, 1909; Bailey, 1955; Fries, 1988; Higes et al., 2006; Huang et al., 2007; Fries et al., 1996), there were a few descriptions of infection at immature stages that had been overlooked. The first report of microsporidians in brood was the detection of *N. apis* spores in the hemolymph of larvae (Gilliam and Shimanuki, 1967). Some years later “brood *Nosema*” infection of late larval or pupal honey bees was described in an apiary in South Africa (Buys, 1972, 1977; cited in Clark, 1980), believed to be a species distinct from *N. apis* which had not yet been confirmed. Many years later, *N. ceranae* was detected by PCR in immature drones, queens and workers (Traver and Fell, 2011, 2012; Rodríguez et al., 2014) and *N. apis* in worker pupae (Rodríguez et al., 2014), although data about their prevalence were not provided and their multiplication was not confirmed. Thus, to our knowledge, this is the first study reporting the prevalence of *N. ceranae* and *N. apis* infection in immature worker stages under natural conditions.

As expected, *N. ceranae* (3.53%) was found more frequently than *N. apis*, the latter being more frequent together with *N. ceranae* infection (0.71%) than alone (0.42%). The detection of rNAm of *N. ceranae*-*PTP3* or *N. apis*-*RPB1* genes proved to be a useful tool to confirm the multiplication of these microsporidians. Environmental spores are considered dormant stages with very low or even absent cellular activity (reviewed in Williams et al., 2014). In this work, spores failed to show any amplification by RT-PCR and consequently, the positive results obtained in BBs confirm the active

multiplication of both *Nosema* spp., although the level of expression was low as reflected by the high Cp values observed (Supplementary Table S2). Indeed, *N. ceranae* multiplication was observed in 1.06% of the immature stages examined, while *N. apis* was only confirmed when the two species were co-infecting hosts (0.07%). *PTP3* gene expression, as with other spore-specific proteins, has been reported to be synthesized during the second half of sporogony during *Encephalitozoon cuniculi* infection (Brosson et al., 2006; Taupin et al., 2006; Grisdale et al., 2013). On the other hand, *RPB1* is directly related to the transcription of protein-coding genes (Katinka et al., 2001; Chymkowitz and Enserink, 2013) during the S phase of the cell cycle and to the production of non-coding RNA (Belkorchia et al., 2017) involved in various crucial cellular processes.

It was previously shown that *N. ceranae* spores could develop intracellularly in midgut cells at the pre-pupal stage when the brood was experimentally infected (Eiri et al., 2015). However, *N. apis* had only been considered to develop successfully in adult bees (van den Eijnde and Vette, 1993, <https://www.nev.nl/pages/publicaties/proceedings/nummers/04/205-208.pdf>). Nevertheless, our data confirm that both microsporidians can develop an active infection in brood under natural conditions, although at low levels for *N. ceranae* and almost anecdotally for *N. apis*. In fact, microsporidian multiplication was evident from the youngest (L) to the oldest stages (P6) studied, and no relationship was found between the detection or transcription of *N. ceranae* and/or *N. apis* genes and the stage of bee development. Similarly, *N. ceranae* completed its full life cycle inside brood midgut cells of larvae of the same age as those tested here (L: Eiri et al., 2015), the tissue that will become the adult ventriculum (Carreck et al., 2013). This fact was also confirmed for *N. apis* via the transcription of the *RPB1* gene, as for the *N. ceranae* *PTP3* gene. Nevertheless, multiplication

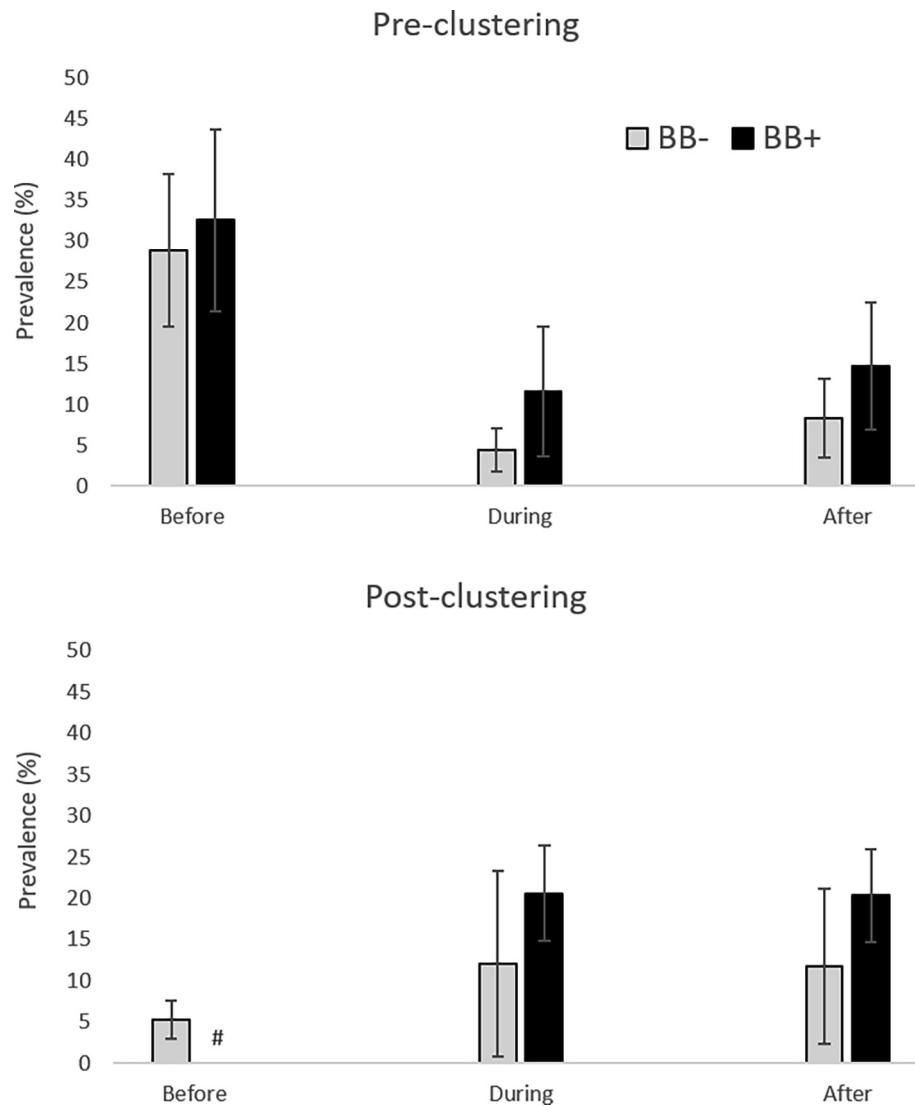


Fig. 2. Prevalence of *Nosema ceranae* infection in adult bees comparing colonies in which the bee brood (BB) was positive (+) or negative (–), grouped pre-clustering or post-clustering. a, no significant difference ($P > 0.05$). #, number of colonies available with infected BBs. Vertical lines indicate S.D.

Table 6
Validation of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* multiplication assay by real-time-PCR (RT-PCR). DNA and RNA were extracted from environmental spores of *N. apis* and *N. ceranae*. Cp [Crossing point] values were obtained for DNA, cDNA and with no-rtrotranscriptase enzyme (RTC). O value indicates no amplification detected. Efficiency for the β -actin gene (91.4%) was determined using a previously described methodology (Martín-Hernández et al., 2017).

Gene	Sample	Cp values			RT-PCR efficiency
		DNA	cDNA	RTC	
PTP3	NC 1.1	27.24 ± 0.01	0	0	99.8%
	NC 1.2	27.11 ± 0.09	0	0	
	NC 1.3	32.02 ± 0.40	0	0	
	NC 1.4	32.18 ± 0.03	0	0	
	NC 3.1	24.89 ± 0.11	0	0	
	NC 3.3	29.81 ± 0.01	0	0	
RPB1	NA 1.2	21.09 ± 0.19	0	0	102%
	NA 1.3	22.65 ± 0.13	0	0	
	NA 1.4	21.51 ± 0.07	0	0	
	NA 3.2	27.60 ± 0.04	0	0	
	NA 3.3	35.19 ± 1.43	0	0	

C+, C–, positive and negative controls.

was only confirmed in the 24% of the samples in which *Nosema* spp. were identified by conventional PCR, indicating that infection by many of the microsporidians was apparently not successful (as

the exhaustive method to process the brood ruled out surface contamination). This might have been because the germination of spores ingested by a brood did not actually occur (Bailey, 1955)

or because the *Nosema* spp. life cycle was stopped at some point, which could result in infection latency or spore dormancy (BenVau and Nieh, 2017). Some pathogenic consequences of brood infection on resulting mature adult bees have been reported (Eiri et al., 2015; BenVau and Nieh, 2017) that are detrimental to colony viability. These consequences of larval infection may include reduced longevity (Eiri et al., 2015), an altered sting morphology, and an increase in vitellogenin titers that could affect normal age polyethism and disturb the colony balance (Goblirsch et al., 2013; Lecocq et al., 2016; BenVau and Nieh, 2017). Microsporidian infection of brood stages is not rare as it has been confirmed for other species such as *N. bombi* infection of *B. terrestris* larvae (van den Eijnde and Vette, 1993, <https://www.nev.nl/pages/publicaties/proceedings/nummers/04/205-208.pdf>; Schmid-Hempel and Loosli, 1998) or *Nosema furnacalis* and *Nosema granulosis* infection of *L. sticticalis* larvae (Malysh et al., 2018). In fact, immature stages may be the only stages susceptible to infection by some species (van de Eijnde and Vette, 1993; Malysh et al., 2018), although once acquired, *N. ceranae* (Malysh et al., 2018) and *N. bombi* infection (van den Eijnde and Vette, 1993, <https://www.nev.nl/pages/publicaties/proceedings/nummers/04/205-208.pdf>) can also develop during adult stages.

Once brood infection was established, the brood cells were analyzed to test them as a possible means of transmission. The presence of *Nosema* spp. DNA was detected at low levels (15.9%), confirming the cells were contaminated and mainly with *N. ceranae*. However, none of the contaminated cells had been occupied by an infected brood, whereas some cells (7.3%) in which *Nosema* spp. DNA was not detected had hosted brood infected by *N. ceranae*, although only a few of these (2.7%) had a confirmed and active infection (positive by RT-PCR). As such, it would appear that contamination of the brood's immediate environment was not the main pathway of transmission, even when the prevalence of infected adult bees was quite high (reflecting a more intense contamination of the colony). *Nosema ceranae* spores can remain viable in wax cells (MacInnis C.I., 2017. *Nosema ceranae*: A sweet surprise? Investigating the viability and infectivity of the honey bee (*Apis mellifera* L.) parasite *N. ceranae*. MSc Thesis. University of Alberta, Canada. https://era.library.ualberta.ca/items/7b26607f-08fb-4e85-9f7a-0fbac0afee68/view/ccb5adfe-2b24-47c9-9ef6-79b69e598637/MacInnis_Courtney_I_201705_MSc.pdf) and they have been detected by PCR in royal jelly (Cox-Foster et al., 2007; Traver and Fell, 2012), which could be the main means of transmission to immature bees following exposure to the spores through brood food (Traver and Fell, 2012; Goblirsch, 2017).

Horizontal transmission of microsporidians is possible through different routes that include fecal–oral and oral–oral transmission, and the ingestion of contaminated food and water (Didier et al., 2004). The ingestion of spores via contaminated food, water and pollen by honey bees has already been confirmed (Fries, 1993; Higes et al., 2008b), through the exchange of food between bees or when they perform their cleaning duties (Bailey, 1955; Fries, 1993; Higes et al., 2009b; Smith, 2012). In fact, food exchange by nurse bees was probably the main source of infection here as they play a pivotal role in brood feeding (Crailsheim, 1990). Other routes have been suggested, such as vertical transmission of spores from the queen to BBs (Traver and Fell, 2011), and this possibility cannot be ruled out as no data about queen infection was collected here.

The prevalence of *Nosema* spp. infection in adult bees was assessed to determine whether the more infected adult bees, the greater the probability of infection of the brood. This effect might have been expected since the infected immature stages can survive to adulthood, their infection persisting after metamorphosis and when they become adults (Eiri et al., 2015; BenVau and Nieh, 2017). However, although Fig. 2 shows the higher level of infection

in colonies where a BB was positive, this relationship could not be statistically confirmed. Consequently, more studies including a higher number of colonies should be developed to demonstrate this apparent pattern. Moreover, the spread of the pathogen from the newborn infected bees to their healthy nest mates may be very variable, depending on whether they engage in intensive interactions or are socially isolated, which influences the health status of the whole colony at different times of the year (Biganski et al., 2017).

According to the results presented here, *N. ceranae* and *N. apis* are not only an adult honey bee parasite, although there is little risk of infection of the worker brood under field conditions even though the level of infection in adult bees is relatively high. The consequences of brood infection are of veterinary interest and it will be necessary to determine the temporal evolution of such an infection, as well as the effect it may have on the epidemiology of the disease and on the evolution of the colonies.

Acknowledgements

The authors wish to thank V. Albendea, T. Corrales, M. Gajero, C. Uceta, M. Buendía, J. Almagro and J. García of the Honey Bee Pathology Laboratory, Spain for their technical support. A. Urbietta was supported by grant RTA2012-00076-C02-01 from The National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Spain). This work was supported by INIA; (Spain) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional, European Union (FEDER) funds (RTA2015-00013-C03-01 and RTA2012-00076-C02-01). This funding had no influence on the content of this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.04.002>.

References

- Bailey, L., 1955. The infection of the ventriculus of the adult honey bee by *Nosema apis* (Zander). *Parasitology* 45, 86–94. <https://doi.org/10.1017/S0031182000027451>.
- Bass, D., Czech, L., Williams, B.A.P., Berney, C., Dunthorn, M., Mahé, F., Torruella, G., Stentiford, G.D., Williams, T.A., 2018. Clarifying the relationships between microsporidia and cryptomycota. *J. Eukaryot. Microbiol.* 65 (6), 773–782. <https://doi.org/10.1111/jeu.12519>.
- Bekele, A.Z., Mor, S.K., Phelps, N.B.D., Goyal, S.M., Armién, A.G., 2015. A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Vet. Q.* 35, 48–50. <https://doi.org/10.1080/01652176.2014.981766>.
- Belkorchia, A., Pombert, J.F., Polonais, V., Parisot, N., Delbac, F., Brugère, J.F., Peyret, P., Gaspin, C., Peyretailade, E., 2017. Comparative genomics of microsporidian genomes reveals a minimal non-coding RNA set and new insights for transcription in minimal eukaryotic genomes. *DNA Res.* 24, 251–260. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx002>.
- BenVau, L.R., Nieh, J.C., 2017. Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Sci. Rep.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14702-4>.
- Biganski, S., Kurze, C., Müller, M.Y., Moritz, R.F.A., 2017. Social response of healthy honeybees towards *Nosema ceranae*-infected workers: care or kill? *Apidologie*. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0557-8>.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Meana, A., Higes, M., 2012a. Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitol. Res.* 110, 2557–2561. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2760-2>.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De La Rúa, P., Meana, A., Higes, M., 2012b. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res. Vet. Sci.* 93, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.002>.
- Brosson, D., Kuhn, L., Delbac, F., Garin, J., Vivarès, C.P., Texier, C., 2006. Proteomic analysis of the eukaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics* 6, 3625–3635. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500796>.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Hugggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

