



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

VCH - FC
Biotec
R 618
C = 1

“Gestión Sanitaria de colmenas para polinización: incorporación de metodologías de monitoreo y análisis”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MARIO ALCIDES RIVAS PEÑA

Director del Seminario de Título: Sharon Rodríguez Sandoval

Co-Director: Marnix Doorn

Profesor patrocinante: Orlando Muñoz

Mayo 2016

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

MARIO ALCIDES RIVAS PEÑA

“Gestión Sanitaria de colmenas para polinización: incorporación de metodologías de monitoreo y análisis”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Sharon Rodríguez Sandoval
Directora del Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Sharon Rodríguez Sandoval sobre una línea horizontal.

Ing. Marnix Doorn
Co-Director del Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Marnix Doorn sobre una línea horizontal.

Dr. Orlando Muñoz
Prof. Patrocinante

Firma manuscrita en azul de Orlando Muñoz sobre una línea horizontal.

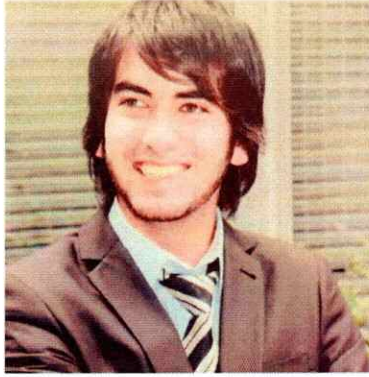
Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Michael Handford
Presidente

Firma manuscrita en azul de Michael Handford sobre una línea horizontal.

Dra. Claudia Stange
Evaluadora

Firma manuscrita en azul de Claudia Stange sobre una línea horizontal.



Mario Alcides Rivas Peña nació el 14 de marzo de 1992 en San Antonio, Región de Valparaíso. Hasta los 17 años vivió con su familia en el campo, en la comuna de Yungay, Región del Biobío, en donde, junto a su padre, aprendió a valorar el trabajo agrícola y apícola. A los 18 años, motivado por la ciencia que había aprendido de sus profesores de enseñanza media, ingresó a la carrera Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. En el camino, motivado por emprender y ayudar a que los resultados de la investigación científica impacten en la sociedad, ha participado de diversas iniciativas de investigación aplicada, innovación y emprendimiento del sector agropecuario y medioambiental.

"Los libros son las abejas que llevan el polen de una inteligencia a otra"

James Russell Lowell

Agradecimientos

Primero que todo deseo agradecer a mi familia, por estar siempre presente y apoyarme de forma incondicional, por creer en mí y darme la oportunidad de terminar este ciclo y comenzar uno nuevo.

Agradezco a la Fundación Fraunhofer Chile Research, a mis tutores y compañeros Marnix Doorn y Sharon Rodríguez, así como también al resto del equipo de la División de Agricultura, por confiar en mis capacidades, darme la posibilidad de crecer profesionalmente y apoyarme en mis labores.

Finalmente agradezco a todos mis amigos y amigas que me soportan y me dan la energía necesaria para seguir avanzando en mi camino.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo		Página
1	Introducción	1
1.1	Importancia de la polinización	1
1.2	Panorama en Chile	2
1.3	Principales patógenos apícolas y su impacto	7
1.3.1	<i>Varroa destructor</i>	7
1.3.2	<i>Acarapis woodi</i>	9
1.3.3	<i>Nosema</i> spp.	10
1.3.4	<i>Ascosphaera apis</i>	11
1.3.5	<i>Paenicillus larvae</i>	12
1.3.6	<i>Melissococcus plutonius</i>	13
1.3.7	Virus	13
1.4	Estado sanitario de las colmenas de <i>A. mellifera</i> en Chile	14
2	Materiales y métodos	17
2.1	Diseño del muestreo y obtención de muestras	17
2.2	Detección y cuantificación de patógenos	19
2.2.1	<i>V. destructor</i>	19
2.2.2	<i>Nosema</i> spp.	20
2.3	Análisis estadístico	21
2.4	Diseño de evaluación técnica económica	21
3	Resultados	23

3.1	Muestreo y diagnóstico	23
3.2	Evaluación de metodologías de diagnóstico basadas en biología molecular	31
3.2.1	PCR convencional	32
3.2.2	PCR múltiplex.	33
3.2.3	MLPA	35
3.2.4	Real-time PCR (qPCR)	36
3.3	Diseño del ensayo de qPCR	42
3.3.1	Revisión de la literatura y bases de datos	43
3.3.2	Elección de la secuencia blanco	43
3.3.3	Elección de partidores	44
3.3.4	Validación y optimización	46
3.4	Protocolo y presupuesto de diagnóstico múltiple de patógenos de abejas mediante ensayo de PCR en tiempo real cuantitativo	48
3.4.1	Muestreo	48
3.4.2	Extracción de ácidos nucleicos	48
3.4.3	qPCR multiplex	52
3.5	Implementación en un Monitoreo Nacional Apícola	53
3.5.1	Opciones de Financiamiento	53
3.5.2	Postulación para incorporarse como Laboratorio Autorizado por el SAG	54
3.5.3	Modelo de Negocios y ejecución de la propuesta	55
4	Discusión y proyecciones	58
5	Conclusiones	64
6	Bibliografía	65
	ANEXO	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Información por especie de cultivo frutícola	4
2	Principales especies de patógenos asociados a colmenas de <i>A. mellifera</i> en Chile	7
3	Promedio de los resultados obtenidos a partir del monitoreo y toma de muestras de las colmenas en cada huerto frutícola	25
4	Test de significancia de los valores de porcentaje de infestación con <i>Varroa</i> en distintos cultivos sometidos a función arcoseno	28
5	Test de Tukey de los valores de porcentaje de infección con <i>Nosema</i> en distintos cultivos sometidos a función logaritmo natural	30
6	Secuencias blanco, partidores directo (Fw) e inverso (Rv) y sus valores de Tm y %GC descritos en la literatura para los 10 principales patógenos apícolas	45
7	Análisis de fortalezas y debilidades (FODA) del Servicio de Diagnóstico	57
8	Carta Gantt de puesta en marcha del Servicio de Diagnóstico de plagas apícolas	57
9	Interpretación del grado de infestación con <i>Varroa</i> y <i>Nosema</i> en abejas	70
10	Presupuesto de análisis de muestras por qPCR	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Inspección de colmenas y toma de muestras	18
2	Contenedor con abejas y alcohol	20
3	Tamiz con abejas ordenadas para contar	20
4	Ácaros de <i>V. destructor</i> sobre tela	20
5	20 abdómenes de abejas depositados en un mortero para análisis de <i>Nosema</i> spp.	21
6	Abdómenes de abejas macerados con agua destilada	21
7	Esporas de <i>Nosema</i> spp. visualizadas dentro de cuadrículas de Cámara de Neubauer a un aumento de 400x	21
8	Gráfico de método utilizado para detección de <i>V. destructor</i> .	24
9	Porcentaje de muestras positivas solo para <i>V. destructor</i> , solo <i>Nosema</i> spp. y para ambos patógenos.	26
10	Prevalencia de <i>V. destructor</i> por cultivo (n = 93).	27
11	Porcentaje de infestación de abejas con <i>V. destructor</i> por cultivo.	28
12	Prevalencia de <i>Nosema</i> spp. en distintos cultivos frutícolas (n = 93).	29
13	Esporas de <i>Nosema</i> spp. por abeja por cultivo. Los cultivos con etiquetas con letras distintas tienen diferencias significativas de acuerdo a ANDEVA seguido de test de Tukey.	30
14	Gráfico de dispersión del número de esporas de <i>Nosema</i> spp. en función del porcentaje de infestación de abejas con <i>V. destructor</i> .	31
15	Cinética de la reacción de PCR en tiempo real. Se aprecia los puntos de CT para <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> , concluyéndose que habría mayor presencia de target de <i>N. ceranae</i> en la muestra analizada (Lourenco y col., 2008).	37
10	Curva de Valor de las principales técnicas para la detección y/o diagnóstico de patógenos en <i>A. mellifera</i> .	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPV: virus de la parálisis aguda

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosomal

BQCV: Virus de la celda real negra

CBPV: Virus de la parálisis crónica

DWV: Virus de las alas deformadas

EFSA: *European food safety authority*

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

IAPV: Virus de la parálisis aguda israelí

KBV: Virus kashimir

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

OIE: Oficina Internacional de Epizootias

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR cuantitativa

SAG: Servicio Agrícola y Ganadería

SBV: Virus de la cría ensacada

T_m: Temperatura de fusión (*melting*)

RESUMEN

La abeja de miel, *Apis mellifera*, es el polinizador más frecuentemente utilizado en huertos comerciales en la Región Metropolitana, sin embargo la población de estas abejas se enfrenta en la actualidad a patógenos como *Varroa destructor* y *Nosema* spp. los cuales afectan la vitalidad de la colmena y como consecuencia la eficiencia con que la abeja de miel poliniza los cultivos. Con el fin de establecer la condición sanitaria de las colmenas que se utilizan para polinización en huertos frutales de importancia económica como almendros, ciruelos, cerezos, kiwis y paltos de la Región Metropolitana, se recopiló información bibliográfica y se tomaron muestras de abejas durante el periodo de polinización de cultivos, sobre las cuales se determinó prevalencia y grados de infestación del ácaro *V. destructor* y el hongo *Nosema* spp. Como resultado se obtuvo que el 58,0% de las colmenas analizadas presentan *V. destructor* o *Nosema* spp., encontrándose que para *Nosema* spp. los valores más altos de prevalencia (80,0%) y n° de esporas por abeja ($16,03 \pm 17,45 \cdot 10^5$) en almendros, mientras que para *V. destructor* paltos presentó la mayor prevalencia (40,9%) y no se encontraron diferencias significativas en sus grados de infestación. Posteriormente, se realizó un análisis técnico-económico sobre los procedimientos que permitió elaborar un protocolo costo-eficiente de alta tecnología para el monitoreo y diagnóstico del estado sanitario de colmenas de *A. mellifera* destinadas a polinización. Se propuso la técnica de PCR en tiempo real para el análisis de los principales patógenos en *A. mellifera* por sus ventajas en cuanto a rapidez, sensibilidad, especificidad, y con la capacidad de cuantificar a un precio de \$25.267 por muestra y la posibilidad de implementar el servicio de análisis en cuatro meses.

ABSTRACT

The honeybee, *Apis mellifera*, is the most frequently used pollinator in commercial orchards in the Metropolitan Region of Chile, however, the population of these bees is now faced with pathogens like *Varroa destructor* and *Nosema* spp. These pests affect the vitality of the beehive and, consequently, the efficiency which the honeybees pollinate crops. In order to establish the health status of the beehives that are utilized for the pollination in orchards of economic importance such as almond, plum, cherry, kiwi, and avocado in the Metropolitan Region, we collected information from published sources and bee samples were taken during the pollinating season. From this, the prevalence and degree of infestation of *V. destructor* mite and *Nosema* spp. fungi was determined. As a result, it was found that 58.0% of the analyzed beehives have *V. destructor* or *Nosema* spp., with the highest prevalence of *Nosema* spp. (80.0%), and the number of spores per bee ($16.03 \pm 17.45 \cdot 10^5$) occurring in almonds. The highest prevalence of *V. destructor* (40.9%) was found in avocados and no significant difference in their degree of infestation was found. Subsequently, we performed a technical-economic analysis of the procedures for developing a cost-efficient high-tech monitoring and diagnosis of the health status of the beehives of *A. mellifera* intended for pollination. For real-time analysis of the major pathogens of *A. mellifera*, the PCR technique was proposed due to its advantages in terms of speed, sensitivity, specificity, and the ability to quantify at a price of \$25.267 per sample, and the possibility of implementing the analysis service in four months.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la polinización

La polinización de los cultivos agrícolas por abeja melífera (*Apis mellifera L.*) es un servicio ecosistémico que permite incrementar la cantidad y calidad de frutos y semillas de 39 de los 57 cultivos más importantes a nivel mundial, contribuyendo al 35% de la producción agrícola mundial (Klein y col., 2007).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estimó que de 100 especies de cultivo que proporcionan el 90% del alimento en el mundo, 71 se polinizan gracias a las abejas. Por su importancia, la existencia y conservación de las abejas son claves para mantener e incluso aumentar la producción mundial de estos alimentos. Gallai y col. (2009) calcularon que para el 2005 el valor económico global de la polinización equivalía a 153 mil millones de euros, el cual representaba el 9,5% del valor de la agricultura global; mientras que la pérdida de excedentes del consumidor asociado a la pérdida de polinizadores estaría entre 190 y 310 mil millones de euros al año. Solo en Estados Unidos la polinización por *A. mellifera* tiene un valor de 18,8 mil millones de dólares al año (Winfrey y col., 2007).

La mayor parte de los cultivos dependientes de polinización, como los frutales, contribuyen a la salud humana entregando grandes cantidades de nutrientes esenciales (Eilers y col., 2011; Ellis y col., 2015). Se ha demostrado que la polinización por abejas mejora el tamaño y cantidad de frutos, pero además aumenta la vida útil (*shelf life*) y el valor comercial dado por la intensidad de color y uniformidad de los

frutos (Klatt y col., 2014). Kennedy y col. (2013) muestran que para almendros, cerezas y arándanos la dependencia de polinizadores es alta (40-90%). El valor de una tonelada de cultivo dependiente de polinización es 5 veces más alto que el valor de una tonelada de cultivos no dependientes de polinización (Gallai y col., 2009). Además, se ha determinado que el número de hectáreas a nivel mundial de cultivos dependientes de polinización ha crecido más rápido que los que no requieren polinización, conllevando a un aumento en la demanda de polinización (Aizen y col., 2009).

Se ha descrito una disminución en la población de colmenas de *A. mellifera* en diferentes países (Gallai y col.; 2009; vanEngelsdorp y col., 2009; FAO 2014), la cual se ha atribuido a la acción de patógenos, plaguicidas, disminución de hábitats naturales, entre otros factores aún en estudio (Vanbergen, 2013). A pesar de que este hecho aún está en discusión, la principal preocupación es que el número de hectáreas de la mayoría de los cultivos de importancia comercial y con alto poder nutritivo aumenta más rápido que la población de las abejas, y por lo tanto la polinización y producción de estos cultivos podría estar amenazada (Aizen y col., 2009). Como consecuencia, se ha mencionado que la disminución de la población de polinizadores puede tener drásticas consecuencias en la salud de la población mundial (Ellis y col., 2015).

1.2 Panorama en Chile

Según datos de ProChile, nuestro país destaca a nivel mundial como el mayor exportador de arándanos, ciruelas frescas, ciruelas deshidratadas y manzanas

deshidratadas. Además, es el segundo mayor proveedor de paltas y frambuesas congeladas y el primer productor de cerezas frescas en el hemisferio sur. Todas estas frutas requieren o se ven beneficiadas por la polinización mediada por abejas y por lo tanto requieren del servicio de arriendo de colmenas para este propósito. Desde 1990 al 2013, la superficie de hectáreas de cultivo con alto valor comercial ha aumentado: en 128% en almendros, 447% en cerezos, 117% en ciruelos, 61% en manzanos y 344% en paltos (ODEPA 2013) y, a pesar de que el kiwi ha disminuido en hectáreas cultivadas, sigue siendo un rubro estratégico. En cuanto a su distribución geográfica, la actividad frutícola se extiende desde el extremo norte de Chile hasta la Región de Los Lagos, pero se concentra en la zona centro-sur donde se localiza más del 80% de la superficie plantada. La Región Metropolitana es la tercera región con mayor superficie de cultivos frutícolas, con 62.034,5 hectáreas.

Los principales frutales de interés comercial que se cultivan en la Región Metropolitana corresponden a almendros, cerezos, ciruelos, kiwi y paltos. Cada cultivo se beneficia de distinta forma de la polinización por abejas, y por lo tanto tiene distintos requerimientos de número de colmenas (Estay, 2013) y un periodo de floración determinado según la variedad del cultivo y su ubicación geográfica. El resumen de meses de floración, número de hectáreas (Ha) de cultivo y número de colmenas requeridas para rubros de interés económico en la Región Metropolitana, se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Información por especie de cultivo frutícola.

Cultivo	N° Ha RM	Requerimiento colmenas/Ha	Colmenas totales requeridas	Periodo de Floración
Almendra	3.412	10	34.120	Agosto
Ciruelo	4.574	10	45.740	Agosto-Septiembre
Cerezo	1.814	10 - 12	19.954	Septiembre-Octubre
Paltos	4.895	10	48.950	Octubre-Noviembre
Kiwi	536	10 - 12	5.895	Noviembre

En Chile se han desarrollado iniciativas que apuntan a la incorporación de mejores prácticas de polinización como el Acuerdo de Producción Limpia (APL) sobre polinización y la Norma Chilena INN 3255.C2011 (llamada Norma Chilena de Polinización), que determina que para que una colmena (llamada *colmena estándar*) pueda entregar un servicio de polinización a cultivos hortofrutícolas debe cumplir los requisitos siguientes:

- Colmena tipo Langstroth.
- Población de abejas: Tener al menos 8 marcos con abejas por ambos lados.
- Tener al menos 1 marco con cría abierta y 2,5 marcos con cría cerrada.
- Estar libre de enfermedades y plagas.

Este último punto de la norma es cuestionable teniendo en cuenta la presencia de numerosas plagas y enfermedades que afectan a las abejas y la escasa información que existe sobre su prevalencia en Chile.

Si bien no existen cifras oficiales en Chile, apicultores entrevistados en el Diario El Tipógrafo (2014) mencionan pérdidas de colmenas superiores al 40% en los últimos años, lo que se compara con las pérdidas registradas en Alemania que han sido de un

30% hace algunos años (Genersch y col., 2010) y de un 42,1% durante el 2014-2015 en EE.UU. (EurekAlert!, 2015).