- Buys, B., 1977. A nosema disease affecting honeybee brood. In: Colibaba, S. (Ed.), Apimondia Symposium of Bee Biology and Pathology. Merelbeke, Belgium, pp. 73–76.
- Calderón, R.A., Sanchez, L.A., Yañez, O., Fallas, N., 2008. Presence of *Nosema ceranae* in africanized honey bee colonies in costa rica. J. Apic. Res. 47, 328–329. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101485>.
- Carreck, N.L., Andree, M., Brent, C.S., Cox-Foster, D., Dade, H.A., Ellis, J.D., Hatjina, F., VanEngelsdorp, D., 2013. Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection. In V. Dietemann, J.D. Ellis, P. Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. J. Apic. Res. 52, 1–40. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.03>.
- Cepero, A., Ravoet, J., Gómez-Moracho, T., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., González-Porto, A.V., De Graaf, D.C., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2014. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. BMC Res. Notes 7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-649>.
- Cepero, A., Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Gómez-Moracho, T., Barrios, B., Bernal, J., Martín, M.T., et al., 2016. Passive laboratory surveillance in Spain: pathogens as risk factors for honey bee colony collapse. J. Apicult. Res. 54, 525–531. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1162978>.
- Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R., de Graaf, D.C., 2017. *Nosema neumannii* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. Eur. J. Protistol. 61, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.07.002>.
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J. Invertebr. Pathol. 97, 186–188. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.010>.
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncrastiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J.S., 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 101, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.012>.
- Chen, Y.P., Huang, Z.Y., 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. Apidologie 41, 364–374. <https://doi.org/10.1051/apido/2010021>.
- Chymkowitz, P., Enserink, J.M., 2013. The cell cycle rallies the transcription cycle Cdc28/Cdk1 is a cell cycle-regulated transcriptional CDK. Transcription 4, 3–6. <https://doi.org/10.4161/trns.2456>.
- Clark, T.B., 1980. A second microsporidian in the honeybee. J. Invertebr. Pathol. 35, 290–294. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(80\)90164-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(80)90164-0).
- Copley, T.R., Chen, H., Giovenazzo, P., Houle, E., Jabaji, S.H., 2012. Prevalence and seasonality of *Nosema* species in Québec honey bees. Can. Entomol. 144, 577–588. <https://doi.org/10.4039/tce.2012.46>.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., VanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318, 283–287. <https://doi.org/10.1126/science.1146498>.
- Crailsheim, K., 1990. The protein balance of the honey bee worker. Apidologie 21, 417–429. <https://doi.org/10.1051/apido:19900504>.
- Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Stovall, M.E., Green, L.C., Bowers, L., Fredenburg, A., Didier, P.J., 2004. Diagnosis and epidemiology of microsporidia infections in humans. Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health 35, 65–81. <https://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-40149108497&origin=inward>.
- Eiri, D.M., Suwannapong, G., Endler, M., Nieh, J.C., 2015. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. PLoS One 10, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126330>.
- European Commission, 2017. EU Pollinators Initiative: Roadmap 1–3. Ref. Ares (2017)5895634 – 01/12/2017.
- Fries, I., 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. Apidologie 19, 319–328. <https://doi.org/10.1051/apido:19880310>.
- Fries, I., 1993. *Nosema apis*—A parasite in the honey bee colony. Bee World 74 (1), 5–19. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1993.11099149>.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). J. Invertebr. Pathol. 103, S73–S79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>.
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S.B., Pieniasek, N.J., 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microsporida, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32, 356–365. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80059-9](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80059-9).
- Fries, I., Slemenda, S.B., da Silva, A., Pieniasek, N.J., 2003. African honey bees (*Apis mellifera* scutellata) and nosema (*Nosema apis*) infections. J. Apic. Res. 42, 13–15. <https://doi.org/10.1080/00218839.2003.11101080>.
- Galindo, L.J., Torruella, G., Moreira, D., Timpano, H., Paskerova, G., Smirnov, A., Nasonova, E., López-García, P., 2018. Evolutionary genomics of *Metchnikovella incurvata* (Metchnikovellidae): an early branching microsporidian. Genome Biol Evol. 10 (10), 2736–2748. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy205>.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M., 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. Apidologie 40, 117–123. <https://doi.org/10.1051/apido/2008065>.
- Gilliam, M., Shimanuki, H., 1967. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honeybee hemocytes. J. Invertebr. Pathol. 9, 387–389. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(67\)90074-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(67)90074-2).
- Gisder, S., Schuler, V., Horschler, L.L., Groth, D., Genersch, E., 2017. Long-term temporal trends of *Nosema* spp. infection prevalence in Northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00301>.
- Goblirsch, M., 2017. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). Apidologie. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0535-1>.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058165>.
- Grisdale, C.J., Bowers, L.C., Didier, E.S., Fast, N.M., 2013. Transcriptome analysis of the parasite *Encephalitozoon cuniculi*: an in-depth examination of pre-mRNA splicing in a reduced eukaryote. BMC Genomics 14, 207. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-207>.
- Hall, A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95–98. <https://doi.org/10.12691/ajidm-4-3-3>. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>.
- Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzis, D., Meeus, I., Brunain, M., Smaghe, G., De Graaf, D.C., 2011. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. J. Invertebr. Pathol. 108, 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.07.003>.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J. Invertebr. Pathol. 92, 93–95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J. Invertebr. Pathol. 94, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P., Meana, A., 2008b. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. J. Invertebr. Pathol. 97, 76–78. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.06.002>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008a. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ. Microbiol. 10, 2659–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Botías, C., Meana, A., 2009a. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera* intermissa). J. Apic. Res. 48, 217–219. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.12>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Marín, P., Meana, A., 2009b. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). Environ. Microbiol. Rep. 1, 495–498. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00052.x>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie 41, 375–392. <https://doi.org/10.1051/apido/2010019>.
- Huang, W.F., Bocquet, M., Lee, K.C., Sung, I.H., Jiang, J.H., Chen, Y.W., Wang, C.H., 2008. The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. J. Invertebr. Pathol. 97, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.001>.
- Huang, W.-F., Jiang, J.-H., Chen, Y.-W., Wang, C.-H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. Apidologie 38, 30–37. <https://doi.org/10.1051/apido>.
- Huang, W.F., Solter, L.F., 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. J. Invertebr. Pathol. 113, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.01.001>.
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F.L., Jaffé, R., Köhler, A., Pirk, C.W.W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D.R., Van Der Steen, J.J.M., Vejsnæs, F., Williams, G.R., Zheng, H.Q., 2013. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. In V. Dietemann, J. D. Ellis, P. Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52, 1–53. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I.H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G., Mendoza, Y., 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. J. Invertebr. Pathol. 101, 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.006>.
- IPBES (Intergovernmental Platform on Biodiversity and Ecosystem Services), 2016. Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca, H. T. Ngo, J. C. Biesmeijer, T. D. Breeze, L. V. Dicks, L. A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele, A. J. Vanbergen, M. A. Aizen, S. A. Cunningham, C. Eardley, B. M. Freitas, N. Gallai, P. G. Kevan, A. Kovács-Hostyánszki, P. K. Kwapong, J. Li, X. Li, D. J. Martins, G. Nates-Parra, J. S. Pettis, R. Rader, and B. F. Viana (Eds.). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 36 pages.
- James, T.Y., Pelin, A., Bonen, L., Ahrendt, S., Sain, D., Corradi, N., Stajich, J.E., 2013. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and microsporidia. Curr. Biol. 23 (16), 1548–1553. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.057>.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillott, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Winkler, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature 414, 450–453. <https://doi.org/10.1038/35106579>.

- Khezri, M., Moharrami, M., Modirrousta, H., Torkaman, M., Salehi, S., Rokhzad, B., Khanbabai, H., 2018. Molecular detection of *Nosema ceranae* in the apiaries of Kurdistan province, Iran. *Vet Res Forum* 9 (3), 273–278 http://vrf.iranjournals.ir/article_32086.html.
- Khoury, D.S., Myerscough, M.R., Barron, A.B., 2011. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. *PLoS One* 6, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018491> e18491.
- Khoury, D.S., Barron, A.B., Myerscough, M.R., 2013. Modelling food and population dynamics in honey bee colonies. *PLoS One* 8, (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059084> e59084.
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R.J., 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.014>.
- Lecocq, A., Jensen, A.B., Kryger, P., Nieh, J.C., 2016. Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep22042>.
- Li, J., Qin, H., Wu, J., Sadd, B.M., Wang, X., Evans, J.D., Peng, W., Chen, Y., 2012. The prevalence of parasites and pathogens in Asian honeybees *Apis cerana* in China. *PLoS One* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047955>.
- Lodesani, M., Costa, C., Besana, A., Dall'Olio, R., Franceschetti, S., Tesoriero, D., Vaccari, G., 2014. Impact of control strategies for *Varroa destructor* on colony survival and health in northern and central regions of Italy. *J. Apic. Res.* 53, 155–164. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.17>.
- Malysz, J.M., Ignatieva, A.N., Artokhin, K.S., Frolov, A.N., Tokarev, Y.S., 2018. Natural infection of the beet webworm *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Crambidae) with three Microsporidia and host switching in *Nosema ceranae*. *Parasitol. Res.* 117, 3039. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5987-3>.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., Higes, M., 2007. Outcome of colonization of *A. mellifera* by *N. ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (20), 6331–6338. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.00270-07>.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Higes, M., 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (8), 2554–2557. <https://doi.org/10.1128/AEM.02908-08>.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M., 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* 14, 2127–2138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x>.
- Martín-Hernández, R., Higes, M., Sagastume, S., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Budge, G.E., Meana, A., Boonham, N., 2017. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS One* 12, (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170183> e0170183.
- Meana, A., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2010. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *J. Apic. Res.* 49 (2), 212–214. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.12>.
- Ozgor, E., Celebier, I., Ulusoy, M., Keskin, N., 2017. First detection of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in greater wax moth *Galleria mellonella*. *J. Apic. Sci.* 61 (1). <https://doi.org/10.1515/jas-2017-0015>.
- Özgör, E., Güzerin, E., Keskin, N., 2015. Determination and comparison of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in terms of geographic and climatic factors. *Hacettepe J. Biol. Chem.* 43, 9–15 <https://doi.org/10.15671/HJBC.20154311200>.
- Paxton, R.J., 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *J. Apic. Res.* 49, 80–84. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.11>.
- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558–565. <https://doi.org/10.1051/apido>.
- Porrini, C., Mutinelli, F., Bortolotti, L., Granato, A., Laurenson, L., Roberts, K., Gallina, A., Silvester, N., Medrzycki, P., Renzi, T., Sgolastra, F., Lodesani, M., 2016. The status of honey bee health in Italy: Results from the nationwide bee monitoring network. *PLoS One* 11, (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155411> e0155411.
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G., de Graaf, D.C., 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>.
- Rodríguez, M., Vargas, M., Antúnez, K., Gerding, M., Ovidio Castro, F., Zapata, N., 2014. Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biobío Region of Chile and their association with other honey bee pathogens. *Chil. J. Agric. Res.* 74, 170–177. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000200007>.
- Rodríguez, M., Vargas, M., Gerding, M., Navarro, H., Antúnez, K., 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *J. Apic. Res.* 51, 285–287. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.12>.
- Sánchez Collado, J.G., Higes, M., Barrio, L., Martín-Hernández, R., 2014. Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitol. Res.* 113, 1695–1701. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3814-z>.
- Schmid-Hempel, P., Loosli, R., 1998. A contribution to the knowledge of *Nosema* infections in bumble bees, *Bombus* spp. *Apidologie* 29, 525–535. <https://doi.org/10.1051/apido:19980605>.
- Smith, M.L., 2012. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS One* 7 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone>.
- Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A.P., Bjornson, S., Kent, M.L., Freeman, M.A., Brown, M.J.F., Troemel, E.R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K.F., Solter, L., 2016. Microsporidia – emergent pathogens in the global food chain. *Trends Parasitol.* 32, 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.004>.
- Taupin, V., Méténier, G., Delbac, F., Vivarès, C.P., Prensier, G., 2006. Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of *Encephalitozoon cuniculi*: an immunocytochemical and *in situ* hybridization study with ultrathin frozen sections. *Parasitology* 132, 815–825. <https://doi.org/10.1017/S0031182005009777>.
- Tokarev, Y.S., Zinatullina, Z.Y., Ignatieva, A.N., Zhigileva, O.N., Malysz, J.M., Sokolova, Y.Y., 2018. Detection of two microsporidia pathogens of the European honey bee *Apis mellifera* (Insecta: Apidae) in Western Siberia. *Acta Parasitol.* 63 (4), 728–732. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0086>.
- Traver, B.E., Fell, R.D., 2011. *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 107, 234–236. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.016>.
- Traver, B.E., Fell, R.D., 2012. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 408–410. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.001>.
- Vanbergen, A.J., Initiative, I.P., 2013. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Front. Ecol. Environ* 11, 251–259. <https://doi.org/10.1890/120126>.
- van den Eijnde, J., Vette, N., 1993. *Nosema* infection in honey bees (*Apis mellifera* L.) and bumble bees (*Bombus terrestris* L.). *Proc. Sect. Exp. Appl. Entomol. Neth. Entomol. Soc.* 4, 205–208 <https://www.nev.nl/pages/publicaties/proceedings/nummers/04/205-208.pdf>.
- Webster, T.C., 1993. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.* 133, 869–870.
- Webster, T.C., Thacker, E.M., Pomper, K., Lowe, J., Hunt, G., 2008. *Nosema apis* infection in honey bee (*Apis mellifera*) queens. *J. Apic. Res.* 47, 53–57. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101423>.
- Williams, G.R., Shafer, A.B.A., Rogers, R.E.L., Shutler, D., Stewart, D.T., 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.08.005>.
- Zander, E., 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Leipziger Bienenztg* 24, 147–150.

Nosema apis and Nosema ceranae Tissue Tropism in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*)

Veterinary Pathology

1-7

© The Author(s) 2019

Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/0300985819864302

journals.sagepub.com/home/vet



Mariano Higes¹, Pilar García-Palencia², Almudena Urbietta¹, Antonio Nanetti³, and Raquel Martín-Hernández^{1,4}

Abstract

The microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* are major honey bee pathogens that possess different characteristics in terms of the signs they produce, as well as disease development and transmission. Although the ventricular epithelium is generally considered the target tissue, indirect observations led to speculation that *N. ceranae* may also target other structures, possibly explaining at least some of the differences between these 2 species. To investigate the tropism of *Nosema* for honey bee tissues, we performed controlled laboratory infections by orally administering doses of 50 000 or 100 000 fresh mature spores of either species. The fat body was isolated from the infected bees, as well as organs from the digestive (esophagus, ventriculus, ileum, rectum), excretory (Malpighian tubules), circulatory (aorta, heart), respiratory (thoracic tracheas), exocrine (hypopharyngeal, mandibular and labial, cephalic, thoracic salivary glands), and sensory/nervous (brain, eyes and associated nerve structures, thoracic nerve ganglia) systems. Tissues were examined by light and electron microscopy at 7, 10, and 15 days postinfection. Both *Nosema* species were found to infect epithelial cells and clusters of regenerative cells in the ventriculus, and while the ileum and rectum contained spores of the microsporidia in the lumen, these structures did not show overt lesions. No stages of the parasites or cellular lesions were detected in the other organs tested, confirming the high tropism of both species for the ventricular epithelium cells. Thus, these direct histopathological observations indicate that neither of these 2 *Nosema* species exhibit tropism for honey bee organs other than the ventriculus.

Keywords

honeybee, *Apis mellifera*, microsporidia, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, tissue tropism, histopathology

Microsporidia are obligate intracellular eukaryotic parasites included in the kingdom of Fungi.¹ However, Microsporidia were more recently considered highly derived parasitic protists, sisters of *Cryptomycota/Rozella*, or diverging as the next branch below fungi.^{2,27} *Nosema apis* was the first microsporidium known to infect western honey bees (*Apis mellifera*),⁴² and it has since been found on all continents.¹⁵ At the beginning of the 21st century, another microsporidium—*Nosema ceranae*—was also seen to naturally infect *A. mellifera* colonies in Europe,²⁴ and its worldwide spread in this and other *Hymenopteran* hosts was also subsequently confirmed.³²

Both these microsporidia may negatively affect the longevity of the individuals in a honey bee colony, disrupting age polyethism with an intensity that reflects their prevalence in the colony.^{18,32} However, the clinical signs of *Nosema* infection differ depending on the causative agent, both at the individual and colony level.^{23,25,32} For example, the typical characteristics of *N. apis* infection include diarrhea, observable bee mortality around the hive, and seasonality, whereas *N. ceranae* infection results in colony dwindling and collapse in all seasons. All adult individuals of a colony, independent of caste and sex, are susceptible to *Nosema* infection, and there is evidence from

both in vitro rearing experiments¹⁰ and studies of field colonies^{37,41} that *Nosema spp.* can even infect immature honey bee stages. Indeed, under natural conditions, either coinfection or infection with a single *Nosema* species is possible.^{30,33,35}

The transmission of *Nosema* infection occurs mainly by the ingestion of spores in contaminated food and water, during nest cleaning activities, or via food exchange.³⁸ There is also evidence that both *Nosema* species can be sexually transmitted to a

¹Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Honey Bee Pathology Laboratory, Marchamalo, Guadalajara, Spain

²Department of Veterinary Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

³CREA Research Centre for Agriculture and Environment, Bologna, Italy

⁴Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT), Albacete, Spain

Corresponding Author:

Mariano Higes, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Honey Bee Pathology Laboratory, Marchamalo, CIAPA-IRIAF, San Martín s/n, 19180 Guadalajara, Spain.

Email: mhiges@jccm.es

healthy queen through contact with spore-containing semen during mating, although there is no evidence of subsequent transovarian transmission to offspring.³⁶ Both *N. apis* and *N. ceranae* infect epithelial cells of the *ventriculus* (or midgut), ultimately impairing the digestive capacity of this organ.^{12,20} Both species have a similar life cycle,^{18,29} summarized as (1) the initial spore penetration into the midgut lumen; (2) extrusion of the polar tubule and transfer of the sporoplasm into a host cell; (3) merogony, consisting of repeated binary fission of parasitic cells; and (4) sporogony, the production of new spores that can infect the same or adjacent cells (primary spores) or be released into the midgut lumen (environmental spores). This last stage of spore release suggests that there has been host cell rupture and damage to the ventricular epithelial layer.

There have been suggestions that *N. ceranae* might also infect other honey bee organs,^{6,7,17} although this issue remains unclear,²⁰ and there is no histopathological evidence that *N. ceranae* produces lesions in extraventricular tissue or of the presence of different stages of its life cycle at these sites. If evidence were to suggest that *N. ceranae* is not tissue specific, it would require a revision of our understanding of its life cycle,^[14] paving the way for new hypotheses about the differential pathogenesis and epidemiology of the 2 *Nosema* species. Accordingly, the objective was to assess the histologic lesions and the stages of the *Nosema* life cycle in extraventricular tissues after experimental infection with these parasites.

Materials and Methods

According to European legislation (EU Directive 2010/63/EU⁸), no specific permits were required for use of honey bees for this study. The biological material studied here was collected from *Apis mellifera iberiensis* colonies reared at the CIAPA-IRIAF (Marchamalo, Spain). One comb containing sealed worker brood was taken from a *Nosema*-free colony and maintained in an incubator at $34 \pm 1^\circ\text{C}$ until the adult worker honey bees emerged.³² Newly hatched bees were carefully removed, transferred to cages, maintained at 33°C in an incubator, and fed ad libitum with a sucrose solution (50% w/w in distilled water) combined with 2% Promotor L (a commercial mixture of amino acids and vitamins; Calier Lab, Les Franqueses del Valles, Barcelona, Spain). Honey and pollen were not used to feed the bees to avoid potential contamination with infective *Nosema spp.* spores.³¹

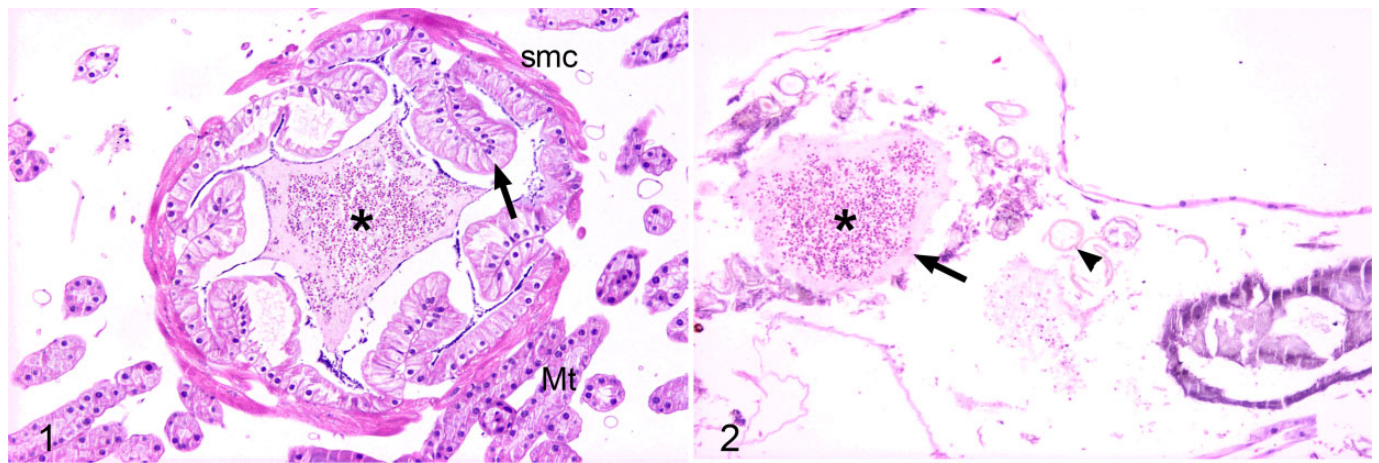
Viable and infective *N. apis* and *N. ceranae* spores were obtained from naturally infected Spanish honey bee colonies sent to our laboratory for pathological studies as described previously.^{29,31} Briefly, infected honey bees were macerated in distilled water (polymerase chain reaction [PCR] grade) and centrifuged for 6 minutes at 800 g. A pellet of mature spores was recovered, Percoll purified, and confirmed to represent a single species by PCR.³⁰ To homogenize and revitalize the spores, 100 laboratory-born 5-day-old bees were fed for 2 weeks with the same syrup as indicated above but containing 1 million spores of either *N. ceranae* or *N. apis*. Subsequently, these bees were anesthetized with CO₂ and processed as

described above to obtain Percoll-purified spores of the 2 individual *Nosema* species. The spores obtained were stored at room temperature for less than 24 hours before use.