El único trabajo que aborda la situación de sanidad apícola a nivel nacional está basado en el análisis de laboratorio de muestras de abejas adultas y crías en ocho regiones entre el 2004 y 2006, dentro del marco del proyecto fondo SAG 64, que determinó la incidencia y prevalencia de varroosis, nosemosis, acariosis y cría de tiza (Neira y col., 2007). Otras investigaciones realizadas en la provincia de Melipilla para determinar la prevalencia de *Acarapis woodi*, *Nosema spp.*, *Malpighamoeba mellificae*, *Varroa destructor* y *Braula spp.*, obtuvieron prevalencia mayor a la esperada según los registros actuales, y concluyen que es necesario ejecutar planes de control sanitario apícola a nivel nacional (Reinike, 2013; del Río, 2013). Martínez y col. (2012) estudiaron la presencia diferencial de *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en colmenas de la Región del Biobío, concluyendo que *N. ceranae* había desplazado a *N. apis* en la región y recalando la utilidad de técnicas basadas en biología molecular. Rodríguez y col. (2014) detectaron la presencia de tres especies de virus, además de *N. apis*, *N. ceranae* y *V. destructor*, en colmenas de la misma región pero sin poder cuantificarlos, mencionando la necesidad de desarrollar técnicas de detección de patógenos apropiadas.

El hongo *Nosema spp.* y el ácaro *V. destructor* son los principales factores bióticos que afectan negativamente la salud de las abejas a nivel mundial (EURL, 2011; vanEngelsdorp y col., 2009; OIE, 2012), sin embargo no existen estudios en Chile que analicen su prevalencia en colmenas que se utilizan para el servicio de polinización, por lo tanto la salud de estas colmenas y la calidad de su servicio es incierto.

Actualmente el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) no dispone de un protocolo de acceso público sobre metodologías estándar para el muestreo y diagnóstico de enfermedades y plagas apícolas, lo que deriva en asimetrías en la toma de muestras y manejo de datos respecto a sanidad apícola nacional. Según el último informe de sanidad animal del SAG (2012), la sospecha de enfermedades de denuncia obligatoria en Chile indicó que en un 45% se debió a parásitos, siendo *Nosema spp.* y *V. destructor* los principales responsables, mientras un 23% correspondía a causas desconocidas.

El manejo sanitario apícola en nuestro país es realizado por el propio apicultor quien generalmente diagnostica, determina y aplica el tratamiento (medicamento, momento y dosis) contra una plaga o enfermedad de la colmena, basado muchas veces en sintomatología poco precisa, sobre un calendario de aplicaciones de productos químicos, y utilizando fórmulas y metodologías no apropiadas. Esta situación requiere mejorar el manejo sanitario de las colmenas destinadas a polinización incorporando respaldo científico y técnico, y un monitoreo sistemático de plagas y enfermedades. Un manejo sanitario eficiente de las colmenas permitiría controlar plagas y enfermedades reduciendo los costos asociados a la aplicación injustificada y excesiva de medicamentos, evitando el surgimiento de resistencia a los productos químicos utilizados y pérdidas económicas por mortalidad de colmenas. Dada la importancia económica del rubro, es necesario evaluar la incorporación de tecnologías confiables y eficientes a un costo aceptable que permitan tomar decisiones objetivas y oportunas.

1.3 Principales patógenos apícolas y su impacto

Diversas especies (alejadas filogenéticamente) afectan distintas etapas de desarrollo de la abeja melífera, generando un impacto variable dentro de la colmena (Genersch y col., 2010; vanEngelsdorp y col., 2009). La Tabla 2 describe las principales especies de plagas y patógenos presentes en Chile (Neira y col., 2010; Martínez y col., 2010; Shafer, 2011; Rodríguez y col., 2014).

Tabla 2. Principales especies de patógenos asociados a colmenas de *A. mellifera* en Chile.

Tipo	Especie
Ácaro	<i>Varroa destructor</i>
	<i>Acarapis woodi</i>
Hongo	<i>Nosema ceranae</i>
	<i>Nosema apis</i>
	<i>Ascosphaera apis</i>
Bacteria	<i>Paenicillus larvae</i>
	<i>Melissococcus plutonius</i>
Virus	Virus de la parálisis aguda (ABPV)
	Virus de la celda real negra (BQCV)
	Virus de las alas deformadas (DWV)

1.3.1 *Varroa destructor*

Es un ácaro ectoparásito que ataca abejas adultas y larvas. Presenta distribución mundial siendo Australia el único país donde no se ha detectado (Rosenkranz y col., 2010; Sammantro y col., 2000).

El ácaro succiona la hemolinfa de las larvas que parasita desarrollando abejas con alas deformadas y bajo peso. Las abejas adultas que sobreviven al ataque tienen una vida más corta, sufren cambios en el comportamiento y un incremento en la susceptibilidad a enfermedades (OIE, 2012; Smith y col., 2014).

Se ha demostrado además que *V. destructor* actúa como vector de virus de abejas tales como el virus kashimir (KBV), virus de la cría ensacada (SBV), virus de la parálisis aguda (ABPV), virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) y el virus de las alas deformadas (WDV) (Manley y col., 2015; de Miranda y col., 2010; Boecking y Genersch, 2008; Dainat y col., 2011), aumentando incluso la prevalencia de los virus o cuadros virales (Yang y Cox-Foster, 2007). También se ha descrito que puede transmitir *M. plutonius*, a través de sus mordeduras (Kanbar y Engels, 2003).

La forma de contagio es por el contacto de abejas parasitadas con abejas sanas producido por pillaje de colmenas sanas a débiles o por ingreso de zánganos o abejas pecoreadoras infestadas en colmenas sanas. Se asume un aumento del contagio en condiciones de campo en que existe una alta densidad de colmenas de distinto origen, tal como se presenta durante el servicio de polinización.

La varroosis es el principal problema sanitario de importancia económica que afecta a las abejas melíferas ya que requiere costosos acaricidas para su tratamiento (colmenas no tratadas derivan en muerte de abejas) (Neira y col., 2007; Rosenkranz y col., 2010; Smith y col., 2014). Ante la sospecha de su presencia el SAG indica que se debe denunciar de forma obligatoria en sus oficinas; luego esta institución emite informes periódicos a la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) sobre su prevalencia. Si bien no existen cifras oficiales, mediante el método del doble tamiz, del Río (2013) registró una prevalencia en la Región Metropolitana de un 88% en el 2012 con una tasa de infestación del 0,2 al 26,3%.

Es fundamental aplicar un plan de control cuando se sobrepasan niveles críticos de varroosis, que en Chile corresponde a un porcentaje de infestación de un 5% para

ácaros en abejas adultas (Shafer, 2011). El SAG autoriza el control de varroosis con los compuestos flumetrina, amitraz, timol, levomentol, aceites de eucaliptus y alcanfor, en formulaciones específicas para abejas (SAG, 2012).

Un tratamiento acaricida contra varroosis puede tener un valor entre \$600 y \$1.000 por colmena y se debe aplicar en todas las colmenas del apicultor tres veces al año, una vez detectada su presencia. Asimismo, si no se realiza un monitoreo, se puede estar adicionando acaricidas en exceso y por lo tanto puede ser una pérdida de dinero, que además podría generar resistencia si no se suministra en dosis adecuadas, y que por último, pueden dejar residuos en productos extraídos de la colmena como miel, cera o propóleos (Hinojosa y González, 2004). La forma más común de cuantificación es por recuento de ácaros caídos luego de aplicar un acaricida o por el método del doble tamiz (Shafer, 2011; OIE, 2012).

1.3.2 *Acarapis woodi*

Es un pequeño ácaro que vive en las tráqueas de las abejas melíferas adultas, alimentándose de la hemolinfa del hospedero. No produce síntomas característicos aunque cuando la infestación es alta puede producir disminución en el tamaño de la colonia. La infección se extiende de una abeja a otra por contacto directo, similar a *V. destructor*. La dificultad para su detección a simple vista complica el diagnóstico y la cuantificación de este patógeno por parte del apicultor (Sammantro y col., 2000; Sammantro y col, 2013). El método más común de observación consiste en la disección y procesamiento de abejas para visualización en microscopio, procedimiento no utilizado frecuentemente por apicultores.

Su presencia es de denuncia obligatoria en Chile y se debe notificar a la OIE su prevalencia. En el año 2012 se produjo un evento de rechazo de exportación de reinas por detección de este patógeno.

No existen tratamiento específicos contra *A. woodi* registrados en nuestro país, sin embargo algunos acaricidas contra *varroa* podrían ayudar en su control.

1.3.3 *Nosema spp.*

Nosema apis es un microsporidio perteneciente al Reino Fungi, causante de nosemosis tipo A. La infección de *N. apis* se produce cuando abejas adultas ingieren esporas a través de la alimentación o labores de limpieza, llegando al ventrículo de la abeja donde germinan y se diseminan (Chen y col., 2009). Puede atacar las reinas causando un menor desarrollo de los ovarios y produciendo infertilidad, y reducir la esperanza de vida de las obreras en un 22-44%. Además, se ha descrito una reducción en la capacidad de polinizar en abejas infectadas con *N. apis* (Lach y col., 2015). Algunos síntomas reconocidos de la enfermedad son la disminución en la capacidad de vuelo, diarrea y debilidad general causada por malnutrición (OIE, 2012). Su desarrollo es estacional, disminuyendo su germinación y dispersión durante el invierno.

Nosema ceranae es la causante de nosemosis tipo C y tiene aspectos patológicos muy similares a *N. apis*. Sin embargo, *N. ceranae* no es estacional y no provoca diarrea. Se ha descrito a *N. ceranae* como el agente responsable de episodios de pérdidas masivas de colmenas en España, presentando mayor virulencia que *N. apis* (Bourgeois y col., 2010; Chen y col., 2009), llegando incluso a establecerse que *N. ceranae* estaría desplazando a *N. apis* como agente infectivo (Chen y col., 2009; Martínez y col., 2012).

Se ha descrito, además, una inmuno-supresión en las abejas causada por la infección con *N. ceranae*, haciéndolas más susceptibles al ataque de otros patógenos como virus o el ectoparásito *Varroa* (Antúnez y col., 2009).

Para ambas especies, el método más común de detección y cuantificación de esporas (sin diferenciación a nivel de especies) consiste en la disección de abejas y procesamiento para ser observadas bajo microscopio; sin embargo no es un procedimiento manejado por los apicultores (OIE, 2012; Hinojosa y González, 2004; Neira y col., 2007). Si bien no existen cifras oficiales, se ha descrito que la prevalencia de *Nosema* spp. en la Provincia de Melipilla era de un 51% en el 2012 (Reinike, 2013).

Actualmente, tanto *N. ceranae* como *N. apis* son combatidos únicamente a través de la aplicación de fumagilina, un antibiótico que, como efecto secundario, altera la estructura y metabolismo de las proteínas del intestino de las abejas, incluso a concentraciones insuficientes para erradicar este microorganismo (Huang y col., 2013). El uso de este antibiótico está prohibido en nuestro país, sin embargo frente a su importancia se comercializa a través de algunas empresas a un precio prohibitivo (\$100.000 c/u aproximadamente para 50 colmenas). Esto conlleva a formas de control descoordinadas y sin regulación.

1.3.4 *Ascosphaera apis*

A. apis es un hongo infeccioso que causa la enfermedad conocida como cría yesificada (Evans, 2006). La sintomatología describe presencia de crías muertas en las celdillas con textura de yeso, y una postura salteada en los marcos con cría. Si bien las abejas adultas no son afectadas por este patógeno, éstas juegan un rol importante en su

dispersión: las abejas pecoreadoras pueden llevar esporas, traspasarlas a las abejas nodrizas a través de contacto boca a boca y éstas a su vez a las larvas cuando las alimentan. Se desconoce la prevalencia en Chile, pero sigue siendo un agente de importancia económica al perjudicar tanto la biología de la colmena como contaminaciones en la cera.

1.3.5 *Paenicia larvae*

P. larvae es el agente causal de Loque Americana, la enfermedad bacteriana más severa que afecta a las abejas melíferas ya que es altamente infecciosa, provocando un descenso en la población de las colonias afectadas (Martínez y col., 2010; Han y col., 2008). Este microorganismo afecta a las larvas expresando una sintomatología característica en los marcos con cría operculada, lo cual se usa como diagnóstico de campo (Martínez y col., 2010). En laboratorio se realiza el cultivo microbiológico para la cuantificación de las esporas infectivas.

La presencia de la enfermedad es de denuncia obligatoria en Chile y de notificación obligatoria a la OIE, sin embargo, en la práctica, esto difícilmente se cumple debido a las drásticas medidas aplicadas por el SAG en algunos casos (Danty, 2007). La Resolución N° 3.329, del 13 de julio de 2007, establece las medidas sanitarias para el control nacional de loque americana, indicando que el SAG está facultado para la restricción de movimiento de apiarios, colmenas y material apícola y la eliminación física de colmenas afectadas por Loque Americana.

El método más efectivo utilizado para controlar la bacteria es quemar las colmenas del apiario en donde se han detectado síntomas clínicos con el fin de evitar el contagio de apiarios cercanos (SAGARPA, 2000).

1.3.6 *Melissococcus plutonius*

M. plutonius es el agente bacteriano causante de la enfermedad Loque Europea que afecta a las larvas. A pesar de no producir esporas, esta bacteria puede perdurar por años sobreviviendo en las paredes de las celdas o restos larvarios, siendo transmitida a la vez por las abejas con labores de limpieza de la colmena. Además, se ha descrito que puede ser transmitida a través de las lesiones provocadas por la succión de *V. destructor* (Kanbar y Engels, 2003). Los síntomas clínicos pueden confundirse con los de la Loque Americana u otras enfermedades de la cría, y por lo tanto es difícil determinar en condiciones de campo a qué microorganismo corresponde y tomar acciones al respecto. La enfermedad es de denuncia obligatoria en Chile y se debe notificar su prevalencia a la OIE sobre.

En Chile, tanto para Loque Europea como Loque Americana se desconoce su grado de prevalencia, a pesar de ser considerados agentes de importancia económica por su alto potencial de propagación e impactar negativamente la sobrevivencia de las colmenas.

1.3.7 Virus

A la fecha, 18 virus de abejas han sido descritos y caracterizados en la literatura, y otros han sido sugeridos como posibles agentes infecciosos (Chen y Siede, 2007; Chantawannakul y col., 2006). A pesar de la abundancia de los virus presentes en las

abejas y la amplia distribución mundial, los más estudiados son el virus de la parálisis aguda (ABPV), parálisis crónica (CBPV), celda real negra (BQCV), alas deformes (DWV), parálisis aguda israelí (IAPV), virus kashimir (KBV) y el virus de la cría ensacada (SBV), todos correspondientes a virus de ARN monocatenario (Siede y col., 2008; Chen y Siede, 2007; Rodríguez y col., 2014; de Miranda y col., 2010).

Los virus pueden transmitirse de forma vertical desde la línea materna hacia las crías a través de la superficie o dentro de los huevos, y de forma horizontal, entre individuos de la misma colmena a través de la comida o por aire (Chen y Siede, 2007). La mayoría de estos virus pueden presentarse como infecciones persistentes en colmenas aparentemente sanas, pero bajo ciertos estímulos pueden causar infecciones agudas y hasta mortales, pudiendo vincularse con eventos de pérdidas masivas de colmenas (vanEngelsdorp y Meixner, 2010; Smith y col., 2014). Algunos de los síntomas antes atribuidos a *V. destructor* ahora son reconocidos por ser provocados por virus, como es el caso de las alas deformes causado por el DWV. Su prevalencia no se encuentra analizada para nuestro país sin embargo se ha reportado su presencia en Chile (Barriga y col., 2012; Rodríguez y col., 2014)

Se ha identificado la necesidad de realizar un monitoreo de virus y otros patógenos no solo por su importancia en la salud de las abejas melíferas, sino también para proteger a los polinizadores nativos (Siede y col., 2008; Manley y col., 2015).

1.4 Estado sanitario de las colmenas de *A. mellifera* en Chile

El contagio de patógenos y plagas se potencia con una alta densidad de colmenas en apiarios o agrupaciones destinadas a la polinización comercial por presencia de

colmenas de más de un apicultor en un mismo huerto, situación que aumenta el contacto entre especímenes infectados y no infectados, pudiendo infectar a colonias vecinas e incluso a polinizadores nativos (Manley y col., 2015).

En general, estas enfermedades han sido históricamente diagnosticadas a través de una combinación de métodos: detección (generalmente tardía) de síntomas macroscópicos en colonias con alto grado de infestación, y el análisis de muestras en laboratorio. Sin embargo, existen desventajas asociadas al diagnóstico macroscópico ya que, en el caso de Loque Americana, puede ser confundida con Loque Europea o incluso con otras anomalías en la cría y que presente una sintomatología similar. Por su parte, la infección con *N. ceranae* parece no demostrar síntomas clínicos pero *N. apis* sí los presenta, además, el análisis bajo microscopio óptico no permite discriminar a nivel de especie las esporas observadas. En el caso de virus, solo algunos presentan sintomatología y no pueden ser analizados por microscopio óptico.

Nosema spp. y *V. destructor* son los principales patógenos que afectan negativamente la salud de las abejas, teniendo un importante impacto económico en la apicultura mundial y nacional (EURL, 2011; vanEngelsdorp y col., 2009; OIE, 2012; Neira y col., 2010). Solo para estos agentes existen productos veterinarios accesibles en Chile y por lo tanto se pueden desarrollar estrategias de manejo sanitario apícola en base a monitoreo. Sin embargo, existe la posibilidad de un efecto sinérgico con otros patógenos cuya presencia y nivel de infestación aún no está claro.

Diversos estudios han concluido que el Síndrome del Colapso de las Colmenas (SCC) o mortalidades invernales de colonias se pueden producir por la interacción de diversos patógenos, factores ambientales y exposición a pesticidas, entre otros (vanEngelsdorp

y col., 2009; de Miranda y col., 2010; Smith y col., 2014). Se ha estudiado por ejemplo la combinación entre distintos patógenos, tales como del virus IVV con *N. ceranae*, el virus DWV con *V. destructor*, la relación de *N. ceranae* con el virus DWV, entre otros (Yang y Cox-Foster, 2007; Doublet y col., 2015; de Miranda y col., 2010; Martínez y col., 2014). Diversas iniciativas de investigación han surgido alrededor del mundo con el fin de estudiar estos temas dado el impacto que tienen las abejas y la polinización (Moritz y col., 2010; Vanbergen, 2013; Lach y col., 2015).