Experimental honey bee infection was performed by individual oral administration when the bees were 5 days old. Water (2 μl) containing 5 or 10×10^4 fresh Percoll-purified *N. ceranae* or *N. apis* spores was offered to each bee using a micropipette,^{20,31,32} discarding those bees that did not ingest the entire dose. Other bees from the same batch received 2 μl of distilled water alone and served as uninfected controls. An intentionally high dose was administered relative to the approximate infective dose indicated elsewhere (for both *Nosema* species:¹¹ ID₁₀₀ = 1×10^4 spores) to promote a rapid onset of infection and to favor a wider spread to tissues for which the pathogens might show weaker tropism.

Five groups of bees were established in total, each distributed among 3 replicate cages containing 25 bees. The groups were coded as follows: A5, A10, C5, C10, and T0, where the letter indicates A = *N. apis*, C = *N. ceranae*, and T = uninfected control, and the number indicates challenge with 5 or 10×10^4 spores. Groups with different letters were reared at 33°C in separate incubators to avoid cross-infection. Sugar water with added 2% Promotor L was provided ad libitum as food, and the bees were analyzed on 7, 10, and 15 days postinfection (dpi), when a notable increase in ventricular infection was expected in the conditions of rearing used.²⁸ As such, 8 bees were taken at random from each group at 7 and 10 dpi, and 4 bees were taken from each A5, C5, and T0 groups at 15 dpi. It was not possible to take sufficient bees from the A10 and C10 groups at 15 dpi due to mortality at this timepoint. Of the bees collected at 7 and 10 dpi, 4 were used for histological studies by light microscopy (LM) and the other 4 were studied by transmission electron microscopy (TEM). Of the bees obtained at 15 dpi, 2 were used for LM studies and the other 2 for TEM studies.

The tissues and organs examined from each bee were brain, eyes, and associated nerve structures; hypopharyngeal, mandibular, and salivary (labial, cephalic, thoracic) glands; esophagus and abdominal digestive tract (ventriculus, ileum, rectal ampulla, Malpighian tubules); thoracic nerve ganglia; aorta and heart; thoracic trachea; and the fat body. The organs and tissues obtained were prepared for LM and TEM, as described previously.^{16,21} Briefly, for LM, the organs were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and embedded in paraffin wax, and 4- μm sections were stained with hematoxylin-eosin (HE). For TEM, the tissue was prefixed in a 2% glutaraldehyde/2.5% paraformaldehyde solution, washed 3 times in phosphate-buffered saline (PBS), postfixated in 1% osmium tetroxide, dehydrated in an ascending acetone series, and embedded in Epon-Araldite resin. Semithin (0.5- μm) sections were then stained with 1% methylene blue in a 4% sodium borate water solution, and they were first studied under a photomicroscope (Olympus Vanox AHB53; Olympus America, Melville, NY) to select the representative areas of interest. Subsequently, the Epon block was trimmed to obtain ultrathin (60-nm) sections. The grids were then dual contrasted with 2% uranyl-acetate in water and Reynold's lead citrate solution, for 10 minutes each,



Figures 1–2. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* experimental infections, worker honeybees. Hematoxylin-eosin (HE). **Figure 1.** Infection with 50 000 *N. ceranae* spores, 15 days postinfection (dpi). Cross section through the ileum surrounded by several Malpighian tubules (Mt). Note the uninfected columnar eosinophilic epithelial cells (arrow) of the ileum and the large number of mature spores in the lumen (asterisk). A thin layer of skeletal muscle cells (smc) is visible in the periphery. **Figure 2.** Infection with 100 000 *N. apis* spores, 10 dpi. Longitudinal section of the rectum with some fecal pellets that contain numerous spores (asterisk) surrounded by peritrophic membrane (arrow) and pollen (arrowhead).

and they were visualized and photographed on a Jeol 1010 electron microscope (Jeol USA, Peabody, MA) at an accelerating voltage of 80 to 100 kV.

Results

Clinical Findings

During the first 10 days of the experiment, no relevant clinical signs were observed in the infected bees (such as diarrhea), and there was no mortality among the caged bees during the first 10 dpi. At 15 dpi, bees infected with each *Nosema* species at the highest doses displayed some mortality, and indeed, no bees in the C10 group and only 2 bees in the A10 group survived to 15 dpi. As no samples were obtained from the C10 group at 15 dpi, no samples were taken from the A10 group at that time.

Microscopic Pathology

The histological results were similar in the different groups regardless of the *Nosema* species used for infection. Microscopic lesions were not detected in any cephalic or thoracic tissue from the infected honey bees, nor were *N. apis* or *N. ceranae* organisms detected in these tissues. Moreover, no lesions or organisms were seen in the different organs of the abdominal cavity, except for mature spores, which were found only in the lumen of the ileum and rectal ampulla, but pathologic changes were not detected in these tissues (Figs. 1, 2). Only the midgut (ventricle) epithelial cells were seen to be infected in any of the bees. A comparison of the infected bees did not provide any evidence of *Nosema* tropism for the aforementioned structures, irrespective of the species or of the spore dose administered.

Specific tissue alterations and different stages of the *Nosema* life cycle were detected in the midgut of infected bees but not in the T0 control group. The microscopic lesions were similar

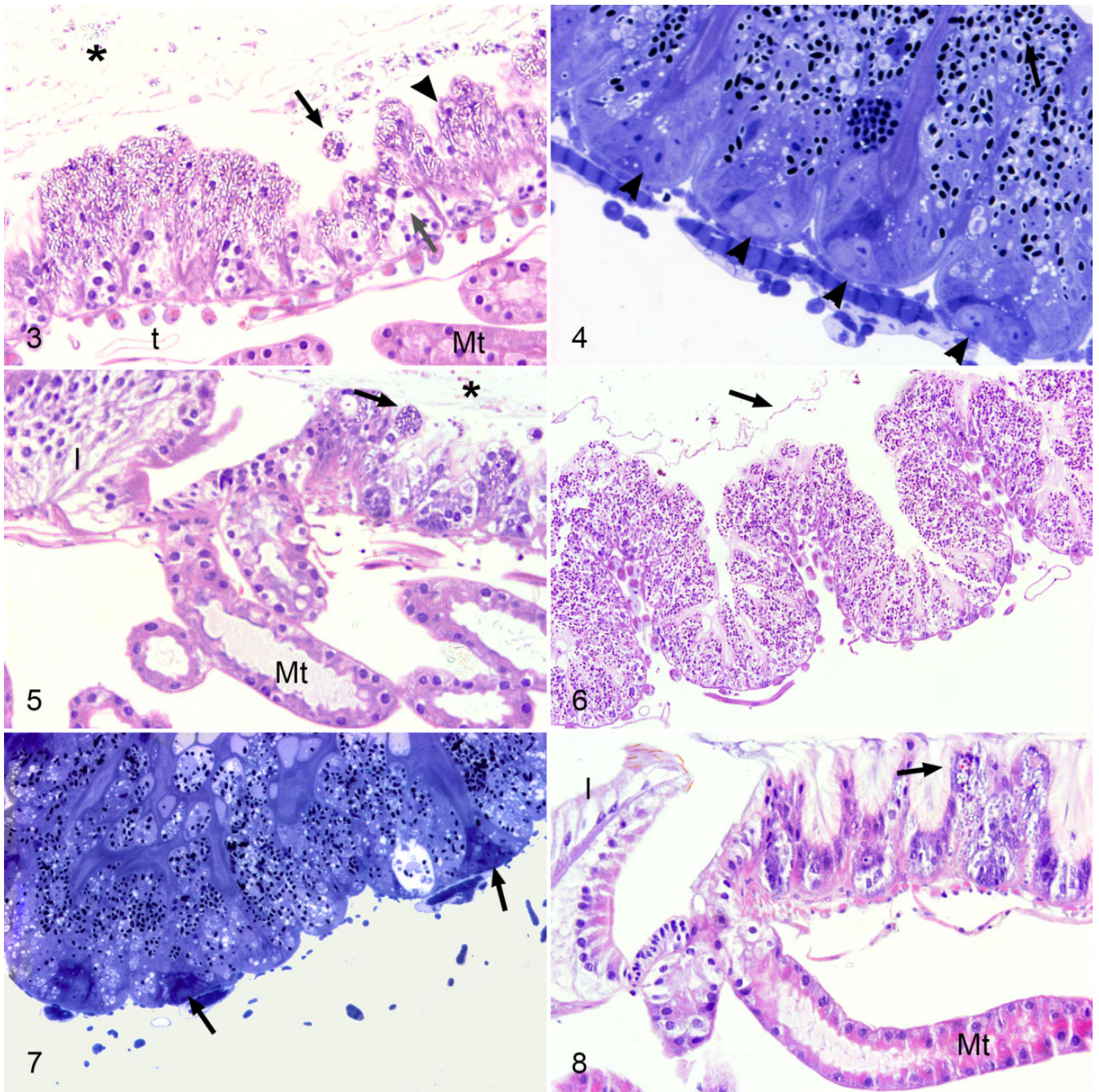
for both *Nosema* species, whose different life cycle stages were distributed extensively in the ventricular epithelium.

In the bees of the C5 and C10 groups, most epithelial ventricular cells were heavily infected and had expanded cytoplasm with a brightly stained and apically displaced nucleus. There were frequent remnants of secreted globules full of mature spores as well as free mature spores in the ventricular lumen. In addition, the peritrophic membrane often appeared broken and fragmented (Fig. 3). By contrast, the circular and longitudinal musculature of the midgut was free of microsporidia and was morphologically unaltered (Fig. 3).

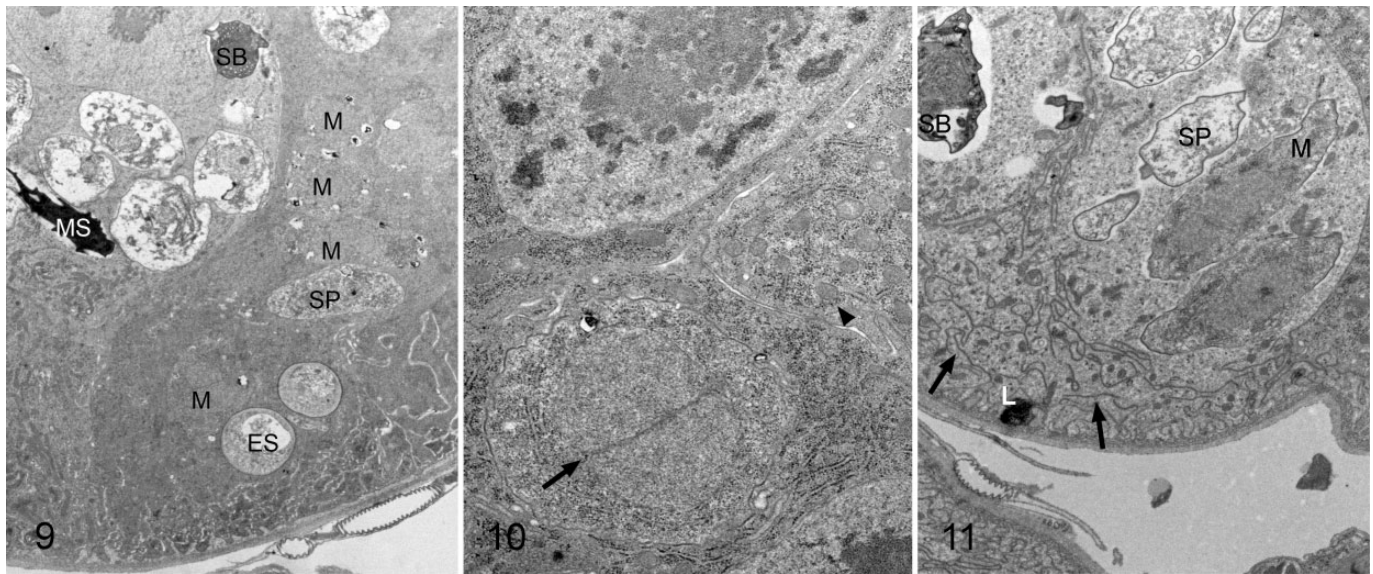
There was a predominance of basophilic mature spores in the epithelial cells at the tips of the folds. Conversely, the cells at the bottom of the folds, even those in clusters of regenerative cells, contained fewer basophilic but larger stages, indicating they contained spores in more vegetative stages (Fig. 4). A smaller number of infected ventricular epithelial cells were observed in the regions of insertion of the Malpighian tubules, although in no case were any microsporidia observed in the epithelial cells of the tubules (Fig. 5). Similar histological results were observed for groups A5 and A10 (Figs. 6–8).

Transmission Electron Microscopy

Ultrastructural examination of the ventricular parasitized cells from the bees in groups C5, C10, A5, and A10, and even of the clusters of regenerative cells, identified parasitic structures corresponding to different stages of the life cycle, such as meronts, sporonts, or mature and empty spores (Fig. 9). No differences were observed between *N. apis* and *N. ceranae* infection. All stages of the *N. apis* and *N. ceranae* life cycle had diplokaryotic nuclei, although sometimes mitochondria were grouped around it (Fig. 10). Both the epithelial ventricular cells and the clusters of regenerative cells had electrolucent cytoplasmic vacuoles,



Figures 3–8. *Nosema apis* (Figs 3–5) and *Nosema ceranae* (Figures 6–8) experimental infections, ventriculus (midgut), worker honeybees. Images of infected worker honey bees (*Apis mellifera*) with different doses of fresh *N. ceranae* (Figs. 3–5) and *N. apis* (Figs. 6–8) spores. **Figure 3.** Infection with 50 000 *N. ceranae* spores, 15 days postinfection (dpi). Epithelial cells are heavily infected with *N. ceranae*. There is a peritrophic membrane (asterisk) in the lumen, as well as limited regenerative nests within the niches of the epithelial folds. Cytoplasmic droplets full of spores protrude into the lumen (upper arrow). Some epithelial cells show moderate vacuolization (lower arrow), and others have a pyknotic, apically displaced nucleus (arrowhead). At the periphery, a thin layer of slender myocytes is visible, as well as some tracheae (t) and Malpighian tubules (Mt). Hematoxylin-eosin (HE). **Figure 4.** Infection with 100 000 *N. ceranae* spores, 10 dpi. Heavily infected tissue with tightly packed parasites. There are darkly stained mature spores in the apical region of the epithelial cells (arrow) and larger heterogeneously stained parasitic structures (arrowhead) at the bottom of the folds and basal regenerative cells, suggesting different life cycle stages. Methylene blue. **Figure 5.** Infection with 100 000 *N. ceranae* spores, 10 dpi. Pyloric region and the opening of the Malpighian tubules into the ileum where the epithelial cells (arrow) and lumen (asterisk) of the ventriculus contain *N. ceranae* spores. Uninfected epithelial cells are present in both the ileum (l) and Malpighian tubules (Mt). HE. **Figure 6.** Infection with 50 000 *N. apis* spores, 10 dpi. Heavily infected epithelial cells with different intracellular parasite stages and a peritrophic membrane (arrow) in the lumen. HE. **Figure 7.** Infection with 100 000 *N. apis* spores, 7 dpi. Numerous



Figures 9–11. *Nosema apis* (Fig. 9) and *Nosema ceranae* (Figs. 10, 11) experimental infections, ventriculus (midgut), worker honeybees. Transmission electron microscopy. **Figure 9.** Infection with 100 000 *N. apis* spores, 7 days postinfection (dpi). There is a cluster of regenerative cells next to the basal infolds parasitized with different parasitic stages: meronts (M), sporont (SP), sporoblast (SB), mature spores (MS), and empty spores (ES). Magnification: 8000 \times . **Figure 10.** Infection with 100 000 *N. ceranae* spores, 7 dpi. A host cell carries a meront with a diplokaryotic nucleus (arrow), surrounded by rough endoplasmic reticulum and numerous host cell mitochondria (arrowhead). Magnification: 30 000 \times . **Figure 11.** Infection with 50 000 *N. ceranae* spores, 7 dpi. Parasite host cell with 2 meronts (M), some sporonts (SP), and 1 sporoblast (SB), surrounded by a discontinuous and a disorganized rough endoplasmic reticulum (arrows) with a few loose ribosomes. Moderate cell swelling and a secondary lysosome (L) are present. Magnification: 12 000 \times .

lysosomes, and a fragmented and disorganized rough endoplasmic reticulum (RER), signs of cell degeneration (Fig. 11).

Discussion

To define the tropism of *Nosema spp.* for extraventricular locations, we have carried out what we believe to be the first histopathological LM and TEM study of different organs and tissues from honey bees artificially infected with these microsporidia and reared under controlled conditions. It is generally accepted that the ventriculus represents the specific target organ of *N. apis*,¹² and although it has been proposed that spores belonging to this species might also affect honey bee glands or hemolymph,^{39,40} histological confirmation of this has yet to be published.

In recent experiments on naturally infected hybrid *A. mellifera* worker bees from Canada, *N. apis* and *N. ceranae* were apparently detected by quantitative PCR in the intestinal tract, venom sac, and several exocrine glandular structures, either alone or in combination,⁷ although no histological studies were performed on these organs. The ability of *N. ceranae* to infect organs outside the digestive system has also been studied in

naturally infected European honey bees reared in Maryland.⁶ *N. ceranae* proliferation was evident in epithelial cells of the ventriculus, but despite positive PCR signals, this microsporidium was not observed directly in other parts of the alimentary canal, Malpighian tubules, hypopharyngeal and salivary glands, or fat body. The authors of this latter study only showed TEM images of parasitized ventricles, similar to those published previously,²⁰ and did not present images of parasitized clusters of regenerative cells like the ones presented here.

On the other hand, pathways essential for controlling renewal of the ventricular epithelium have been seen to be perturbed by *N. ceranae* infection,^{9,32,34} and the fact that clusters of regenerative cells were not parasitised³⁴ suggests an indirect effect of the infection at the level of these clusters and on reepithelization.³⁴ Therefore, our data suggest a novel mechanism of disease induced by *Nosema spp.*, and it would be the first detection of direct infection at this level in the ventricular epithelium.

Tissue tropism of *Nosema spp.* was also investigated in honey bees sampled as part of a large field survey in Germany,¹⁷ with spores detected by LM in smear preparations of the ventriculus. In those bees, it was also possible to detect

Figures 3–8. (Continued). epithelial cells and some clusters of regenerative cells (arrows) are infected with different stages of *N. apis*. There are darkly stained mature spores in the apical region of epithelial cells and heterogeneously stained parasitic structures (immature or vegetative stages) at the bottom of the folds and in the regenerative cells. Methylene blue. **Figure 8.** Infection with 100 000 *N. apis* spores, 7 dpi. At the opening of the Malpighian tubules (Mt) into the ileum, *N. apis* spores are present in the epithelial cells (arrow) of the ventriculus, while uninfected epithelial cells are evident in both the ileum (I) and Malpighian tubules (Mt). HE.