Reconocer un origen multifactorial de los problemas sanitarios de las colmenas permite indagar en la forma en que se relacionan estos factores abandonando los análisis aislados. Para alcanzar esta meta es necesario incorporar metodologías costo-eficientes a las técnicas de diagnóstico actuales que permitan mejorar la gestión sanitaria apícola nacional. Esto es abordado en el presente trabajo.

Hipótesis: La incorporación de técnicas de biología molecular para el diagnóstico de patógenos, sumado a una optimización de los protocolos de muestreo y análisis, permitirá aumentar la eficiencia de la gestión sanitaria y salud de las colmenas que se utilizan para polinización de huertos frutales.

Objetivo general: Maximizar la gestión sanitaria apícola de colmenas que se utilizan para polinización en la Región Metropolitana, incorporando nuevas metodologías costo-eficientes de monitoreo y análisis de plagas y enfermedades.

Objetivos específicos:

1. Diagnosticar las principales enfermedades que afectan a colmenas que prestan el servicio de polinización.
2. Evaluar la incorporación de técnicas de diagnóstico de patógenos basados en biología molecular en la gestión sanitaria apícola.
3. Diseñar un protocolo de muestreo y análisis de las principales enfermedades y plagas apícolas.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño del muestreo y obtención de muestras

Se llevó a cabo un muestreo de colmenas que se utilizaron en el servicio de polinización en la Región Metropolitana con el fin de establecer un diagnóstico de las principales enfermedades y plagas que las afectan. Se tomaron muestras de colmenas en huertos de almendros, ciruelos, cerezos, kiwis y paltos durante el periodo de floración, entre los meses de agosto y octubre del año 2014. Se muestreó aproximadamente un 10% de las colmenas que se encontraban polinizando en el huerto frutícola, eligiendo colmenas de forma aleatoria distribuidas en distintas zonas del campo.

En recipientes de plástico herméticos de 300 ml rotulados, se colectaron alrededor de 150 abejas adultas desde la periferia de marcos con crías mediante el método de arrastre (Fig.1) (Genersch y col., 2010). Cada frasco rotulado se almacenó en una nevera con hielo en condiciones de campo para su posterior almacenamiento a -20°C en laboratorio.



Figura 1. Inspección de colmenas y toma de muestras.

Se registró si presentaban síntomas visibles de alguna enfermedad o comportamiento anómalo y se incluyeron otros parámetros de relevancia como densidad y distribución de colmenas en huerto y georreferenciación.

En forma paralela se realizó una encuesta escrita a cada apicultor sobre el manejo sanitario de sus colmenas y condiciones generales de polinización.

2.2 Detección y cuantificación de patógenos

A partir de las muestras de abejas colectadas en cada colmena se realizó un análisis cuantitativo de laboratorio para determinar la presencia de *Nosema* spp., y *V. destructor*.

2.2.1 *V. destructor*

Desde el recipiente original conteniendo cada muestra, se llevaron a otro recipiente alrededor de 100 abejas donde se les adicionó alcohol al 75% hasta superar el volumen de abejas y luego se agitaron por 1 min para provocar el desprendimiento de los ácaros adheridos (Fig. 2). Posteriormente el contenido del recipiente se vació en un tamiz de 2,8 mm que se encontraba sobre una tela blanca, quedando las abejas sobre el tamiz y los ácaros sobre la tela. Finalmente se procedió a ordenar los individuos y realizar el conteo de las abejas y ácaros tal como se ilustra en las figuras 3 y 4.

El porcentaje de infestación se obtuvo del cociente entre el número de ácaros y el número de abejas analizadas, multiplicado por cien. Este procedimiento es el recomendado tanto por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como por el "COLLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research" para el diagnóstico en terreno (Dietemann y col., 2013; OIE, 2012).



Figura 2. Contenedor con abejas y alcohol.



Figura 3. Tamiz con abejas ordenadas para contar.

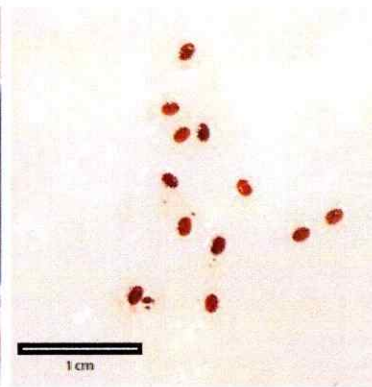


Figura 4. Ácaros de *V. destructor* sobre tela.

2.2.2 *Nosema* spp.

A partir del recipiente de cada muestra se tomaron 20 abejas, se cortaron los abdómenes con bisturí y pinzas, depositándolos en un mortero y adicionando 5 ml de agua destilada y posteriormente macerando el contenido, obteniéndose un producto homogéneo (Figs. 5 y 6). A partir de esta solución se extrajo una alícuota de 15 μ l con una micropipeta p100, la cual se dispuso en una cámara de Neubauer y se observó bajo microscopio con un aumento de 400x para hacer el recuento de esporas (Fig. 7). Una vez realizado el recuento de esporas, se procedió a calcular el número de esporas por abejas ocupando la siguiente fórmula recomendada por la OIE (OIE, 2012):

$$Z = \alpha/\beta \times \delta \times 250.000$$

Dónde:

Z = número de esporas por abeja

α = total de esporas contadas

β = número de cuadros observados

δ = factor de dilución



Figura 5. 20 abdómenes de abejas depositados en un mortero para análisis de *Nosema* spp.



Figura 6. Abdómenes de abejas macerados con agua destilada.

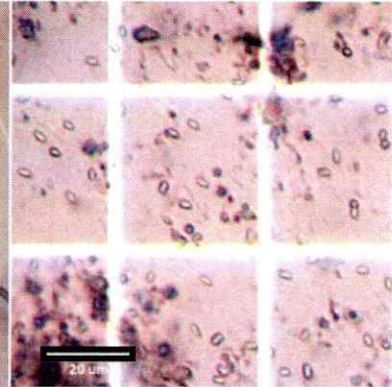


Figura 7. Esporas de *Nosema* spp. visualizadas dentro de cuadrículas de Cámara de Neubauer a un aumento de 400x.

2.3 Análisis estadístico

Los valores de porcentaje de infestación con *Varroa* fueron transformados con la función arcoseno de la raíz cuadrada y sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y test de Tukey para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de cultivos. A su vez, los resultados de número de esporas de *Nosema* spp. por abeja se transformaron a logaritmo natural para ANDEVA. Para estos análisis se utilizó el software STATISTICA 12.5.

2.4 Diseño de evaluación técnica económica

Se realizó una búsqueda en el estado del arte de metodologías basadas en técnicas de biología molecular para optimizar el diagnóstico de patógenos que afectan a *A. mellifera* y desarrollar una línea base para generar un protocolo. La información fue recopilada desde bases de datos de publicaciones científicas a nivel internacional.

Luego se realizó una comparación de metodologías basadas en técnicas de biología molecular apuntando a evaluar y seleccionar las metodologías más precisas, rápidas, sensibles, rentables y fáciles de implementar técnicamente. Para esto se realizaron cotizaciones de equipamiento e insumos de laboratorio y aproximaciones sobre el costo en el análisis de muestras, que permitió establecer un precio por servicio de análisis costo-eficiente y de fácil acceso para los productores apícolas que se dedican al servicio de polinización en la Región Metropolitana.

Finalmente como producto se propone un protocolo de monitoreo y diagnóstico costo-eficiente incorporando nuevas tecnologías apuntando a mejorar el Sistema Sanitario Apícola y la gestión de colmenas que se utilizan para el servicio de polinización.

3 RESULTADOS

3.1 Muestreo y diagnóstico

Se colectaron muestras de 93 colmenas que prestaron servicio de polinización en 13 huertos frutales de la Región Metropolitana durante la temporada 2014. Se obtuvieron datos de colmenas dispuestas en 2 huertos de almendro, 1 huerto de ciruelo, 3 huertos de cerezo, 4 huertos de palto y 1 huerto de kiwi. Las colmenas muestreadas corresponden a 11 apicultores, 2 de los cuales polinizaron dos huertos frutícolas.

El 100% de los apicultores son profesionales (dueños de más de 100 colmenas), de los cuales un 75% tiene 500 o más colmenas y el resto tienen menos de 500 colmenas.

El valor de arriendo por colmena por el periodo de polinización varió entre los \$7.500 y los \$17.850 IVA incluido (Tabla 3), siendo paltos el rubro que más paga en promedio (\$16.660), mientras que un huerto de cerezos paga el menor valor de arriendo. Cabe destacar que en un huerto de paltos se encontraban colmenas polinizando pero no se pagaba arriendo por ellas.

Del total de apicultores, un 92% declara que utilizará las colmenas con las que está polinizando para producir miel.

El 100% de los apicultores manifestó tener varroosis en sus colmenas, pero la forma de diagnóstico era variable (Fig. 8). En cuanto a métodos de control se encontró una amplia gama de productos aplicados y frecuencia de aplicación. El componente activo más utilizado en contra de *V. destructor* fue amitraz.