N. ceranae in the hypopharyngeal glands, brain, Malpighian tubules, and fat body by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), although again, no histological images of these organs were shown. Extraventricular infection was inferred from the detection of *N. ceranae* DNA, yet specific life stages of the pathogen were not directly observed in the specimens examined.

Our results are consistent with those obtained previously in honey bees that were artificially infected with *N. apis* or *N. ceranae* and reared under controlled laboratory conditions. The organs from those bees were dissected out under special conditions to prevent contamination, and small tissue samples were smeared onto slides and examined by LM.²⁶ In that case, spores of both microsporidia were found only in the alimentary tract and not in the brain; hypopharyngeal, salivary, and venom glands; fat body; Malpighian tubules; and hemolymph collected from the head or abdomen. Histological images were not shown in that study since the methodology used to study these tissues impeded this. Significantly, *Nosema* DNA was detected in several cases by PCR in that study, and indeed, surface contamination of dissected organs was reported, while stricter measures to prevent contamination in *N. ceranae*-infected bees resulted in a PCR signal below the threshold of reliable detection. Careful dissection technique is essential when analyzing these parasites,⁷ although we argue that this cannot rule out contamination during sample preparation, which might produce false positives when very sensitive analytical methods are used (eg, PCR). Spore leakage from fragile, infected intestinal tissue and their association with external dissected organs may be problematic when contamination-free isolates are required.²⁶ Thus, morphologic identification of the parasites within the tissue is essential to confirm or refute tissue tropism.

The fact that 2 controlled laboratory experiments failed to detect damage or different stages of the *Nosema* pathogen's life cycle, in organs outside the alimentary canal, seems to indicate these parasites are highly specific to the ventricular epithelium, reflecting a lack of tropism for other tissues.²⁶ The lesions observed in ventricular epithelial cells and in the clusters of regenerative cells were similar following *N. apis* and *N. ceranae* infection. Moreover, no evidence of alternative target organs for these pathogens was obtained, confirming a similar tissue tropism of the 2 species. Nevertheless, the disease produced by these 2 causative agents is quite dissimilar at the individual bee and colony levels.^{23,25,29} *N. apis* is known to induce diarrhea in infected individuals, which is involved in the transmission of infection,^[13] yet this does not occur following *N. ceranae* infection.^{3-5,19,21,22} Thus, the notable histopathological similarity between the 2 infections contrasts with the profound differences in clinical signs and transmission, highlighting the need for further research to elucidate the differences in the pathogenic mechanisms that are associated with these 2 honey bee microsporidia.

Acknowledgements

The authors thank J. Almagro, J. García, V. Albendea, C. Uceta, M. Gajero, and T. Corrales from the Laboratorio de Patología Apícola,

Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), IRIAF, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, for their technical support. The authors also thank the National Center for Electron Microscopy (ICTS) at the UCM (Complutense University of Madrid) for their help in obtaining the electron microscopy images. The authors also wish to thank the anonymous reviewers and editors, whose comments have substantially improved the manuscript.



Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by funds from INIA-FEDER (National Public Research Project RTA2013-00042-06).

ORCID iD

Mariano Higes  <https://orcid.org/0000-0001-7338-5851>
Antonio Nanetti  <https://orcid.org/0000-0002-1655-6754>

References

- Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;**59**(5):429–514.
- Bass D, Czech L, Williams BAP, et al. Clarifying the relationships between *Microsporidia* and *Cryptomycota*. *J Eukaryot Microbiol.* 2018;**65**(6):773–782.
- Borneck R, Viry A, Martín-Hernández R, et al. Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *J Apic Res.* 2010;**49**(4):334–336.
- Bravo J, Carbonell V, Valdebenito JT, et al. Identification of *Nosema ceranae* in the Valparaíso district, Chile. *Arch Med Vet.* 2014;**46**:487–491.
- Cepero A, Ravot J, Gómez-Moracho T, et al. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Res Notes.* 2014;**7**:649.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, et al. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J Eukaryot Microbiol.* 2009;**56**(2):142–147.
- Copley TR, Jabaji SH. Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *J Appl Microbiol.* 2012;**112**(1):15–24.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off J Eur Union.* 2010;EN:L276/33.
- Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, et al. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One.* 2012;**7**(5):e37017.
- Eiri DM, Suwannapong G, Endler M, et al. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS One.* 2015;**10**(5):e0126330.
- Forsgren E, Fries I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet Parasitol.* 2010;**170**(3–4):212–217.
- Fries I. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *EDP Sci.* 1988;**19**(3):319–328.
- Fries I. *Nosema apis*—a parasite in the honey bee colony. *Bee World.* 1993;**74**: 5–19.
- Fries I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol.* 2010;**103**(suppl 1):73–79.
- Furgala BF, Mussen EC. Protozoa. In: Morse RA, Nowogrodzki R, eds., Cornell University Press, 1990.
- García-Palencia P, Martín-Hernández R, González-Porto AV, et al. Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res.* 2010;**49**(3): 278–283.

17. Gisder S, Hedtke K, Möckel N, et al. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl Environ Microbiol.* 2010;**76**(9):3032–3038.
18. Goblirsch M. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie.* 2018;**49**:131–150.
19. Hatjina F, Tsoktouridis G, Bouga M, et al. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *J Invertebr Pathol.* 2011;**108**(2):131–134.
20. Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, et al. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol.* 2007;**94**(3):211–217.
21. Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol.* 2008;**10**(10):2659–2669.
22. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, et al. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep.* 2009;**1**(2):110–113.
23. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, et al. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie.* 2010;**41**:375–392.
24. Higes M, Martín R, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol.* 2006;**92**(2):93–95.
25. Higes M, Meana A, Bartolomé C, et al. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ Microbiol Rep.* 2013;**5**(1):17–29.
26. Huang WF, Solter LF. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J Invertebr Pathol.* 2013;**113**(1):35–41.
27. James TY, Pelin A, Bonen L, et al. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite *Cryptomycota* and microsporidia. *Curr Biol.* 2013;**23**(16):1548–1553.
28. Martín-Hernández R, Aránzazu Meana, García-Palencia P, et al. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl Environ Microbiol.* 2009;**75**(8):2554–2557.
29. Martín-Hernández R, Bartolomé C, Chejanovsky N, et al. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years post-detection perspective. *Environ Microbiol.* 2018;**20**(4):1302–1329.
30. Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, et al. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol.* 2012;**14**(8):2127–2138.
31. Martín-Hernández R, Botías C, Barrios L, et al. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol Res.* 2011;**109**(3):605–612.
32. Martín-Hernández R, Higes M, Sagastume S, et al. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS One.* 2017;**12**(2):e0170183.
33. Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, et al. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;**73**(20):6331–6338.
34. Panek J, Paris L, Roriz D, et al. Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol.* 2018;**159**:121–128.
35. Paxton RJ, Klee J, Korpela S, et al. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *EDP Sci.* 2007;**38**(6):558–565.
36. Roberts KE, Evison SEF, Baer B, et al. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Sci Rep.* 2015;**5**:1–7.
37. Rodríguez M, Vargas M, Antúnez K, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biobío region of Chile and their association with other honey bee pathogens. *Chil J Agric Res.* 2014;**74**(2):170–177.
38. Smith ML. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS One.* 2012;**7**(8):e43319.
39. Sokolov VP, Grobov OF. *Nosema spores in the hemolymph of the bee.* *Pche-lovodstvo.* 1963;**7**:39.
40. Steche WA. Ätiologie und therapie der nosematose der honigbiene. *Zeitschr F Bienenforsch.* 1960;**5**:49–92.
41. Traver BE, Fell RD. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J Invertebr Pathol.* 2011;**107**(1):43–49.
42. Zander E. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Leipziger Bienenztg.* 1909;**24**:147–150, 164–166.

Article

Age and method matter when studying experimentally infected *Nosema ceranae* worker honey bees (*Apis mellifera*)

Almudena Urbietta-Magro ¹, Mariano Higes ¹, Aránzazu Meana ², Laura Barrios ³ and Raquel Martín-Hernández ^{1,4,*}

¹ Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo, Guadalajara, Spain; aurbieta@uclm.es (A.U.); mhiges@jccm.es (M.H.)

² Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain; ameana@uclm.es

³ Statistics Department, Computing Center SGAI-CSIC, Madrid, Spain; laura.barrios@csic.es

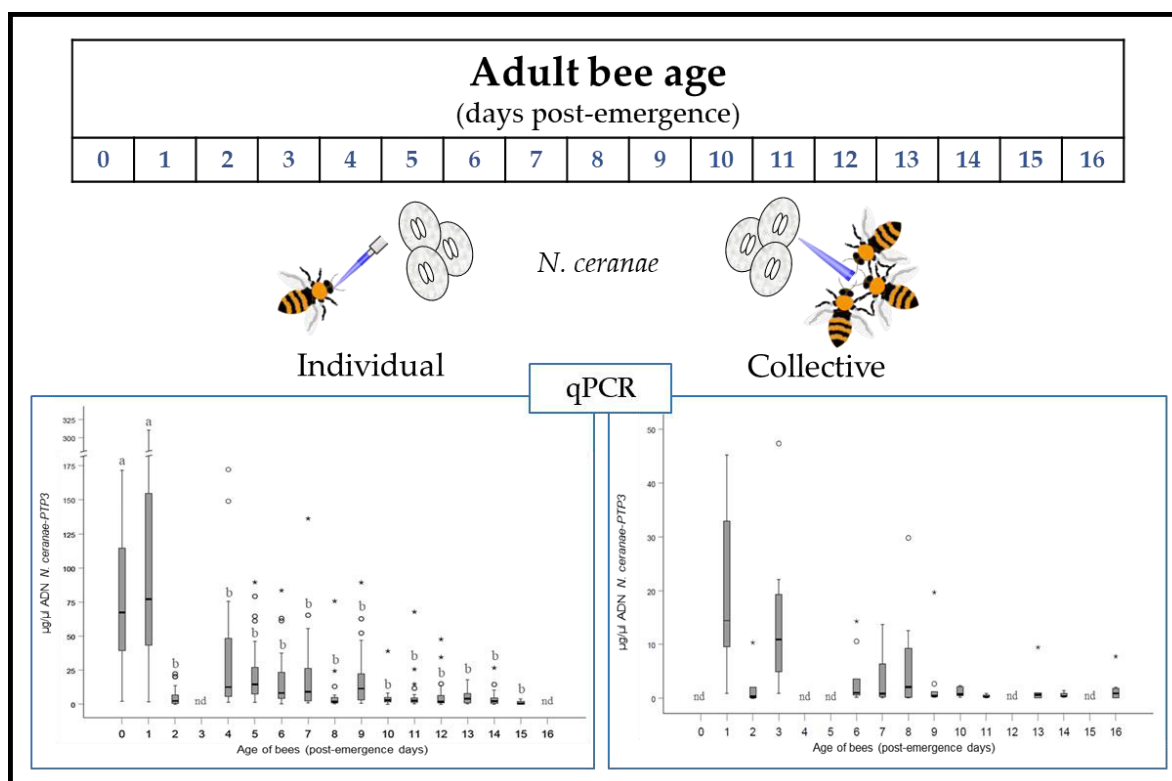
⁴ Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT-FEDER), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Castilla – La Mancha, Spain

* Correspondence: rmhernandez@jccm.es

Received: 31 July 2019; Manuscript ID: insects-574839

First revision: 15 August 2019; Manuscript ID: insects-574839

Graphical Abstract:



Abstract: The microsporidian parasite *Nosema ceranae* is a highly prevalent, global honey bee pathogen. *Apis mellifera* is considered to be a recent host for this Microsporidia, which raises questions related to its effect on its host's physiology, behaviour and longevity, at both the individual and colony level. As such, honey bees were individually (Group A) or collectively (Group B) inoculated with fresh purified spores from 0 to 15 days post-emergence (p.e.) to evaluate the effect of bee age and the method of spore inoculation at 7 days post-infection. The level of infection was analysed individually by qPCR by measuring the relative amount of the *N. ceranae* polar tubule protein 3 gene (*PTP3*). The results show that bee's age and the method of infection directly influence parasite load, and thus, early disease development. Significant differences were found regarding bee age at the time of infection, whereby the youngest bees (new-born and 1 day p.e.) developed the highest parasite load, which decreased dramatically in bees infected at 2 days p.e. before increasing again in bees infected at 3-4 days p.e. The parasite load in bees infected when older than 4 days p.e. diminished as they aged. When the age cohort data was pooled and grouped according to the method of infection, a significantly higher mean concentration and lower variation of *N. ceranae* infection was evident in Group A, indicating greater variation in experimental infection when spores were administered collectively to bees through their food. These data indicate that both biological and experimental factors should be taken into consideration when comparing data published in the literature.

Keywords: *Apis mellifera*; *Nosema ceranae*; host-parasite interactions; age of infection; epidemiology; method of infection, parasitic load.

1. Introduction

Beekeeping is a primary sector practice aimed at producing nutritive and healthy products for human consumption [1,2], as well as contributing significantly to the preservation of global biodiversity as a pollinating service [2,3]. One of the major threats to *A. mellifera* honey bees are transmissible diseases [4,5]. To this regard, the microsporidian parasite *Nosema ceranae* is highly prevalent globally [6–11] and it is associated with colony losses and weakness, especially in the temperate areas of the Mediterranean [6,12,13].

This microsporidia is a unicellular obligate parasite that infects the bee's digestive tract [14]. Infection occurs after ingestion of mature spores in food or water, mainly transmitted by trophallaxis [15] or via the faecal-oral route (faecal waste cleaning) in infected nests [16,17]. Once infection occurs, the parasite proliferates inside the ventricular cells, causing morphological and physiological changes [17–20], and epithelial degeneration [18,20]. By exploiting the host cell's machinery to obtain resources, *N. ceranae* infection ultimately causes cell lysis [21] and digestive disorders, provoking

changes in vital functions and modifying the host's immune response, and significantly compromising the survival of infected bees [22–29]. This pathogen also affects aspects of honey bee neurobiology, such as olfactory learning and memory [30], and the orientation and homing skills of workers [31], accelerating bee aging and related tasks [32–34].

Many factors may influence the pathogeny (course and development) of *N. ceranae* infection such as genetic diversity of honey bees [25,35,36]; beekeeping practices [37–39]; and climatic and environmental differences [40–43]. Other factors that could influence the development of the infection could be the age of the bees, the means of transmission and the source of spores, and for those assays developed at laboratory also the conditions of the assay including the duration of the experiment, temperature, method of infection, humidity, source and type of food, type of cages, number of bees in the cages, wax access, queen hormone, etc. [11].

Regarding bee age, there is very limited information about its influence on *N. ceranae* infection. Studies developed under field assays have demonstrated that older worker bees are the more infected [44–46]. In contrast, younger queens were found to be more susceptible than older ones after inoculation of *N. ceranae* spores at laboratory [47]. However, the information about the susceptibility of worker bees to the infection by this microsporidium is lack. Actually, bee age influences the pathophysiology of bees, [48] and age and caste determine the replicative activity of intestinal stem cells in *A. mellifera* [49].

Consequently, we aim to study if the age of worker bees at the moment of exposition to *N. ceranae* infection had any influence in the development of the infection. Also, as in apiculture science and insect pathology, most studies are performed in laboratory cages under controlled settings [50], essentially due to the difficulties in controlling the variables in open field studies [5,11,34,50–52], we evaluate the method of bee inoculation with *N. ceranae* spores in the success of the infection.

2. Materials and Methods

2.1. Source of bees and rearing conditions

The experiments were conducted in August-September 2017. To minimize potential colony-level effects on experimental results [50], frames of capped brood were obtained from 5 healthy colonies of *Apis mellifera iberiensis* (Nosema-free confirmed by PCR; [81,82]) located in an experimental apiary 20 km from the “Centro de Investigación Apícola y Agroambiental” (CIAPA) in Marchamalo (Castilla-La Mancha). The frames were kept in an incubator at 34 °C (± 1 °C) to provide a supply of newly emerged *Nosema*-free honey bees over 15 days. All new-born worker bees were removed from the brood combs daily, they were carefully confined to steel mesh cages [55] in groups of 20 and they were kept in a different incubator (33 °C ± 1 °C) until infection. The age of the bees (days post-

emergence: p.e.) was recorded and all the bees in a cage were of the same age (age cohort). The bees were fed *ad libitum* with a freshly prepared sucrose solution (50% w/w in dH₂O) combined with 2% Promotor L[®] (Calier Lab.), a commercial mixture of amino acids and vitamins. Honey and pollen were not used to feed the bees to avoid any possible contamination [56] with infective *Nosema* spp. spores and to avoid problems of standardization. Dead bees were removed daily from the cages and in this way, cages with bee cohorts from 0 to 15 days p.e. were available for *Nosema*-spore inoculation at almost all times.

2.2. *N. ceranae* spores

Fresh spores were isolated two days before their use from around 200 heavily infected *A. m. iberiensis* bees collected from 3 naturally infected colonies at CIAPA (see the detailed procedures in Higes *et al.*, [57]). Briefly, groups of 30-40 bees were macerated in dH₂O (PCR quality) for 120 seconds at low speed (Stomacher 80-Microbiomaster[®]) in a filter bag (Seward, BA6040). The macerate was centrifuged for 6 minutes at 800 g and the pellet was purified by gradient separation [58] on 95% isotonic Percoll[®] (in dH₂O) at a ratio of 1:9 (spores-pellet:Percoll), centrifuging at 11,000 g for 40 minutes. Subsequently, the clean spores were washed three times and recovered by centrifugation at 800 g for 6 minutes, decanting the supernatant between washes and resuspending the sediment uniformly in 1 ml sterile ddH₂O. The *Nosema* species the spores corresponded to was confirmed by PCR, as described previously [53,54], and the mean *N. ceranae* spore concentration was obtained by counting the purified spores four times using a Neubauer[®] haemocytometer on a light microscope [87]. The final spore concentration was established as 57,000 spores μl^{-1} and the stock spore solution was then immediately divided into aliquots (50 μl , spore inoculum), storing the vials at room temperature in darkness until they were used two days later.

2.3. Infection experiments: Group A and Group B

Two assays were carried out in parallel. In the first assay the bees were infected individually (Group A) and in the second assay, the bees were infected collectively (Group B). Each age cohort (n=80, 20 bees per cage) from days 0-15 p.e. was assigned to 4 cages. From each age group, 3 cages were used for the individual infections (Group A) and the fourth cage was used for the collective infection (Group B). In addition, cages with bees of different ages were available (n = 300 bees) for use as a control groups; Group CA and Group CB for Group A and Group B, respectively. These control groups were used to ensure the absence of initial infection.

Both assays were designed so that infections were only performed on two different days, allowing the bees of different ages and of the two infection methods to be inoculated on the same day, so that no bias was introduced by aliquot or spore conservation. The bees of the control group were the last ones to be manipulated after inoculating the study groups at both times of infection.

All infections took place after bees were starved for 2 h and anesthetized by a 90 sec exposure to CO₂ for easy manipulation. Regardless of the method of infection, all the bees were inoculated with 114,000 *N. ceranae* spores to promote rapid multiplication that could be detected in the breeding conditions employed [25,33,40,46,47,51,60–63].

2.3.1. Group A: individual infection of bees at different ages

Bees from the Group A (3 cages of 20 bees from each age cohort) were individually held by the wings and when they started to wake up, they were administered a 2 µl drop of the spore solution (57,000 spores µl⁻¹) using a micropipette [64]. The spore solution was vortexed after every third bee to ensure the suspension remained uniform.

In this assay, bees aged 0 to 15 days p.e. were inoculated (except for those on day 3 that were not available). A control group of bees was included from 0, 1, 4, 5, 8, 11, 13 and 14 days p.e. (1 cage of 20 bees per age), which were fed individually with 2 µl of water without spores. Bees that did not consume the entire water droplet were discarded and a cardboard barrier was used to physically separate the cages of the different cohorts, avoiding contact between the bees of different ages in the same incubator (Memmert® Mod. IPP500). Infected and uninfected groups of bees were kept in separate incubators under the same conditions (darkness, 33 ± 1 °C and 80% R.H.). The age cohorts and number of bees used in the study are shown in Table 1.

Age cohort	Experimental Design																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Group A	90	60	60	-	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	-
Group CA	20	20	-	-	20	20	-	-	20	-	-	20	-	20	20	-	-
Group B	-	20	20	20	-	-	20	20	20	20	20	20	-	20	20	20	20
Group CB	-	20	-	-	-	-	-	20	20	-	20	20	-	-	20	-	-

Table 1. Total number of bees in each cohort and infection group. Group A, individually infected bees (n= 20 bees x 3 cages) and Group B, collectively infected bees (n= 20 bees x 1 cage): Uninfected control Groups: CA (individually feed with plain sucrose solution) and CB (collectively fed with the plain sucrose solution). Hyphen (-) indicates bees not available. The bees that died were removed from the study.

2.3.2. Group B: collective infection of groups of bees at different ages

In parallel to the previous assay, a cage of each age group of bees (from 0 to 15 days p.e.) was used to inoculate bees using the collective method (Group B). For this purpose, a syrup solution containing purified spores was prepared (using the same final inoculum as in the previous assay) at an equivalent dose of $5,700 \mu\text{l}^{-1}$ spores in 400 μl of fresh syrup per 20 bee cage, assuming that each bee consumes 20 μl of food per day and that all bees consume the same amount. On the day of inoculation (spore administration), the feeders of all the Group B cages were replaced for 24 hours with feeders containing the sucrose solution with the spores. Complete consumption of the food administered was verified after 24h, such that the minimum age of the bees at the time of infection was considered as 1 day p.e. and thus, a cohort of 0 days was not available for the assay of Group B (Table 1). The food was then replaced with sporeless syrup (sucrose solution), which was administered *ad libitum* thereafter. In addition, to determine the absence of initial infection, control bees of 1, 7, 8, 10, 11 and 14 days p.e. that were not inoculated with spores were also included, 1 cage of 20 bees of each age that received 400 μl of fresh syrup without spores. In this trial, no bees aged 4, 5 and 12 days p.e. were available. The cages with infected bees were kept in an incubator distinct to that used for Group A and again, physically separated to avoid cross-infection. The cages with uninfected bees were kept in a different incubator next to the cages with uninfected bees of Group A.

2.4. Molecular detection of *N. ceranae* infection (DNA extraction and qPCR analysis)

On day 7 after inoculation, the number of surviving bees was recorded and they were frozen at -20°C . When available, 10 bees were taken from each Group A (30 bees per cohort) and Group B (10 bees per cohort) cage. The bee's abdomens were carefully separated from the thorax and they were placed individually in one well of a 96-well plate, each well containing four 2 mm glass beads (Sigma[®]) and 180 μl of sterile H₂OmiliQ[®] to homogenize the tissue by stirring at 30 Hz for 6 minutes (TyssueLyser II, Qiagen[®]). DNA was extracted from the resulted macerate and 50 μl was transferred on ice to a new multi-well plate (Eppendorf[®]) containing 50 μl of a Tris-HCl lysis solution (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) and 15 μl of Proteinase K (Qiagen[®], No. 1019499). The plates were incubated for 20 min at 95°C in a *Mastercycler ep gradient S* (Eppendorf[®]). A well with no sample was left between the bees from different cohorts and used as an DNA-extraction control (with H₂OmiliQ[®] and all the reagents: EC). *Nosema ceranae* was assessed by quantitative real time-PCR (qPCR) to detect DNA from the gene of the *polar tubule protein 3* (*PTP3* [54]) in a Roche LightCycler[®] 480 thermocycler. The qPCR was performed in 384 plates and in a final reaction volume of 10 μl , using the LightCycler[®] 480 Probes Master Mix (Roche) according to the manufacturer's instructions: primers at 500 nM and universal probes at 10 nM (UPL, Roche[®]). Each amplification cycle was analysed with the

LightCycler® 480 software v1.5.1 (Roche Diagnostics) and the crossing point (Cp) was recorded in all samples. Two replicates for each sample were included in the same kinetic qPCR run (intra-assay variation). The Cp value was calculated for each qPCR reaction from the standard curve using the second maximum derivative method.

The parasitic load was quantified in all samples relative to the specific synthetic oligonucleotides (*gBlocks*®, IDT DNA Technologies) of the *N. ceranae* *PTP3* gene fragment (the sequence of the *PTP3 gBlock*® *Gene Fragment* is shown in Table 2), designed using the *gBlock*® *Gene Fragment* ordering tool. Non-variable areas of the gene were selected based on the sequence data available in GenBank and our in house database [65]. The standard curve for quantification was prepared following the manufacturer's protocol at an initial concentration of 10 ng/μl (in TE) and using serial dilutions up to 1 x10⁻¹⁴ ng/μl.

Method	Organism	<i>PTP3 gBlock</i> ® <i>Gene Fragment</i>	Source
qRT-PCR	<i>N. ceranae</i>	5'_TGAAGCTAAAAAAGAAGAACAACACTTGACCAAATAGCTAAA AAGAATGCAGAGACAGAGAAACAACACAGAGAGGTTACTTCTC AAAGAACATCAAGA TGCTGATGTTATGGCTACAGAAG AAAAG ACTTGCTAAAAATAATAGAgccaggaaGATTAGTGAGGCAGGAAT TAAAGCAGCGCAATCTGTA TTGAAAACCTGGAGGAACAATAGA AGAAGCAAGAGCAGCTAAGGCGGCAGCTGAAAAAGCTATATT GCAAGAAATTGAGAGTAGAGAAGCGCAAA_3'	gi 5577908 04 gb KC5 20145.1

Table 2. *PTP3 Block*® *Gene Fragment*. A 281 nucleotide fragment of the *N. ceranae* genome including the NC-PTP3 primer sequences (underlined in bold), and the sequence of the UPL#72 probe in bold and lowercase.

To detect possible contamination in each qPCR reaction, the extraction controls (EC) and non template controls (NTC) were analysed in parallel in the same reaction plate. In addition, a positive control with DNA from *N. ceranae* extracted from naturally infected bees was included in each reaction to detect possible amplification failures.

2.5. Statistical analysis: *N. ceranae* infection according to bee age and the mode of infection

The average infection of *N. ceranae* was calculated in all the available bee cohorts and for each study group (Table 1) based on the average concentration value of the *N. ceranae-PTP3* gene at 7 days post-inoculation (d.p.i.). Each age cohort tested included 30 bee abdomens analysed individually (Group A) and 10 bee abdomens (Group B) analysed in the same way.

To evaluate the possible effect of age and the method of infection on the level of infection of each group of bees tested, generalized linear models (GLMs) were used. The GLMs allow modelling

variables that do not meet the requirements to use standard linear models (i.e. normality and homoscedasticity; Levene's Test), allowing the modelling of variables that follow distributions other than a Normal distribution. In this study, the distribution that best fit the response variable -average DNA concentrations of *N. ceranae*- was considered to be the Gamma distribution (GLMz log link function).

Firstly, to determine whether the "cage" (random factor) significantly affected the level of infection within age cohort (fixed factor) in Group A (3 cages per age cohort) a Generalized Linear Mixed Models (GLMMz) was used.

The infection levels were then compared in three different ways: a) to evaluate the effect of the age cohort, the method of infection and their interaction in the study (Group A and Group B) by GLMz; b) between different age cohorts within the same assay (Group A or Group B) by Mann-Whitney-U Test; and c) between both assays (Group A vs Group B) comparing the pooled data (n=423 and n=108 for Group A and B, respectively) also by Mann-Whitney-U Test.

P values <0.05 were considered significant and all statistical analyses were carried out using the IBM SPSS Statistics V24 software in the Statistics Unit of the Scientific Computing Area at the SGAI-CSIC in Madrid

3. Results

All the bees used in the study were negative for *Nosema spp.* infection at birth, as all bees in the control groups (Group CA: n=46; Group CB: n= 17) were negative for *Nosema spp.* infection. Likewise, all the DNA extraction and PCR negative controls (EC and NTC) did not show any amplification, indicating that there was no cross-contamination during the molecular analysis. The sensitivity of the qPCR was 1×10^{-11} ng/ μ l of *N. ceranae*-PTP3 DNA and the number of bees analysed individually from each infection group (A and B) and from each age group is shown in Table 3.

Inoculation was more successful in the individually infected bees (n=424; 99.76%) than when they were infected collectively (n=130; 90%). In fact, virtually every bee individually exposed to the spores was infected (Group A), irrespective of their age, whereas there was considerably more variation in the rates of infection was found in Group B, with the lowest levels of infection detected in bees exposed to the spores 13 days p.e. and especially at 15 days p.e., when after 7 days of inoculation only one bee was infected (Table 3). By contrast, all bees were infected when they were inoculated at 16 days p.e.

Age cohort		Infected bees (7 d.p.i.)																
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Group A	n	30	30	24	-	30	30	30	30	21	30	30	30	30	30	30	19*	-
	qPCR+	30	29	24	-	30	30	30	30	21	30	30	30	30	30	30	19	-
	%	100	97	100	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-
Group B	n	-	10	10	10	-	-	10	10	10	10	10	10	-	10	10	10	10
	qPCR+	-	10	9	10	-	-	10	10	9	10	9	8	-	5	8	1	10
	%	-	100	90	100	-	-	100	100	90	100	90	80	-	50	80	10	100

Table 3. Number of bees and the percentage of bees infected by *N. ceranae* at 7 days post-inoculation (d.p.i.). Group A, bees infected individually with *N. ceranae* spores; (*) n <30 bees due to the high accumulated mortality of the bees at 7 d.p.i. Group B, bees infected collectively with the same spores. All control bees analysed (Group CA and Group CB) were negative and they are not shown in the table. qPCR + : indicates number of positive samples.

3.1. Level of infection in bees of different ages (Group A)

The average levels of infection of Group A bees was analysed, and as can be seen (Figure 1), the age of the bees at the time of exposure to the spores significantly influenced the level of infection developed at 7 d.p.i. (GLMz, Wald Chi-Square test; $P < 0.001$). The largest amount of DNA from the *N. ceranae*-PTP3 gene was obtained from bees infected at ages 0 to 24 hours p.e. There was a significantly weaker level of infection in bees exposed to the spores at 48 hours p.e. (Mann-Whitney test, $P \leq 0.05$), leading to a reduction in the parasite load ≈ 20 times that in the younger ones. The level of infection in bees exposed at 4 days p.e. again increased, although this increase was not associated with a significant rise in the parasitic load relative to the bees exposed to the spores on day 2 p.e., and the levels remained below those seen at all the remaining ages. The parasitic load remained low in the cohorts exposed between 4 and 9 days p.e. and the lowest levels were detected in infected bees exposed to the spores at more advanced ages, from 10 to 15 days p.e. Thus, there was an indirect trend towards lower levels of infection as the age of the bees increased, which was up to an order of magnitude lower than that of the immediately younger bees. The average concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) of the pathogen was statistically different between the bees of 0 and 1 days p.e. when compared to the rest of the cohort.

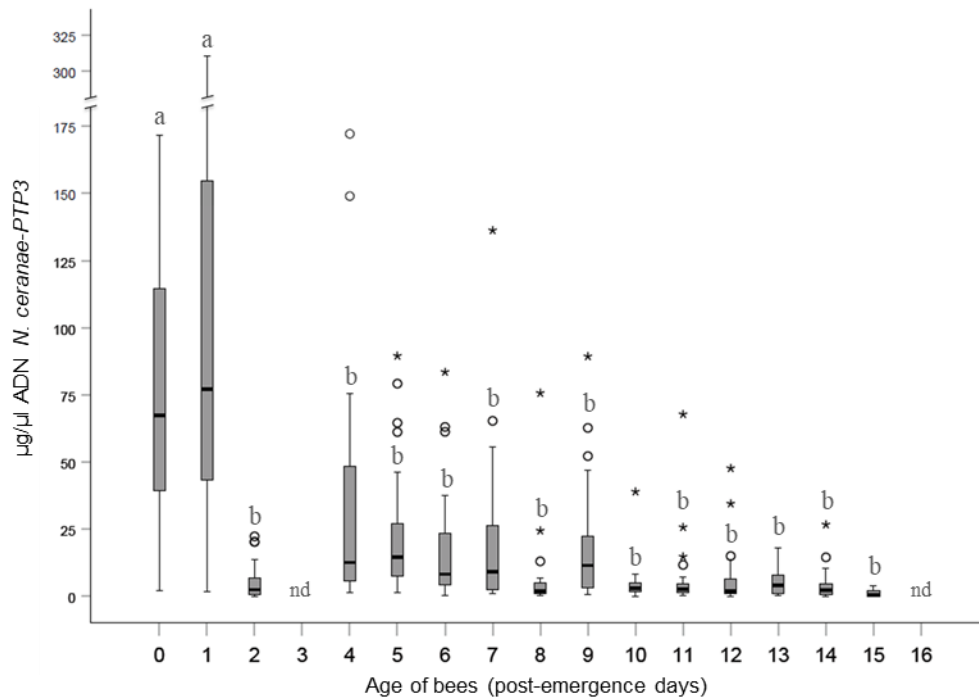


Figure 1. Average DNA concentration of the *N. ceranae*-PTP3 gene ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) at 7 days after individual infection of Group A bees. The letters indicate statistical significance $P < 0.05$ (Mann-Whitney-U Test): *, extreme cases; o, very unlikely cases.

The mean standard deviation observed in the cohorts studied was relatively high due to the large variation in the degree of parasitization between each individual bee within the same age group. The effect of the “cage” on the response was demonstrated to be not significant (GLMMz, Wald Chi-Square test; $P = 0.582$) and thus, the average DNA concentration of *N. ceranae* was not modified when the 30 values registered in bees of the same age were grouped.

3.2. Level of infection according to age and method of infection (Group A vs. Groups B)

When the average concentration of the *N. ceranae*-PTP3 gene DNA was assessed in all the collectively inoculated cohorts (Figure 2), the data confirmed the trend observed in the bees infected individually (Figure 1). So, the evolution of the infection in the Group B bees was very similar to those from Group A, and the effect of the interaction (age * method) was not significant (GLMz, Wald Chi-Square; $P = 0.75$). Accordingly, when bees the youngest were infected (1 day p.e.) they had more *N. ceranae* DNA than those bees that were exposed to the spores later in life, one day p.e. and older. Bees exposed to the parasite at 2 days p.e. developed microsporidium infection on average ≈ 8 times weaker than that of the bees exposed to the spores on 1 day p.e. The average parasitization detected in the bees infected at 3 days p.e. was higher than that of those infected on the previous day but not

higher than that registered in bees exposed to the parasite on day 1 p.e., and this level was maintained in the infected cohorts until 10 days p.e. The lowest average levels of infection were detected in the more mature bees that were exposed to the parasite from 11 to 16 days p.e. The bees of these ages again presented values an order of magnitude lower than those of the bees that were immediately younger, confirming the trend of infection whereby the amounts of *N. ceranae* DNA detected were smaller as the age of infection increased. In this group of collectively infected bees, the distribution of the average concentration was not statistically different among the inoculated bees at the different ages.

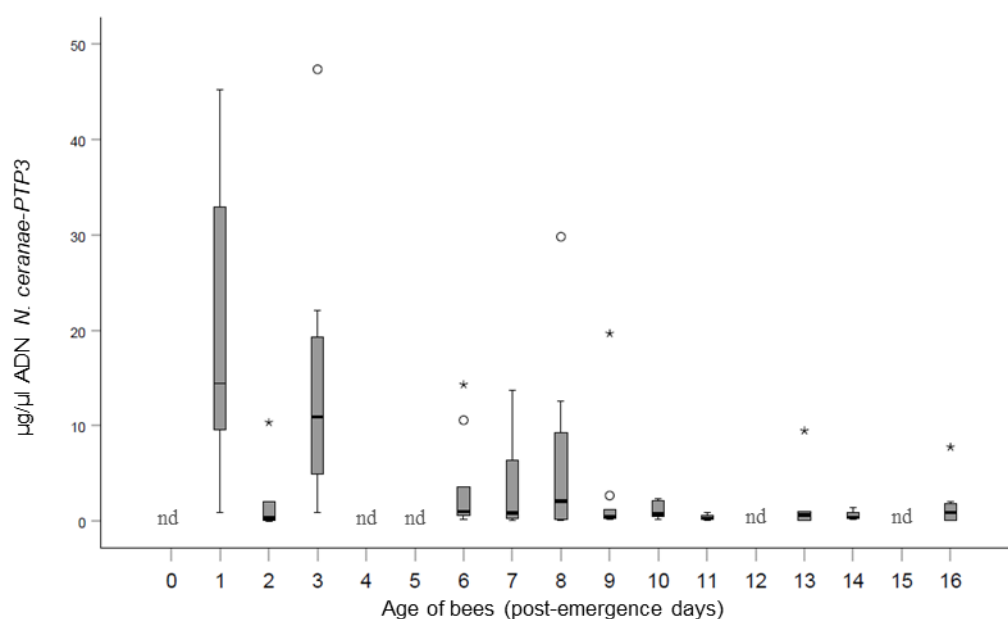


Figure 2. Average DNA concentration of the *N. ceranae*-PTP3 gene ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) at 7 days after the collective infection of the bees - Group B: *, extreme cases; o, very unlikely cases. As indicated, bees collectively provided with *N. ceranae* spores at day 0 p.e. were analyzed 24 h later (after consuming the contaminated food).