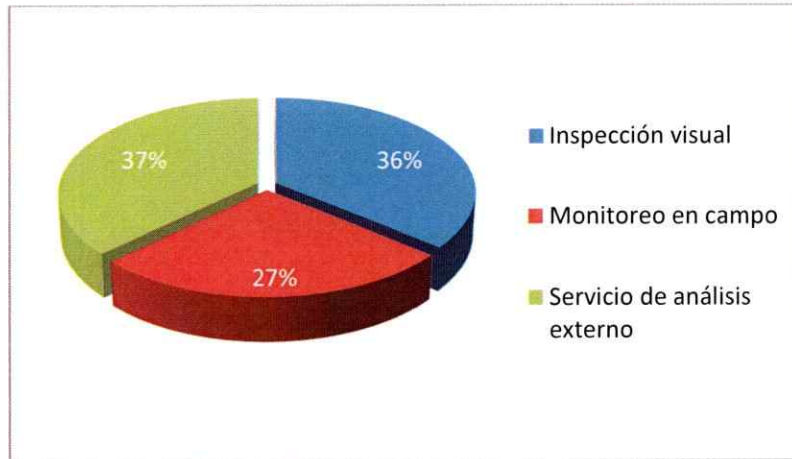


Figura 8. Gráfico de método utilizado para detección de *V. destructor*.

En cuanto a la presencia de *Nosema* spp., el 36,3% de los apicultores manifestaron un diagnóstico positivo en sus colmenas, mientras el resto dice no tener información al respecto. La forma de diagnóstico es variable, siendo ejecutada por personal de Indap, diagnóstico propio mediante microscopio o mediante un servicio externo de análisis, no siendo excluyentes. El componente activo más utilizado para el tratamiento de *Nosema*, incluso de forma preventiva, fue fumagilina.

El resumen de datos recopilados durante el monitoreo así como también de la interpretación de los resultados de análisis de laboratorio obtenidos, se presenta en la tabla 3. Se puede apreciar que en promedio, el grupo de colmenas analizadas en cada huerto frutícola no cumple con el requisito de estar libre de enfermedades tal como lo especifica la Norma Chilena de Polinización.

Tabla 3. Promedio de los resultados obtenidos a partir del monitoreo y toma de muestras de las colmenas en cada huerto frutícola.

Huerto	Nº colmenas muestreadas	\bar{X} Nivel de Infestación por <i>Varroa</i> ¹	\bar{X} Nivel de Infección por <i>Nosema</i> ^{1,2}	Cumple NCh3255 (si/no) ³	Precio de arriendo/ colmena (CLP)
Almendo 1	6	Medio	Muy grave	No	9.000
Almendo 2	4	Muy leve	Muy leve	No	9.000
Ciruelo 1	5	Muy leve	Muy leve	No	8.000
Cerezo 1	8	Muy leve	Leve	No	7.500
Cerezo 2	10	Medio	Muy leve	No	9.000
Cerezo 3	6	Medio	Leve	No	9.000
Palto 1	12	Leve	Muy leve	No	13.000
Palto 2	10	Leve	Leve	No	0
Palto 3	5	Leve	ND	No	17.850
Palto 3	5	Leve	ND	No	17.850
Palto 4	6	Leve	Leve	No	15.470
Palto 4	6	Leve	Muy leve	No	15.470
Kiwi 1	10	Muy leve	Leve	No	9.000
Promedio	-	Leve	Leve	No	10.780

¹Niveles de infestación corresponden a la categorización de los porcentajes de infestación por *Varroa* y número de esporas de *Nosema* por abeja. Ver Anexo.

²El resultado ND (no detectado) significa que no se observaron esporas de *Nosema spp.*, sin embargo no significa necesariamente que la colmena esté libre de infección.

³NCh3255.C2011 corresponde a la Norma Chilena para la calidad de la colmena de polinización. Para que una colmena cumpla la norma debe cumplir con todos los requisitos.

La prevalencia, nº de muestras con diagnóstico positivo respecto de la población total muestreada, de *V. destructor* y *Nosema spp.* corresponde a 30,1% y 40,9%, respectivamente. Del total de muestras analizadas, un 29,0% estaba infectado solo con *Nosema spp.*, un 17,2% estaba infestado solo con *V. destructor*, mientras en un 11,8% de los casos se detectó la presencia de ambos patógenos (Fig. 9).

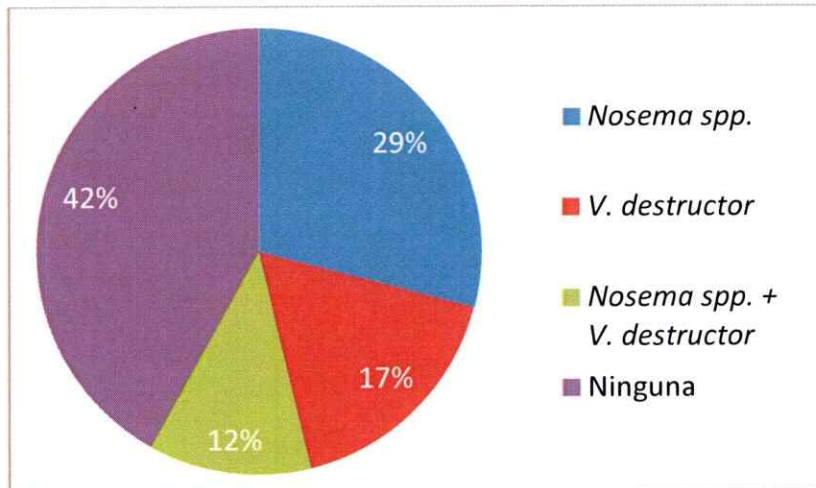


Figura 9. Porcentaje de muestras positivas solo para *V. destructor*, solo *Nosema* spp. y para ambos patógenos.

En colmenas que prestan el servicio de polinización en la Región Metropolitana se puede apreciar que en 42,0% de las muestras analizadas no se detectó la presencia de los principales patógenos que afectan a las abejas de la miel, *Varroa* y *Nosema*. Al menos el 58% de estas colmenas no cumpliría con el requisito de estar libres de enfermedades.

Al realizar el análisis estadístico se obtuvieron las prevalencias de *V. destructor* por cultivo: 40,0% en almendros, 25,0% para cerezos, y 40,9% para paltos (Fig. 10). Las muestras provenientes de cultivos de ciruelo y kiwi no presentaban infestación por *Varroa*.

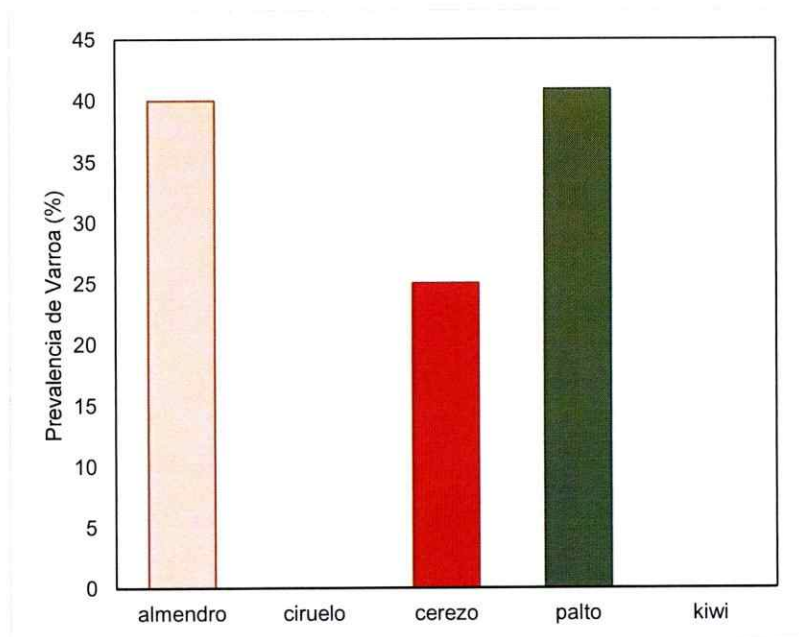


Figura 10. Prevalencia de *V. destructor* por cultivo (n = 93).

En almendros se registró un porcentaje de infestación por *Varroa* de $0,89 \pm 1,31\%$, $0,66 \pm 1,73\%$ en cerezos y $0,43 \pm 0,67\%$ en paltos (Fig. 11). Al someter estos valores a análisis de varianza indicaron que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,127$) entre los distintos tipos de cultivos (Tabla 4).

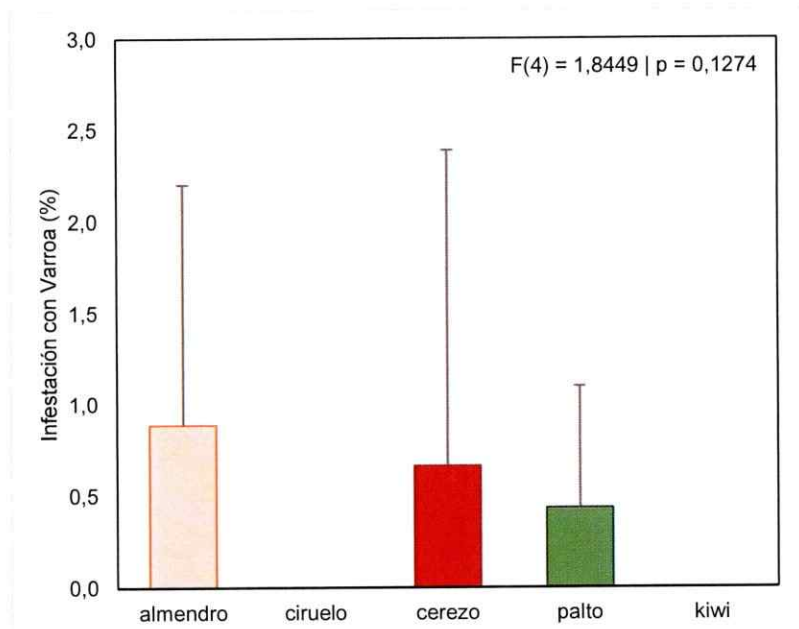


Figura 11. Porcentaje de infestación de abejas con *V. destructor* por cultivo.