The levels of infection in Group A (Figure 1) were generally higher than those in Group B (Figure 2) when comparing the bees exposed to the spores at the same age. When the values were grouped according to the method of infection (Group A vs Group B), a significantly higher average concentration of microsporidia (Mann-Whitney-U Test; $P= 0.004$) was observed in the individually infected bees relative to those infected collectively. The largest amount of *N. ceranae* DNA in the entire study (7 d.p.i.) was observed in the bees infected individually at the age of 1 day p.e.

4. Discussion

The objective of this study was to assess how the age at the time of inoculation and the method used for it influence the parasite infection that develops by quantifying the *N. ceranae* parasitic charge, without analysing its effect on the viability of the bees. Accordingly, it was evident that both these factors, the age of the bee and the method of inoculation, affect the development of *N. ceranae* infection.

In this study, a dose of spores was administered that was expected to ensure 100% infection of the bees [25,60,63,66–68]. Spores from different naturally infected colonies were used to favour the natural heterogeneity of the regional population of *N. ceranae* [24,69,70]. The study design involved assessing infection at 7 d.p.i. to prevent the proliferation of spores to equal levels between all groups in a longer experiment [71] and to assess the infection at a specific time, before many of the bees have died from the infection [18,72]. Thus, we avoided the prolonged confinement that increases the levels of *Nosema spp.* infection [73] and bee mortality [18,72].

The results of this study demonstrate that the success of infection under controlled conditions in the laboratory and/or the ability of *N. ceranae* to multiply depend significantly on the age of the bees at the time of infection, and the method of spore administration. Young adult bees aged 0-1 day p.e. were especially susceptible to infection and the parasitic load at 7 d.p.i. was significantly higher following exposure to spores at those ages. A lower parasitic *N. ceranae* load was detected in bees infected at 2 days p.e., a trend that was observed in both study groups (individually and collectively infected). The differences in the level of infection of the bees of different ages cannot be attributed to the origin of the spores or bees, since all were fed with the same *N. ceranae* spore mixture and all came from the same breeding frames maintained in the laboratory for 15 days.

In agreement with our results, Chaimanee *et al.*, [47] showed that queen bees collectively infected at the age of 1 day p.e. were more susceptible to infection by *N. ceranae* and they developed significantly higher levels of infection than queens bees infected at 6 and 12 days p.e. Conversely, Huang *et al.*, [25] reported that newly emerged bees were the least susceptible to *N. ceranae* while the more susceptible were those ones infected at 5 days p.e.

It is known that bees undergoes particularly important natural modifications to the composition and succession of their intestinal microbiota in the first days of their adult development and newborn bees begin to acquire their intestinal microbiota within a matter of hours and they are fully colonized by the sixth day p.e. [74–76]. Indeed, bacterial community colonization of bee gut is resilient to changes in the nutritional, hive, and social environment [76]. Consequently *N. ceranae* infection success may be related to the microbiota becoming established in the intestine of the bees and its competition with the parasite for the host's resources, as well as on the physiological events inherent to bee development [48,49]. These modifications could affect the biological cycle of

microsporidia [77] and perhaps the intensity of infection [78]. In fact, the promotion of diseases in honey bees and therefore, the health of the colony, may be associated with changes in the composition and abundance of the intestinal microbiota of individual bees [77,79–82]. The greatest differences in infection was seen here among the youngest cohorts of 0 and 1 days p.e. However, the relative abundance of some members of the microbiome is associated with the environment in which they develop [83], and the succession of communities is strongly associated with the breed and age of the bees [84]. In our study, bees were kept in an incubator out of the colony and this most likely influence the establishment of normal microbiota. Moreover, the strict dependence on host energy for the development of microsporidia [85,86] and the greater availability of essential amino acids in young bees [87] could also favour the multiplication of the parasite in younger bees [85,86,88].

Other events mediated by the pathogenic action of the microsporidia are likely to influence infection, as is the host's immune response that varies with age. In fact, immunosenescence in more mature insects [89] may enhance the intensity of the infection by *N. ceranae* in older honey bees [90]. It is commonly accepted that the older forager bees have the highest frequency and intensity of infection in hives [44,45,91,92], which is thought to reflect the acceleration of the foraging behaviour in bees infected by *N. ceranae* [32–34,57,93]. Given the higher susceptibility of younger worker bees in this study, it is possible that some strategies may be employed in the super-organism to reduce contamination by *Nosema spp.* in the nucleus of the hive where they develop. Indeed, such strategies were proposed to prevent the infection of young queen bees [47], young worker bees [94] and immature bees [67,95], which have a lower risk of developing the disease even when the prevalence of infection in adult bees is relatively high [54].

In addition to the biological factors associated with the different life stages of the bees, *N. ceranae* infection can itself affect various aspects of physiology (metabolism and immune response), morphology and behaviour of honey bees [21,34,95–98], thereby influencing the viability and intensity of the infection. Some evidence suggests that parasite manipulation of intestinal homeostasis and the inhibition of intestinal epithelial renewal [98,99] are correlated with an increased susceptibility of bees to *N. ceranae* infection due to the diminished capacity to repair the intestinal damage [99]. Ventricular epithelial cells in young bees 1-2 days p.e. are still undergoing morphogenetic development [100], which may be associated with the ability to accumulate infected apoptotic cells in the midgut and rectum when they are experimentally infected [101].

Despite the collective assay (Group B) was done in just one cage while in the individual assay (Group A) was done in 3 cages, a similar trend was observed in both assays. As bees were analysed individually in all groups, each age is represented for different values (at least 10 bees, see Table 3). Indeed the cage effect was analysed in the individual infection and GLMMz did not show any statistical significance. However, the prevalence of infection and the average levels of infection were

significantly higher in individually infected bees than in those collectively infected, which may explain some of the conflicting results found in the literature. In this sense, important differences in food intake have been described between bees caged together within the first 48 hours, whereby one bee could ingest up to 8.8 times more food than another in the same cage [102]. These observations suggest bees are exposed to distinct numbers of *N. ceranae* spores during collective infection. Indeed, in some studies only 23.3% [103] or 78% [32] of caged bees become infected 12-15 days after collective administration of spores in food.

Trophallaxis favours the transmission of spores among bees and one study showed that while only three infected bees were found from five samples analysed in the inoculation cages at 5 d.p.i., all bees sampled at 10 and 15 d.p.i. were infected [104]. However, infected bees may be less willing to share food with their cage mates [105] or conversely, they may enhance their trophalactic behaviour [32]. In addition, the number of infected bees in a cage and their parasite load are factors that influence the exchange of food between infected and uninfected bees [106].

The levels of *N. ceranae* infection in both groups (Group A and Group B) showed similar trends, with significantly higher values in bees exposed to spores in the first 48 hours p.e. and lower values as the bees aged. Therefore, considering all the variables that could modulate the frequency and intensity of infection, and the exchange of contaminated food between caged bees, we consider that the bee age at the time of infection influences the degree of infection and the development of nosemosis, as suggested for *N. apis* infection [94,107]. In addition, the number of uninfected bees following collective exposure to the spores was higher than that of individual infections, particularly in young bees. These phenomena could affect the interpretation of the results of experimental studies and thus, both these variables must be considered in laboratory studies. Likewise, in addition to cage experiments, more field tests with hives should be conducted as differences have been found in the morphology, physiology, behaviour and gene expression of honey bees (workers and queens) reared in the laboratory when compared to those naturally infected by microsporidia [79,108–111].

5. Conclusions

The bees infected in the first 48 hours p.e. develop significantly high levels of *N. ceranae* infection and as their age increases, there is a decreasing trend in terms of infection that is reproduced independently of the method used to administer the spores. Hence, younger bees appear to be more susceptible to infection and/or the microsporidia is capable multiplying better in these bees. Moreover, our results demonstrate that the effect of the age in the infection is similar in bees exposed individual or collectively. The collective inoculation was less successful and the bees, when infected, had lower parasitic charge. Thus, the results presented here demonstrate that bee age and the method of inoculation determine the extent of infection that develops, which is important to take into account

when comparing experimental studies in the laboratory. Future research aimed at elucidating the physiological differences between bees of different ages might help explain their different susceptibility to *N. ceranae* infection, potential paving the way to design strategies to combat this pathogen.

Author Contributions: Conceptualization and Methodology: R.M-H. and A.U-M.; Formal Analysis and Investigation: R.M-H.; M.H. and A.U-M.; Statistic Analysis: L.B.; A.U-M. and M.H.; Data collection and Curation: A.U-M.; Preparation of the First Draft: A.U. and R.M-H.; Manuscript Review & Editing: A.U-M.; R.M-H.; M.H. and A.M.; Visualization, Supervision, Project Administration: R.M-H.; M.H.; A.U-M. and A.M.; Funding Acquisition: R.M-H.

Funding: This research was funded by The National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) and FEDER funds (RTA2015-00013-C03-01 and RTA2012-00076-C02-01).

Acknowledgments: The authors wish to thanks V. Albendea, T. Corrales, M. Gajero, C. Uceta, J. Almagro and J. García of the Honey Bee Pathology Laboratory for their technical support.

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare. The funding bodies played no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of the data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Alvarez-Suarez, J.M. *Bee products - chemical and biological properties*; Facultad de Ciencias de la Salud, U. de L.A., Ed.; Springer International Publishing AG: Quito Ecuador, 2017; ISBN 9783319596891.
2. European Commission EU Pollinators Initiative: Roadmap. **2017**, 1–3.
3. IPBES *The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production*; Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V.L., Ngo, H.T., Eds.; 2017; ISBN 978-92-807-3567-3.
4. Grozinger, C.M.; Flenniken, M.L. Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annu. Rev. Entomol.* **2019**, *64*, 205–226.
5. Goblirsch, M. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2018**, *49*, 131–150.
6. Klee, J.; Besana, A.M.; Genersch, E.; Gisder, S.; Nanetti, A.; Tam, D.Q.; Chinh, T.X.; Puerta, F.; Ruz, J.M.; Kryger, P.; et al. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **2007**, *96*, 1–10.
7. Chen, Y.; Evans, J.D.; Smith, I.B.; Pettis, J.S. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* **2008**, *97*, 186–188.

8. Tokarev, Y.S.; Zinatullina, Z.Y.; Ignatieva, A.N.; Zhigileva, O.N.; Malysh, J.M.; Sokolova, Y.Y. Detection of two Microsporidia pathogens of the European honey bee *Apis mellifera* (Insecta: Apidae) in Western Siberia. *Acta Parasitol.* **2018**.
9. Ostroverkhova, N. V; Kucher, A.N.; Golubeva, E.P.; Rosseykina, S.A.; Konusova, O.L. Study Of *Nosema* spp. In The Tomsk Region, Siberia: Co-Infection Is Widespread In Honeybee Colonies. *Far East. Entomol. Number* **2019**, 378, 12–22.
10. Gisder, S.; Schüler, V.; Horchler, L.L.; Groth, D.; Genersch, E. Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, 7, 1–14.
11. Martín-Hernández, R.; Bartolomé, C.; Chejanovsky, N.; Le Conte, Y.; Dalmon, A.; Dussaubat, C.; García-Palencia, P.; Meana, A.; Pinto, M.A.; Soroker, V.; et al. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* : a 12 years post-detection perspective. *Environ. Microbiol.* **2018**, 20, 1302–1329.
12. Botías, C.; Martín-Hernández, R.; Garrido-Bailón, E.; González-Porto, A.; Martínez-Salvador, A.; De La Rúa, P.; Meana, A.; Higes, M. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res. Vet. Sci.* **2012**, 93, 150–155.
13. Cepero, A.; Martín-Hernández, R.; Bartolomé, C.; Gómez-Moracho, T.; Barrios, L.; Bernal, J.; Teresa Martín, M.; Meana, A.; Higes, M. Passive laboratory surveillance in Spain: pathogens as risk factors for honey bee colony collapse. *J. Apic. Res.* **2016**, 54, 525–531.
14. Huang, W.F.; Solter, L.F. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* **2013**, 113, 35–41.
15. Smith, M.L. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? *PLoS One* **2012**, 7, 1–6.
16. Webster, T. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.* **1993**, 133, 869–870.
17. Higes, M.; Martin-Hernandez, R.; Garcia-Palencia, P.; Martin, P.; Meana, A.M. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.* **2009**, 1, 495–498.
18. Higes, M.; García-Palencia, P.; Martín-Hernández, R.; Meana, A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* **2007**, 94, 211–217.
19. García-Palencia, P.; Martín-Hernández, R.; González-Porto, A.-V.; Marin, P.; Meana, A.; Higes, M. Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* **2010**, 49, 278–283.
20. Higes, M.; García-Palencia, P.; Urbietta, A.; Nanetti, A.; Martín-Hernández, R. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* Tissue Tropism in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*). *Vet. Pathol.* **2019**, 030098581986430.

21. Dussaubat, C.; Brunet, J.L.; Higes, M.; Colbourne, J.K.; Lopez, J.; Choi, J.H.; Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Cousin, M.; McDonnell, C.; et al. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* **2012**, *7*.
22. Alaux, C.; Brunet, J.L.; Dussaubat, C.; Mondet, F.; Tchamitchan, S.; Cousin, M.; Brillard, J.; Baldy, A.; Belzunces, L.P.; Le Conte, Y. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* **2010**, *12*, 774–782.
23. Aufauvre, J.; Misme-Aucouturier, B.; Viguès, B.; Texier, C.; Delbac, F.; Blot, N. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One* **2014**, *9*, e91686.
24. Doublet, V.; Natsopoulou, M.E.; Zschiesche, L.; Paxton, R.J. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *124*, 31–34.
25. Huang, W.F.; Solter, L.; Aronstein, K.; Huang, Z. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *124*, 107–113.
26. Schwarz, R.S.; Evans, J.D. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Dev. Comp. Immunol.* **2013**, *40*, 300–310.
27. Mayack, C.; Naug, D. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J. Insect Physiol.* **2010**, *56*, 1572–1575.
28. Williams, G.R.; Shutler, D.; Burgher-MacLellan, K.L.; Rogers, R.E.L. Infra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS One* **2014**, *9*, 5–10.
29. Vidau, C.; Panek, J.; Texier, C.; Biron, D.G.; Belzunces, L.P.; Le Gall, M.; Broussard, C.; Delbac, F.; El Alaoui, H. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J. Invertebr. Pathol.* **2014**, *121*, 89–96.
30. Gage, S.L.; Kramer, C.; Calle, S.; Carroll, M.; Heien, M.; DeGrandi-Hoffman, G. *Nosema ceranae* parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb161489.
31. Wolf, S.; McMahon, D.P.; Lim, K.S.; Pull, C.D.; Clark, S.J.; Paxton, R.J.; Osborne, J.L. So near and yet so far: Harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees. *PLoS One* **2014**, *9*.
32. Lecocq, A.; Jensen, A.B.; Kryger, P.; Nieh, J.C. Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11.
33. Fleites-Ayil, F.A.; Quezada-Euán, J.J.G.; Medina-Medina, L.A. Onset of foraging and lifespan of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) infected with different levels of *Nosema ceranae* spores in

Neotropical Mexico. *Apidologie* **2018**.

34. Goblirsch, M.; Huang, Z.Y.; Spivak, M. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS One* **2013**, *8*.
35. Bourgeois, A.L.; Rinderer, T.E.; Sylvester, H.A.; Holloway, B.; Oldroyd, B.P. Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects. *Apidologie* **2012**, *43*, 539–548.
36. Fontbonne, R.; Garnery, L.; Vidau, C.; Aufauvre, J.; Texier, C.; Tchamitchian, S.; Alaoui, H. El; Brunet, J.L.; Delbac, F.; Biron, D.G. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *17*, 188–194.
37. Giersch, T.; Berg, T.; Galea, F.; Hornitzky, M. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* **2009**, *40*, 117–123.
38. van der Zee, R.; Pisa, L.; Andonov, S.; Brodschneider, R.; Charrière, J.-D.; Chlebo, R.; Coffey, M.F.; Crailsheim, K.; Dahle, B.; Gajda, A.; et al. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *J. Apic. Res.* **2012**, *51*, 100–114.
39. Malone, L.A.; Gatehouse, H.S. Effects of *Nosema apis* Infection on Honey Bee (*Apis mellifera*) Digestive Proteolytic Enzyme Activity. *J. Invertebr. Pathol.* **1998**, *71*, 169–174.
40. Martín-Hernández, R.; Aránzazu Meana; García-Palencia, P.; Marín, P.; Botías, C.; Garrido-Bailón, E.; Barrios, L.; Higes, M. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 2554–2557.
41. Martín-Hernández, R.; Meana, A.; Prieto, L.; Salvador, A.M.; Garrido-Bailón, E.; Higes, M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 6331–6338.
42. Fenoy, S.; Rueda, C.; Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Del Aguila, C. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6886–6889.
43. Tapasztó, Z.; Forgách, P.; Kővágó, C.; Békési, L.; Bakonyi, T.; Rusvai, M. First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Vet. Hung.* **2009**, *57*, 383–388.
44. Meana, A.M.; Martín-Hernández, R.; Higes, M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *J. Apic. Res.* **2010**, *49*, 212–214.
45. Smart, M.D.; Sheppard, W.S. *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **2012**, *109*, 148–151.
46. Jack, C.J.C.J.; Lucas, H.M.H.M.; Webster, T.C.T.C.; Sagili, R.R.R.R. Colony level prevalence and intensity of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS One* **2016**, *11*, 1–20.
47. Chaimanee, V.; Chantawannakul, P.; Chen, Y.; Evans, J.D.; Pettis, J.S. Effects of host age on susceptibility

- to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie* **2014**, *45*, 451–463.
48. VanEngelsdorp, D.; Traynor, K.S.; Andree, M.; Lichtenberg, E.M.; Chen, Y.; Saegerman, C.; Cox-Foster, D.L. Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *PLoS One* **2017**, *12*.
 49. Ward, K.N.; Coleman, J.L.; Clinnin, K.; Fahrbach, S.; Rueppell, O. Age, caste, and behavior determine the replicative activity of intestinal stem cells in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Exp. Gerontol.* **2008**, *43*, 530–537.
 50. Williams, G.R.; Alaux, C.; Costa, C.; Csáki, T.; Doublet, V.; Eisenhardt, D.; Fries, I.; Kuhn, R.; McMahon, D.P.; Medrzycki, P.; et al. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *J. Apic. Res.* **2013**, *52*.
 51. Porrini, M.P.; Sarlo, E.G.; Medici, S.K.; Garrido, P.M.; Porrini, D.P.; Damiani, N.; Eguaras, M.J. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera* : influence of diet and infective inoculum. *J. Apic. Res.* **2011**.
 52. Di Pasquale, G.; Salignon, M.; Le Conte, Y.; Belzunces, L.P.; Decourtye, A.; Kretzschmar, A.; Suchail, S.; Brunet, J.-L.L.; Alaux, C. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS One* **2013**, *8*, 1–13.
 53. Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Bailón, E.G.; Martínez-Salvador, A.; Prieto, L.; Meana, A.; Higes, M. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: Coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 2127–2138.
 54. Urbietta-Magro, A.; Higes, M.; Meana, A.; Gómez-Moracho, T.; Rodríguez-García, C.; Barrios, L.; Martín-Hernández, R. The levels of natural *Nosema* spp. infection in *Apis mellifera iberiensis* brood stages. *Int. J. Parasitol.* **2019**, *49*, 657–667.
 55. Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Barrios, L.; Martínez-Salvador, A.; Meana, A.; Mayack, C.; Higes, M. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 605–612.
 56. Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Garrido-Bailón, E.; García-Palencia, P.; Meana, A. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* **2008**, *97*, 76–78.
 57. Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Garrido-Bailón, E.; Botías, C.; García-Palencia, P.; Meana, A. Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 1374–1379.
 58. Taupin, V.; Méténier, G.; Vivarès, C.P.; Prensier, G. An improved procedure for Percoll gradient separation of sporogonial stages in *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitol. Res.* **2006**, *99*, 708–714.