Tabla 4. Test de significancia de los valores de infestación por Varroa en distintos cultivos sometidos a función arcoseno.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Cultivo	83,1442	4	20,7860	1,84494	0,127364
Error	991,4526	88	11,2665		

Cabe distinguir que el porcentaje de infestación con *Varroa* se refiere a la carga (n° de acaros) por muestra (n° de abejas adultas), a partir de la cual obtiene un valor promedio, mientras que la prevalencia se refiere a la frecuencia de muestras positivas respecto del total.

Para *Nosema spp.* se registraron las siguientes prevalencias por cultivo: 80,0% en almendros, 20,0% para ciruelos, 29,2% para cerezos, 38,6% para paltos y 50,0% para kiwis (Fig. 12).

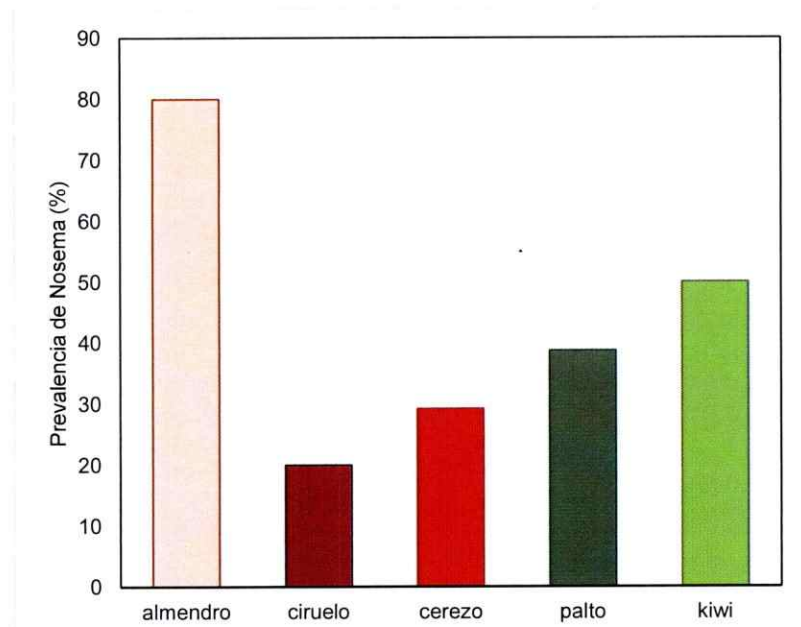


Figura 12. Prevalencia de *Nosema spp.* en distintos cultivos frutícolas (n = 93).

En cuanto al nivel de infección por *Nosema* se registró un número de esporas por abeja de $16,03 \pm 17,45 \cdot 10^5$ en almendros, $0,05 \pm 0,11 \cdot 10^5$ en ciruelos, $1,44 \pm 3,30 \cdot 10^5$ en cerezos, $4,30 \pm 10,98 \cdot 10^5$ en paltos y $7,53 \pm 21,64 \cdot 10^5$ en kiwis. Los valores de número de esporas de *Nosema* por abeja no cumplen con los requisitos de normalidad y homocedasticidad, por lo cual se transformaron los valores con función logaritmo natural para el análisis de varianza. Se registró una diferencia estadísticamente significativa entre el número de esporas de *Nosema* por abeja entre los distintos cultivos ($p = 0,0283$) (Fig. 13).

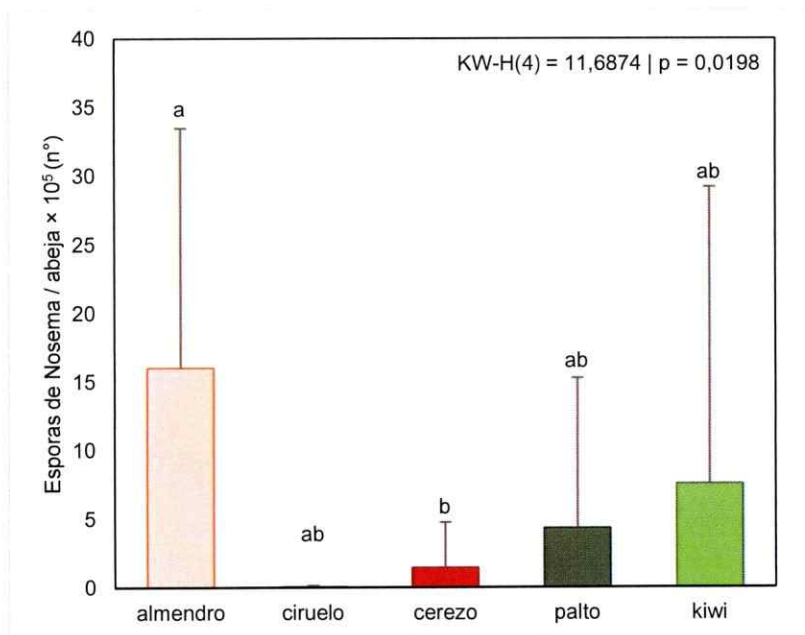


Figura 13. Esporas de *Nosema* spp. por abeja por cultivo. Los cultivos con etiquetas con letras distintas tienen diferencias significativas de acuerdo a ANDEVA seguido de test de Tukey.

El menor valor corresponde a la comparación entre almendro y cerezo ($p = 0,022$), por lo tanto es entre estos dos cultivos dónde existe la mayor diferencia en el grado de infección con *Nosema* (Tabla 5).

Tabla 5. Test de Tukey de los valores de porcentaje de infección con *Nosema* en distintos cultivos sometidos a función logaritmo natural.

	Almendro	ciruelo	cerezo	palto	kiwi
almendro					
ciruelo	0,078732				
cerezo	0,022296	0,983298			
palto	0,059848	0,852449	0,920949		
kiwi	0,431812	0,749030	0,830752	0,984248	

Finalmente, al realizar un análisis de regresión lineal entre el porcentaje de infestación por *Varroa* y los valores de infección con *Nosema* se obtuvo $R^2 = 0,0278$, indicando que no existe una correlación estadísticamente significativa entre estos parámetros.

Con el fin de conocer las principales metodologías basadas en ácidos nucleicos (ADN y ARN) para la detección de patógenos apícolas, se presenta a continuación una revisión bibliográfica considerando ventajas y desventajas de cada una de las técnicas seleccionadas.

3.2.1 PCR convencional

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite la amplificación de un segmento blanco o diana de ADN utilizando partidores específicos que se hibridan con el segmento de ADN (Riviere y col., 2013; Zhao y col., 2014). La mayoría de los métodos de diagnóstico molecular para la detección de patógenos apícolas están basados en PCR (Rodríguez y col. 2010). Esta técnica es más sensible y específica que el análisis bajo microscopio óptico y permite, por ejemplo, detectar diferencialmente *N. ceranae* y *N. apis* antes de que se desarrollen signos clínicos.

Para esto es necesario diseñar partidores que reconozcan una secuencia de ADN específica de cada patógeno (blanco), de los cuales varios ya han sido descritos, utilizados y optimizados (Garrido, 2012; Rodríguez y col., 2014). Además, se ha probado la detección de patógenos en diversas matrices de la colmena, tales como abejas adultas, crías, polen, cera y miel (vanEngelsdorp y col., 2009; Rodríguez y col., 2014; Riviere y col., 2013).

La OIE recomienda metodologías basadas en PCR convencional para la identificación de algunos patógenos tales como *N. apis*, *N. ceranae*, *P. larvae* y *M. plutonius* (OIE, 2012).

Como principal desventaja está el hecho de que es un método cualitativo, o sea que no permite cuantificar la carga del patógeno estudiado. Además, permite la detección de un organismo por reacción, y por lo tanto es necesario hacer varios ensayos para la detección de múltiples patógenos, lo cual aumenta el número de horas hombre e insumos ocupados (lo normal es que necesite 5-6h por análisis) (Martínez y col., 2010). Por otra parte el hecho de que el resultado tenga que ser visualizado en un gel de agarosa y requiera el uso de bromuro de etidio (Rodríguez y col., 2014), un reactivo carcinogénico, puede poner en riesgo la salud de quien lo manipula.

El PCR de transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite la detección de ARN a través de la conversión a ADN complementario (ADNc) por acción de la enzima retrotranscriptasa, seguida por el proceso de PCR convencional. Es una técnica muy sensitiva y altamente específica. Ha sido ampliamente utilizada para la detección de virus de ARN en abejas (Generesch y col. 2010; Rodríguez y col., 2014; Runckel y col., 2011).