59. Cantwell, G.E. Standard methods for counting nosema spores. *Am. Bee J.* **1970**, *110*, 222–223.
60. Forsgren, E.; Fries, I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.* **2010**, *170*, 212–217.
61. Milbrath, M.O.; van Tran, T.; Huang, W.F.; Solter, L.F.; Tarpy, D.R.; Lawrence, F.; Huang, Z.Y. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *125*, 9–15.
62. Jack, C.J.; Uppala, S.S.; Lucas, H.M.; Sagili, R.R. Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *J. Insect Physiol.* **2016**, *87*, 12–19.
63. McGowan, J.; De la Mora, A.; Goodwin, P.H.; Habash, M.; Hamiduzzaman, M.M.; Kelly, P.G.; Guzman-Novoa, E. Viability and infectivity of fresh and cryopreserved *Nosema ceranae* spores. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *131*, 16–22.
64. Malone, L. a; Giaccon, H. a; Newton, M.R. Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. *Apidologie* **1995**, *26*, 495–502.
65. Gómez Moracho, T. Análisis de los patrones de diversidad genética de *Nosema ceranae*, un patógeno emergente de *Apis mellifera*, Universidade de Santiago de Compostela, 2015.
66. Suwannapong, G.; Yemor, T.; Boonpakdee, C.; Benbow, M.E. *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* **2011**, *106*, 236–241.
67. Eiri, D.M.; Suwannapong, G.; Endler, M.; Nieh, J.C. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–17.
68. Fries, I.; Chauzat, M.-P.; Chen, Y.-P.; Doublet, V.; Genersch, E.; Gisder, S.; Higes, M.; McMahon, D.P.; Martín-Hernández, R.; Natsopoulou, M.; et al. Standard methods for *Nosema* research. *J. Apic. Res.* **2013**, *52*, 1–28.
69. Sagastume, S.; Martín-Hernández, R.; Higes, M.; Henriques-Gil, N. Genotype diversity in the honey bee parasite *Nosema ceranae*: multi-strain isolates, cryptic sex or both? *BMC Evol. Biol.* **2016**, *16*, 216.
70. Natsopoulou, M.E.; McMahon, D.P.; Doublet, V.; Bryden, J.; Paxton, R.J. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2014**, *282*, 20141896–20141896.
71. Fries, I. Infectivity and Multiplication of *Nosema apis* Z. in the Ventriculus of the Honey Bee. *Apidologie* **1988**, *19*, 319–328.
72. Pettis, J.S.; Vanengelsdorp, D.; Johnson, J.; Dively, G. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **2012**, *99*, 153–158.
73. OIE Nosemosis of Honey Bess. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*; 2018; pp. 744–749.

74. Powell, J.E.; Martinson, V.G.; Urban-Mead, K.; Moran, N.A. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**.
75. Engel, P.; Bartlett, K.D.; Moran, N.A. The bacterium *frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host. *MBio* **2015**, *6*, e00193-15.
76. Anderson, K.E.; Rodrigues, P.A.P.; Mott, B.M.; Maes, P.; Corby-Harris, V. Ecological Succession in the Honey Bee Gut: Shift in *Lactobacillus* Strain Dominance During Early Adult Development. *Microb. Ecol.* **2016**.
77. Maes, P.W.; Rodrigues, P.A.P.; Oliver, R.; Mott, B.M.; Anderson, K.E. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* **2016**, *25*, 5439–5450.
78. Rubanov, A.; Russell, K.A.; Rothman, J.A.; Nieh, J.C.; McFrederick, Q.S. Intensity of *Nosema ceranae* infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3820.
79. Ptaszyńska, A.A.; Paleolog, J.; Borsuk, G. *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honey bee intestines. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–15.
80. Anderson, K.E.; Ricigliano, V.A. Honey bee gut dysbiosis: a novel context of disease ecology. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2017**.
81. Regan, T.; Barnett, M.W.; Laetsch, D.R.; Bush, S.J.; Wragg, D.; Budge, G.E.; Highet, F.; Dainat, B.; de Miranda, J.R.; Watson, M.; et al. Characterisation of the British honey bee metagenome. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4995.
82. Li, J.H.; Evans, J.D.; Li, W.F.; Zhao, Y.Z.; DeGrandi-Hoffman, G.; Huang, S.K.; Li, Z.G.; Hamilton, M.; Chen, Y.P. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PLoS One* **2017**, *12*, e0187505.
83. Jones, J.C.; Fruciano, C.; Hildebrand, F.; Al Toufalilia, H.; Balfour, N.J.; Bork, P.; Engel, P.; Ratnieks, F.L.; Hughes, W.O. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 441.
84. Anderson, K.E.; Ricigliano, V.A.; Mott, B.M.; Copeland, D.C.; Floyd, A.S.; Maes, P. The queen's gut refines with age: longevity phenotypes in a social insect model. *Microbiome* **2018**, *6*, 108.
85. Burri, L.; Williams, B.A.P.; Bursac, D.; Lithgow, T.; Keeling, P.J. Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 15916–15920.
86. Cornman, R.S.; Chen, Y.P.; Schatz, M.C.; Street, C.; Zhao, Y.; Desany, B.; Egholm, M.; Hutchison, S.; Pettis, J.S.; Lipkin, W.I.; et al. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*.

87. Crailsheim, K.; Leonhard, B. Amino acids in honeybee worker haemolymph. *Amino Acids* **1997**, *13*, 141–153.
88. Weidner, E.; Findley, A.M.; Dolgikh, V.; Sokolova, J. Microsporidian Biochemistry and Physiology. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*; Wittne, M., Weiss, L.M., Eds.; ASM Press: Washington, 1999; pp. 172–195 ISBN 9781555818227.
89. Hillyer, J.F. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *58*, 102–118.
90. Roberts, K.E.; Hughes, W.O.H. Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **2014**, *121*, 1–6.
91. Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Bailón, E.G.; González-Porto, A. V.; Barrios, L.; Del Nozal, M.J.; Bernal, J.L.; Jiménez, J.J.; Palencia, P.G.; et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 2659–2669.
92. Li, W.; Evans, J.D.; Li, J.; Su, S.; Hamilton, M.; Chen, Y. Spore load and immune response of honey bees naturally infected by *Nosema ceranae*. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 3265–3274.
93. Holt, H.; Villar, G.; Grozinger, C.M. Molecular, physiological and behavioral responses of honey bee (*Apis mellifera*) drones to infection with microsporidian parasites. *J. Invertebr. Pathol.* **2017**.
94. Woyciechowski, M.; Moroń, D. Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Insectes Soc.* **2009**.
95. Benvau, L.R.; Nieh, J.C. Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–8.
96. Aliferis, K.A.; Copley, T.; Jabaji, S. Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *J. Insect Physiol.* **2012**, *58*, 1349–1359.
97. Holt, H.L.; Aronstein, K.A.; Grozinger, C.M. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* **2013**, *14*.
98. Martín-Hernández, R.; Higes, M.; Sagastume, S.; Juarranz, Á.; Dias-Almeida, J.; Budge, G.E.; Meana, A.; Boonham, N. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–17.
99. Panek, J.; Paris, L.; Roriz, D.; Mone, A.; Dubuffet, A.; Delbac, F.; Diogon, M.; El Alaoui, H. Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **2018**, *159*, 121–128.
100. Pipan, N.; Rakovec, V. Cell death in the midgut epithelium of the worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) during metamorphosis. *Zoomorphologie* **1980**, *94*, 217–224.

101. Kurze, C.; Le Conte, Y.; Dussaubat, C.; Erler, S.; Kryger, P.; Lewkowski, O.; Müller, T.; Widder, M.; Moritz, R.F.A. Nosema tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–9.
102. Brodschneider, R.; Libor, A.; Kupelwieser, V.; Crailsheim, K. Food consumption and food exchange of caged honey bees using a radioactive labelled sugar solution. *PLoS One* **2017**.
103. Pettis, J.S.; Lichtenberg, E.M.; Andree, M.; Stitzinger, J.; Rose, R.; vanEngelsdorp, D. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS One* **2013**, *8*.
104. Badaoui, B.; Fougeroux, A.; Petit, F.; Anselmo, A.; Gorni, C.; Cucurachi, M.; Cersini, A.; Granato, A.; Cardeti, G.; Formato, G.; et al. RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–17.
105. Naug, D.; Gibbs, A. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* **2009**, *40*, 595–599.
106. Biganski, S.; Kurze, C.; Müller, M.Y.; Moritz, R.F.A.A. Social response of healthy honeybees towards *Nosema ceranae*-infected workers: care or kill? *Apidologie* **2017**.
107. Rueppell, O.; Bachelier, C.; Fondrk, M.K.; Page, R.E.; Jr. Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Exp. Gerontol.* **2007**, *42*, 1020–32.
108. Blacquièrre, T.; Smagghe, G.; Van Gestel, C.A.M.; Mommaerts, V. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* **2012**.
109. De Smet, L.; Hatjina, F.; Ioannidis, P.; Hamamtzoglou, A.; Schoonvaere, K.; Francis, F.; Meeus, I.; Smagghe, G.; De Graaf, D.C. Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *PLoS One* **2017**.
110. Jones, J.C.; Fruciano, C.; Marchant, J.; Hildebrand, F.; Forslund, S.; Bork, P.; Engel, P.; Hughes, W.O.H. The gut microbiome is associated with behavioural task in honey bees. *Insectes Soc.* **2018**, *65*, 419–429.
111. De Souza, D.A.; Kaftanoglu, O.; De Jong, D.; Page Jr, R.E.; Amdam, G. V; Wang, Y. Differences in the morphology, physiology and gene expression of honey bee queens and workers reared in vitro versus in situ. *Biol. Open* **2018**, *7*, bio036616.



Afilación de coautores

Raquel Martín-Hernández

Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT-FEDER), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Castilla – La Mancha, España.

Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Camino de San Martín s/n, 19180 - Marchamalo, Guadalajara, España.

Contacto: rmhernandez@jccm.es; Teléfono: +34 949 885014

Mariano Higes

Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Camino de San Martín s/n, 19180 - Marchamalo, Guadalajara, España.

Contacto: mhiges@jccm.es; Teléfono: +34 949 885014

Aránzazu Meana

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro, s/n. Ciudad Universitaria. 28040 – Madrid, España.

Contacto: ameana@vet.ucm.es; Teléfono: +34 91 394 3903

Laura Barrios

Departamento de Estadística, Área de Cálculo Científico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (SGAI, CSIC). C/ Pinar 19, 28006 - Madrid, España.

Contacto: laura@cti.csic.es; Teléfono: +34 915642963 Ext 990224

Tamara Gómez-Moracho

Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Camino de San Martín s/n, 19180 - Marchamalo, Guadalajara, España.

Research Center on Animal Cognition, Center for Integrative Biology, National Center for Scientific Research (CNRS), Toulouse University (UPS), Toulouse, France.

Contacto: tamara.gomez@univ-tlse3.fr

Cristina Rodríguez-García

Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo, Guadalajara, España.

Contacto: cristinarodriguez.crg@gmail.com

Pilar García-Palencia

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España. Avda. Puerta de Hierro, s/n. Ciudad Universitaria. 28040 – Madrid, España.

Contacto: palencia@vet.ucm.es; Teléfono: +34 91 394 3741

Antonio Nanetti

CREA Research Centre for Agriculture and Environment. Via di Saliceto 80, 40128 Bologna, Italy.

Contacto: antonio.nanetti@crea.gov.it; Teléfono: +39 051 353103 (ext. 09)

Agradecimientos

Dicen las sabias voces que “una abeja no hace colmena”. Una sola no lo logra, y sencillamente ocurre cuando no lo intenta sola. En estos últimos años repletos de actividades formativas y crecimiento personal, este es el mayor aprendizaje que me llevo, y el que considero más importante; una enseñanza andamiada en pequeños hexágonos que son mayores que el cuadrado y que el triángulo, y contienen un conocimiento cosechado con minucioso cuidado, una vivaz experiencia que se ha multiplicado con la participación de las muchas personas que la habéis apoyado, iniciado y finalizado, y un laborioso trabajo colectivo del que me siento profundamente agradecida, afortunada y beneficiada. Muchas gracias a todas estas personas que habéis convertido mi proyecto en el nuestro, sin vosotras la realización de esta tesis no habría sido posible.

En primer lugar querría agradecer la confianza, la ayuda, las enseñanzas y la oportunidad de incorporarme en su equipo de investigación a mis directoras y director de tesis, la Dra. Raquel Martín-Hernández, el Dr. Mariano Higes y la Dra. Aránzazu Meana.

A ti Raquel, mi entera gratitud y admiración como científica y como persona. Porque has sido la pieza imprescindible a lo largo de todo este camino, por tu gran apoyo y generosidad, por compartir conmigo todo el conocimiento que te ha dado tiempo, por seguir haciéndolo, por enseñarme todo del trabajo en el laboratorio y a querer a la biología molecular, por tu pasión veterinaria, por tu respeto a la vida, por tu cariño e inteligencia emocional, por escucharme y contar conmigo, por todos tus cuidados que han sido tantos, por tu enorme paciencia, y por ser un ejemplo en la reflexión científica (y no sólo científica) sin dejar nada de lo anterior atrás. Gracias por enseñarme a escribir un *paper*, y muchísimas gracias por dedicarme horas de correcciones juntas, por hacerme partícipe de todo el proceso. Te agradeceré siempre haber sido mi jefa y haberme hecho sentir una compañera, gracias por formarme como científica y por haber sido un ejemplo para crecer como persona. Has sido y eres todo un modelo para mí.

A ti Mariano, porque durante todos estos años has conseguido transmitirme tu admiración por la investigación y la apicultura, tu energía, tu incesante afán de superación y pasión por todo lo que haces. Gracias por tu cercanía desde el primer momento, por estar siempre disponible, por tu gran dedicación, por hacer crecer mi curiosidad y las pestañas abiertas en mi ordenador, y por ayudarme siempre a volver con las palabras que aún recuerdo: “Urbietta, *focus on*”. Gracias por hacerme partícipe de muchos de tus proyectos y especialmente de los proyectos sobre plaguicidas, por confiar en mí y creer en un diseño experimental que era casi otra tesis doctoral, por tu rigurosidad metodológica y enseñarme a leer los materiales y métodos, por tantas horas infectando, por escucharme y asesorarme

con los enfoques agroecológicos, por compartir tus contactos, y por ser un ejemplo dirigiendo un equipo científico, y levantando y conservando un laboratorio público en tiempos difíciles para la ciencia de todos y de todas, por darlo todo por tu gente, por tus palabras de ánimo, por tu amistad y por ayudarme siempre. Gracias por todo.

A ti Arancha, por tus impecables enseñanzas en la elaboración de documentación y comunicación científica, por tu diligencia y perseverancia, por tu creatividad, por tu entusiasmo y seguridad contagiosas, por tu ímpetu y dedicación en todo lo que haces, por enseñarme a profundizar, relacionar y sintetizar para ser original y contar lo que todavía no se ha dicho, por compartir tus prácticas pedagógicas y enseñarme los trucos de una buena comunicadora, por tu paciencia infinita escuchando verborrea, la consecución de detalles infinitos y las ideas entrelazadas del pensamiento lateral, por acompañarme en caminos alternativos o desacostumbrados y ayudarme a frenar para poder organizar, por dejarme crear y equivocarme, por reforzarme y compartir mis aciertos, porque esta memoria de tesis doctoral no habría nacido sin tu apoyo y cientos de consejos, por tu guía imprescindible en el mundo académico, y por tu sólida apuesta en mi formación científica, íntegra y transformadora. Gracias por tantas y tan valiosas enseñanzas.

En segundo lugar quiero agradecer a todas las investigadoras e investigadores que con sus valiosas aportaciones han contribuido a mi formación, y a que esta tesis haya podido realizarse y vea ahora el final y un nuevo comienzo. Muchas gracias a mis predecesoras, y compañeras del CIAPA, las Dras. Cristina Rodríguez, Soledad Sagastume, Tamara Gómez-Moracho y Almudena Cepero, y al Dr. Miguel Llorens-Picher, porque habéis sido mis mentoras y unas estupendas compañeras. También a mis contemporáneas pre-doctorales María Buendía, María Benito y Clara Jara, por vuestro tiempo y ayuda resolviendo dudas, y por contar conmigo para resolver las vuestras. Gracias a todas ellas, compañeras, por vuestro valiosísimo trabajo y profesionalidad, por allanarme el camino, por ser el pilar de partida y el apoyo consecutivo, por enseñarme los misterios del laboratorio y del campo, por compartir vuestros proyectos y aprendizajes, y explicarme los detalles de vuestras especialidades, gracias por vuestro ánimo, especialmente cuando las cosas no salen, y al final de la tesis, por ese impulso de confianza y por repetirme una y mil veces que ‘si se puede’ y ‘que ya no queda nada’, gracias por vuestra amistad, y porque la curiosidad ha sido más grande que el miedo, y el último, mucho más llevadero a vuestro lado.

A la Dra. Laura Barrios (SGAI-CSIC- Madrid), por su contribución con el análisis estadístico, y por haberme dedicado muchas horas de trabajo, a menudo apremiantes porque siempre le contacté tarde, y por su disponibilidad y correcciones. A la Dra. Pilar García Palencia (UCM-Madrid), por su laudable trabajo como históloga en esta tesis, y por su imprescindible ayuda y contribución con todas las imágenes de microscopía. Gracias también al personal del Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) y de su laboratorio, y en especial a Marisa García por su ayuda en la obtención de

las imágenes MET. A Antonio Nanetti (CREA-Bolonia, Italia), por compartir su experiencia en el manejo de colmenas, por su contextualización ante el cambio climático, su visión sobre el control biotécnico de los ácaros patógenos, y por sus constructivos comentarios en esta tesis. A Msc. Daniela Arredondo (IIBCE-Uruguay), por su estancia en el CIAPA, por introducirme en el mundo de los probióticos, la microbiología de las abejas y los cultivos celulares, gracias por confiar en mí, por tus consejos, por todas las enseñanzas, y sobre todo por tu amistad. A Isabel y Cristina, del servicio de citometría del CAI-UAH, por ayudarme en los ensayos analizando la viabilidad de las esporas purificadas. Al equipo de la Dra. Yolanda Picó (CIDE-Valencia), por el análisis multiresiduo para detectar plaguicidas en los jarabes de abeja, un ensayo que finalmente no ha entrado en esta memoria de tesis pero que fue el punto de partida de mi trayectoria en la patología apícola y recuerdo con mucho cariño. A la Unidad UCM-Genómica y Proteómica por su contribución en la secuenciación de productos de PCR, y por su tiempo y empeño explicándome como preparar muestras para análisis 2D-PAGE. A la Dra. Pilar de la Rúa y a su equipo de la Universidad de Murcia, especialmente a la Dra. Laura Jara y a Diego Cejas, por su asesoramiento y pasión por la genética de *A. m. iberiensis*, y su cercanía en los congresos. A la Dra. Karina Antúnez, a los Drs. Ciro Invernizzi y Nor Chejanovsky, por acogerme en los congresos del EURBEE y hacerme sentir como una investigadora, gracias por vuestros consejos y consultas.

Detrás de todo el trabajo realizado hay un gran equipo técnico y muchas personas que han intervenido de manera determinante en el desarrollo de los experimentos, facilitando cada ensayo y participando activamente en mi formación científica; compañeras y compañeros que me han ayudado enormemente a lo largo de todo el camino. Mi enorme gratitud a todo el equipo del Laboratorio de Patología Apícola del CIAPA de Marchamalo. A Teresa, por su actitud valiente ante las adversidades, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por su alegría y vitalidad, y por enseñarme que siempre hay una forma de tirar pa' adelante y por seguir cuidándome en la distancia. A Carmen, por hacer que lo difícil sea fácil, por quitarle importancia a la urgencia, por su calma y convicción en momentos de desesperación. A María, por su ayuda genuina infectando abejas, por la alegría que desprende disfrutando lo que hace, y conseguir que horas de trabajo pasen volando mientras no se escapen las abejas. A Virginia, por ser tantas veces mis manos, por hacerme muchos de los pedidos y ayudarme a que no me faltase de nada, y por ser también muchas veces mi cabeza y saber dónde está esa carpeta que no aparece por ninguna parte. A Javi y a Jesús, porque cada día en el campo ha sido un regalo a vuestro lado, gracias por haberme enseñado apicultura con tanta calma, profesionalidad y encanto, por vuestro apoyo constante y por haberme ayudado con las preciosas fotos de esta memoria. A Mari Carmen, por conseguir que lo difícil sea divertido, por su claridad y sinceridad, y su gran emprendimiento que ha sido para mí un ejemplo. A Ana, por su amistad, por su ayuda siempre, por su cariño y complicidad, y por haber sido un apoyo enorme a lo largo de toda la tesis doctoral, gracias por tantas tardes juntas, gracias por ser como eres.

I would like to acknowledge the members of the Laboratory of Molecular Entomology and Bee Pathology (L-MEB) of the University of Ghent, for their enormous hospitality during my two stays. I especially want to thank Prof. Dr. Dirk de Graaf for the opportunity he gave me to join his research team and for making me feel a part of it from my arrival. Thank you very much for long scientific discussions, for your openness to proposals, and for always answering them with so amazing thoughtful questions: 'Why do you want to do it this way and what would be the alternatives?'. These points will stay on me. I really appreciate the way you make me think and discuss on scientific questions. Thanks for not giving me things done, for believing in me, for your generosity and professionalism, for showing me that self-criticism is never easy. Thanks for being patient in experimental design, for offering future collaborations, and for your summer visit that helped to realize a project I once dreamed. Thank you for offering me all the means at your disposal and for contributing to my scientific education with your human quality. I also want to thank the essential support of Marleen Brunain and Dr. Lina de Smet, thank you for helping me to locate me in your laboratory and the city, for teaching me how to detect genotypes of *P. larvae*, your methods of PCR and MLPA, and the statistical analysis with geNorm. My entire gratitude to Karel Schoonvaere, for your kindness and dedicated time, for introducing me to the RNA-seq in a fun and practical way. Thank you for your enormous patience decoding the programming languages and teaching me how to use R-Studio. I loved your Scripts! Thanks also to Dr. Moses Chemurot, Haftom Gebremedhn, Dr. Deborah Ruth, Dr. Tine Descamps and Sara Vleminckx and the wonderful Honeybee Valley team, for their hospitality and help. Finally, thanks to my flatmates (Celine, Paulina, Luuk, Davi and Nima) for your affection, friendship and support.

También quiero mencionar en este punto a aquellas personas que han marcado la diferencia en mi conocimiento sobre las abejas, la polinización y la biodiversidad terrestre, a las y los Drs. Cristina Botías, Amelia González, Ana Montero, Concepción Ormosa, Marta Bonet, Paloma Nuche, Jordi Bosch, Francisco Sánchez-Bayo, y a Luís Ferreirim, por su holística visión sobre la conservación del imprescindible servicio de la polinización, del papel de las abejas silvestres y por su divulgación. Muchas gracias también por la confianza que habéis depositado en mí, por todos los ánimos y el gran interés en este, y otros proyectos futuros.

En este sentido quiero agradecer también el esfuerzo de las muchas personas que forman las organizaciones de base como Greenpeace, Ecologistas en Acción y La Vía Campesina, y al panel de expertas y expertos del IPBES, entre algunas otras, porque su compromiso ha sido, y es, una fuente de inspiración, y sus rigurosos informes científico-divulgativos han sido, y serán, una herramientas útil y versátil para entender la complejidad de la crisis socio-ecológica a la que nos enfrentamos, como ciudadanas y científicas.

All my admiration to Alexandra Elbakyan (Kazakhstan) and all the team behind Sci-Hub, thank you "to remove all barriers in the way of science", thank you for facilitating my access to scientific

knowledge, thank you for your altruism and courage, for risking even your freedom for the common good and for the science for all. Without your platform it would not have been possible to finish this report.

Finalmente quiero mostrar mi enorme agradecimiento al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) por concederme esta ayuda pre-doctoral y a la Junta de Comunidades de Castilla la Mancha. Gracias al grupo SUPER-B (*Sustainable Pollination in Europe*), que a través de los fondos europeos “*COST Action FA1307*” financiaron mi segunda estancia en el L-MEB. También quiero agradecer a la coordinadora del Programa de Doctorado, la Dra. Manuela Fernández, su ayuda administrativa, su claridad y flexibilidad, y su dedicación para crear un grupo de estudiantes de doctorado capaces de aprender y hacer ciencia juntas, desde distintas disciplinas. Gracias también a la Dra. Anabel Vela y a Pedro Cobos por su ayuda administrativa. Asimismo quiero mostrar mi agradecimiento a todo el departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM y especialmente los equipos de las Dras. Guadalupe Miró, Sonia Olmeda y Dr. Félix Valcárcel, muchas gracias a Rocío, Valentina, Julia, Rosa y Ana, porque siempre os preocupáis por mi trabajo, por acogerme y hacerme un hueco rápidamente en la uni, y por compartir conmigo vuestros proyectos científicos.

Durante este tiempo ha habido un gran grupo de personas que, sin haber intervenido de forma directa en el desarrollo del trabajo han participado activamente en mi formación científica, y me han ayudado enormemente a lo largo de todo el camino.

Muchísimas gracias a mis compañeras y compañeros del CIAPA, vuestra compañía y acompañamiento durante estos últimos 4 años será parte de lo que recuerde siempre, eso que deja poso y te acompaña para siempre. Ha sido un placer trabajar en un equipo de investigación de un Centro Agrario Público. Realizar una labor preciosa, además de necesaria, en este momento histórico en el que tenemos la responsabilidad de trabajar para mejorar la alimentación de las personas, promocionando sistemas sostenibles, robustos y equitativos. Admiro vuestro trabajo y dedicación, gracias por compartirlo conmigo y por ayudarme en el proyecto de mi tesis.

Hace cuatro años poco sabía de apicultura, llegué con fascinación por estos comunales animalitos que nos regalan colores y dulces sabores para hacer la tesis doctoral, y nada sabía de otras actividades que se realizan en el CIAPA. Hoy, es honor haber participado en un centro en el que se recuperan especies locales, animales y vegetales, potenciando así la experiencia social y natural de una historia común de relación con el territorio. Gracias al Director, José Alberto Viñuelas, por todo su apoyo en esta tesis. Gracias por compartir la importancia de recuperar la historia agraria de los pueblos de Guadalajara y repartir simiente a quienes se proponen la bella tarea de conservar el sabor de su tierra. Gracias por haberme facilitado el camino, por escuchar mis proyectos y animarme a terminar hasta el último momento.

Muchísimas gracias a la Dra. Amelia González, por dejar que me asomara a tus microscopios a ver diminutas muestras de polen, por apoyarme en la búsqueda de nuevos proyectos, y por mantenerme siempre informada de las luchas de las y los apicultores y las calidad y trazabilidad de la miel. Gracias también a Inma, por enseñarme que nunca es tarde para aprender algo nuevo y contagiarme tus ganas de continuar haciéndolo con la minuciosa tarea palinológica. A Fede, por ser el doctor de mis ordenadores malitos, por todas las veces que me has recuperado documentos desaparecidos y todos tus consejos informáticos y trucos de comandos. A Félix por repasar conmigo la composición de los jarabes con plaguicidas organofosforados, me trajo de cabeza llegar a las ppb, gracias por tu ayuda. A todas las personas que han integrado el equipo de secretaria durante estos años y que tanto me han ayudado resolviendo todo el papeleo; a Aitor, Reme, Rebeca, Isabel y Luis, muchísimas gracias.

Es también un honor, y ha sido un gran aprendizaje, haber participado de un centro agrario en el que se trabaja con el suelo, buscando soluciones creativas para mantener su salud y fertilidad, sin deteriorarlo ni agotarlo. Gracias al Dr. Antonio López por compartir su pasión por los nematodos y la biofumigación, y por permitir que “sacara” las micorrizas del suelo de los invernaderos. A la Dra. Meri Jaizme (ICIA-Tenerife), gracias por enseñarme a hacerlo, y por tus abrazos y tus consejos.

Muchísimas gracias a los compañeros de Experimentación Agraria, A Carlos y a Jesús Escolano por compartir vuestros ensayos conmigo, por sembrar los márgenes florales para el ensayo de campo, por enseñarme a cribar garbanzos y llevarme de excursión a cosecharlos. Jesús, gracias por tu compañerismo y alegría campechana, por tener siempre tiempo para compartir conmigo tu sabiduría agraria, tus consejos sobre zanjas, patatas, conservas o las mejores cascadas de Guadalajara. A More, Antoñito, Esteban, Torres y Domingo, por las cosechas, los planteles y los consejos de riego por goteo. Gracias también a Juan y a Vicente por vuestra ayuda siempre que la he necesitado, por hacerlo siempre fácil y por vuestros consejos de carpintería, fontanería, soldadura o huerto. A Carlos, por su amistad haciendo llevaderas las deshoras de las tardes, y a Luisa y a Ketí por hacer del CIAPA un lugar habitable. Gracias a todas y todos por los desayunos en la garita y las mejores charlas en los talleres.

Gracias al equipo del Departamento de Transferencia de Tecnología Apícola y Formación, a Carmelo y Elena por compartir vuestra experiencia apícola y ayudarme a conseguir colmenas para seguir adelante. A Dieguito y Alberto, por vuestra disponibilidad siempre en la mielería. A José Luís, Fernando y Ana, por la cantidad de cursos que se imparten en el CIAPA. Una de las partes que más he disfrutado, ha sido el contacto directo con las personas que nos visitan buscando asesoramiento y encontrando resultados. Gracias también por confiar en los cursos que propuse.

Me llevo un montón de experiencias y aprendizajes de todas mis compañeras y compañeros del CIAPA, muchas gracias por haber compartido conmigo vuestras actividades y preciosos oficios, y por ayudarme también en mis proyectos personales. Con mis raíces urbanitas, mi pasión por los agrosistemas y mi convicción en lo que hacemos, voy a echar un montón de menos mirar por la ventana y ver los

campos cultivados del CIAPA, las colmenas trabajando, los pájaros y olores de Marchamalo, tractores de arriba abajo, cacharrear en el laboratorio, hablar de un montón de la lluvia que no llega y seguir aprendiendo qué es esto de la investigación en la agricultura y en la ganadería. Os voy a echar de menos.

Finalmente quiero agradecer a las personas menos visibles de este costoso trabajo, a las que de una manera u otra han formado parte y definitivamente lo han hecho posible. A ellas quiero dedicar la parte final de mis agradecimientos.

A dos grandes amigas (y profesionales científicas); a Anita, porque siempre puedo contar contigo, porque lo he podido hacer en este gran proyecto como lo he podido hacer en todo, por ser mi confidente y yo la tuya, por hacerme partícipe de los momentos más importantes de tu vida, por tu sinceridad aunque duela, por tu amor, tu respeto a la vida y tu enorme valentía. Finalizaste la tesis justo cuando yo la comenzaba, has sido mi guía a lo largo de todo el camino, mis manos a veces y un gran apoyo siempre, te quiero. A Cristina, por explicarme la estadística más básica y el sentido de los GLM y M y P y R y ayayay... por enseñarme a hacer una buena redacción estadística, por aconsejarme no poner nunca nada que yo no entienda, por haberte ofrecido e involucrado y justo antes de haberte necesitado, por tus 'ganas de leer la tesis', y las correcciones que ya has hecho, por enseñarme a hacer ciencia, por tus palabras calmas y tu experiencia como profe, tutora y directora, por conseguir que ame esta memoria, por estar sin querer destacar, por tu sororidad, tus abrazos y tus palabras, por los hechos que la apoya y por tu inmensa valentía en la vida. Gracias por hacerlo posible.

A mis compis de Biología, hortelanas, ecólogas y etnobotánicas asilvestradas, bioquímicos comesándwiches, neurobiólogas alocadas, microbiólogos contagiosos, bioinformáticos enredados, proteómicos tierraplanistas, antropólogos huesudos y sesudos, potabilizadoras no aptas para la sed, inmunólogos matasanos, polleros con bombín, ganaderos, agricultoras y cultivadores de saliva en placas Petri, des-educadoras de secundaria con las As en las pizarras, bichos con Sabia Bruta y sangre caliente, defensoras de la biodiversidad y el medio ambiente, investigadores de microondas y gente corriente, a todas vosotras por ser mi gran ejemplo científicamente probado, grandes profesionales y aventureras en sus ciencias, mentes fugadas y personas exiliadas en los 5 continentes, por amar el conocimiento, gracias por vuestro apoyo y ánimos, y por seguir de lejos y de cerca este proyecto.

A mis amigas y amigos del cole, por haber revoloteado una vez más a mi lado. Porque sois mi sol cuando me falla la energía, una brisita de aire fresco en momentos agotadores, el fuego de la vida divertida, y conseguís que las dificultades se diluyan en vuestra alegría. Gracias por haber formado, durante todos estos años, el rizoma que me apoya y en el que me apoyo tanto. Os amo a puñados.

A mis potorroamici, a las garruleras, y de muchas otras tierras, a todas ellas, gracias hermanas! Por vuestra participación directa en esta tesis (correcciones del inglés, dibujitos de abejas, estadística, ordenadores...), pero sobre todo, por vuestra presencia. Algunas más regaderas y otras mis cactus

etéreas, sois mis robustas jardineras cuando la maleza llega. Gracias por vuestro fresco cobijo, vuestra energía electrizante, por toda la ayuda y porque el baile nunca acabe.

También quiero agradecer la entrega de varias personas que han formado parte de este largo proceso de tesis doctoral, y que han hecho posible que pudiera dedicarme a él por completo, sin las cuáles mi formación no hubiera sido completa, o quizás no hubiera sido posible.

A Miguel, mi compañero de piso, por tu compañerismo infinito, por tu ayuda imprescindible, porque sin todo lo que has hecho por esta tesis y por mí sería imposible estar hoy aquí, por tu entrega y amor sin pedir nada a cambio, por quererme como soy, por tu paciencia, por tu calma, por hacer que los problemas sean solo trabas, por tu disponibilidad siempre, por tu alegría y musicalidad que son un regalo en mi vida, te quiero mazo mielmano. A ti Javi, por todos tus cuidados durante estos largos años, por tu complicidad y el amor mundano, por apoyar este proyecto siempre y conseguir que no tirara la toalla nunca, gracias por tu entusiasmo, por haberme hecho sentir que lo que hago es importante, por ver siempre lo mejor de mí e impulsarme a sacarlo, por tu confianza, por tu compañerismo, por nuestra especial forma de vibrar, a ti mi compinche muchas gracias por acompañarme hasta el final. Maite zaitut.

A mi familia, cada línea de esta tesis. Especialmente a mis padres, Txema y Almu, por la educación que me han dado. Desde muy pequeña me habéis fomentado la curiosidad, la capacidad de pensar y razonamiento crítico, la perseverancia y la importancia del equipo. Creo que cada una de estas cualidades son necesarias para realizar una tesis, y todo eso os lo debo a vosotras. Habéis hecho de mis preocupaciones las vuestras y os habéis desvivido siempre por ayudarme, sin vuestro apoyo incondicional siempre, y especialmente durante los últimos meses de escritura de este manuscrito, el proyecto no habría sido sostenible; dispuestos a todo lo que os hubiera pedido, o no, con tal de ayudarme y liberarme, para hacer posible que lo finalizara. Gracias por leeros esta memoria y por vuestras correcciones en el documento. El éxito es también vuestro. A Mayte e Ignacio, gracias por vuestro compañerismo y positivismo, por toda la confianza depositada en mí y saber que siempre estaréis ahí. A Raúl y a Sonia, gracias por hacerme sentir siempre como vuestra hermana. Y a Alejandra, Álvaro y Andrea por contagiarme de ilusión para intentar hacer de este mundo un lugar mucho mejor. Os quiero.

¡Muchas gracias a todas y todos!

¡Buena cosecha!



*Gracias a las abejas,
y a quienes cuidan de ellas*

La supervivencia de las abejas melíferas, el servicio de la polinización y gran parte de la biodiversidad terrestre están bajo amenazas de varios detractores de su salud.

En el declive de las colonias de *Apis mellifera* están implicados numerosos factores ambientales, zootécnicos y sanitarios que actúan combinadamente.

Tras 13 años desde su descubrimiento en *A. m. iberiensis*, el entomopatógeno *Nosema ceranae* se ha convertido en uno de los parásitos más prevalentes a nivel mundial.

A lo largo de esta tesis estudiamos factores determinantes del desarrollo de las nosemosis con el fin de estimar variaciones individuales de la enfermedad en distintos individuos de la colmena.

Integrando aspectos epidemiológicos, patológicos, fisiológicos y genéticos, se aborda el impacto de la nosemosis desde distintas perspectivas.

“In nature, nothing exists alone.”

Rachel Carson, *Silent Spring*