Tiene las mismas ventajas y desventajas que el PCR convencional, pero se debe tener especial precaución con el manejo de las muestras debido a que la integridad del ARN purificado es crítica para aplicar esta técnica (Dainant y col., 2011).

3.2.2 PCR multiplex.

Esta técnica permite la detección de varios segmentos de ADN blanco en un mismo ensayo, utilizando diferentes partidores específicos, los que permiten la amplificación

específica de un segmento de ADN diana de cada patógeno sin la reacción cruzada entre pares de partidores (Hernán y col., 2013; Zhao y col., 2014).

El PCR multiplex se ha utilizado para la detección de bacterias y hongos patógenos de abejas (Carletto y col., 2010). Además, el método recomendado por la OIE para discriminar entre *N. ceranae* y *N. apis* se basa en PCR multiplex (OIE, 2012).

La agencia francesa ANSES ejecutó en el 2010 un proyecto que tenía como objetivo el desarrollo de herramientas moleculares de detección para 14 patógenos (Carletto y col., 2010). Éste se basaba en cuatro ensayos de PCR multiplex, dos destinados para la detección de siete virus de ARN, asegurando su detección específica ante eventos de variabilidad genética, un ensayo destinado para detectar *P. larvae* y *M. plutonius*, uno para la detección de agentes bacterianos secundarios y otro para la detección de hongos (incluyendo *N. ceranae* y *N. apis*).

Sin embargo el PCR multiplex tiene como desventaja de que puede ocurrir acumulación de productos no específicos, afectando en los niveles de detección que pueda tener. Por eso, generalmente el límite de detección es más alto que el del PCR convencional (Riviere y col., 2013), y el tiempo de reacción puede variar entre 3 a 30 horas (Zhao y col., 2014). Se deben diseñar partidores altamente específicos para cada patógeno que reconozcan regiones conservadas, con T_m (Temperatura de fusión o *melting*) y temperaturas de alineamiento similares, y que a la vez no se produzca hibridación con otros partidores (Hernán y col., 2013). Incluso así, muchas veces no es posible la detección de un alto número de patógenos y se deben hacer varios ensayos de PCR multiplex (Carletto y col., 2010). También comparte el proceso de manipulación y visualización de resultados del PCR convencional.

La técnica de RT PCR multiplex (RT-mPCR) es una variante del PCR multiplex usada para la detección simultánea de diferentes virus de ARN en un ensayo. Reúne las características del PCR múltiplex adicionando los pasos del RT-PCR. Su principal ventaja es que ofrece una significativa disminución en tiempo y costo, especialmente con un alto número de muestras analizadas (Hernán y col., 2013).

Como desventaja destaca una baja sensibilidad y especificidad, y/o la preferencia de amplificación de algunos blancos respecto a otros (Riviere y col., 2013). En general tienen una limitación a detectar cuatro o cinco dianas en una reacción, dependiendo del número de canales disponibles en el equipo de PCR.

3.2.3 MLPA

La técnica de Amplificación de Sondas dependientes de Ligación múltiple, o MLPA por sus siglas en inglés (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) es una técnica de amplificación que permite la detección simultánea de 45 tipos diferentes de dianas con uso de un solo set de partidores (De Smet y col., 2012). Se basa en la ligación de dos oligonucleótidos contiguos hibridados (sonda) que sirve como templado para la amplificación y la detección basada en PCR. Además de la secuencia específica para el blanco cada oligonucleótido (la mitad de la sonda) contiene una etiqueta (tag) universal para la detección y amplificación de múltiples dianas con un par de partidores, y un fragmento no específico para generar de forma controlada diferentes tamaños de fragmentos entre diferentes dianas. Los diferentes amplicones dianas son identificados por su tamaño a través de electroforesis.

La variante RT-MLPA ha sido utilizada para el análisis de virus de ARN en abejas (De Smet y col., 2012; Doublet y col., 2015).

La capacidad del análisis múltiple del MLPA es mucho mayor que la del PCR convencional pero menor que la de microarray.

Su principal desventaja es requerir de equipamiento sofisticado y caro, con una metodología relativamente compleja, no disponible en todos los laboratorios.

3.2.4 Real-time PCR (qPCR)

El PCR en tiempo real es una técnica que detecta los productos de PCR (amplicones) en tiempo real, permitiendo determinar el número nuevos fragmentos de ADN formados en cada reacción (Kubista y col., 2006; Zhao y col., 2014). Esta técnica requiere de un reportero fluorescente que se una al amplicón e indique su presencia por fluorescencia. El número de ciclos de amplificación necesarios para que la curva de respuesta traspase el umbral de fluorescencia se llama valor de Ciclo umbral o C_T (por sus siglas del inglés "threshold cycle"), y diferencias en valores de C_T indica las diferencias en la cantidad inicial del ADN blanco (Lourenco y col., 2008; Riviere y col., 2013).

El método estándar para la detección no específica es un colorante que se intercala entre las hebras de ADN. El colorante más utilizado es SYBR® Green, el cual al estar unida al ADN de doble hebra, aumenta significativamente su fluorescencia. Los métodos específicos de detección están representados por diferentes tipos de sondas, siendo la más común la sonda TaqMan®, la cual permite realizar detección de múltiples blancos en una única reacción, dentro de un mismo pocillo (Zhao y col., 2014).

El concepto de C_T permite una cuantificación del producto de PCR usando fluorescencia, la cual es exacta y reproducible. Los valores de fluorescencia son registrados en cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado. Si más templado está presente en el comienzo de la reacción, menor cantidad de ciclos tomará alcanzar el punto en el cual la fluorescencia es significativamente mayor que el ruido de fondo (Fig. 15) (Procop, 2007; Lourenco y col., 2008).

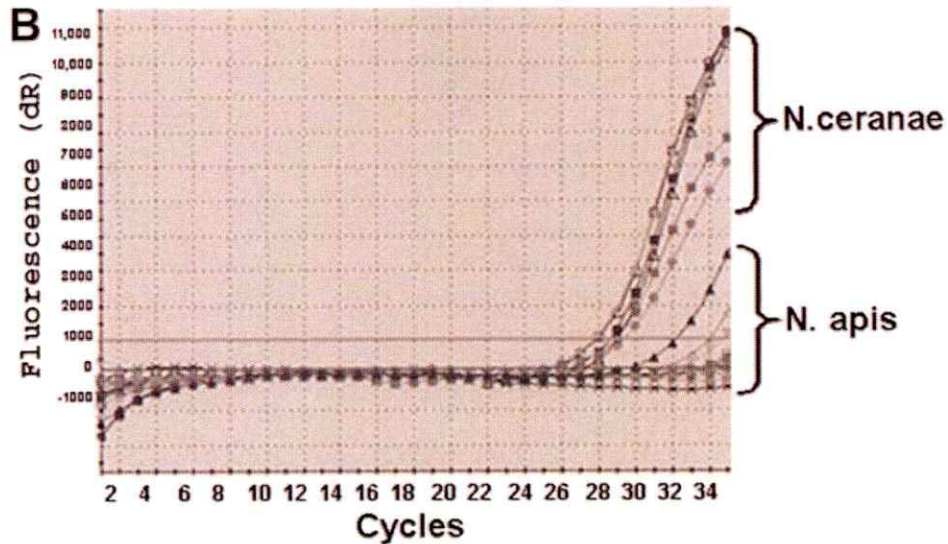


Figura 15. Cinética de la reacción de PCR en tiempo real. Se aprecia los puntos de C_T para *N. ceranae* y *N. apis*, concluyéndose que habría mayor presencia del blanco de *N. ceranae* en la muestra analizada (Lourenco y col., 2008).

Si bien la técnica de PCR en tiempo real no implica necesariamente que corresponda a un PCR cuantitativo (qPCR), asumiendo la relación directa entre la cantidad de ADN y el número de microorganismos en una muestra, se puede hablar de una cuantificación, proceso que debe ser optimizado y estandarizado (Chantawannakul y col., 2006; Procop, 2007; Lourenco y col., 2008).

Es una técnica más sensible, específica y replicable que el PCR convencional. Puede permitir el análisis de diversos ADN dianas en un mismo ensayo, pudiendo, por ejemplo, estudiar la relación entre enfermedades y el sistema inmune (incluyendo como blanco genes de *A. mellifera* y de cada patógeno) (Evans, 2006).

También es un método simple y más seguro ya que no requiere la etapa de visualización de resultados en que se ocupa bromuro de etidio. Es rápido y sensible, permitiendo por ejemplo un ensayo de 10 minutos para la detección de *P. larvae* y un límite de detección 100 veces menor que el método de cultivo (Han y col., 2008); 3h para la detección de *N. apis* y *N. ceranae* en 10 muestras (Martínez y col., 2012) y 2h para la detección de *P. larvae* con un bajo límite de detección. La especificidad es mucho más alta con el uso de sondas asociadas a los partidores y por los softwares desarrollados para el análisis de resultados en qPCR (Weile y Knabbe, 2009).

La ausencia de algunas etapas de procesamiento y la capacidad de analizar una gran cantidad de muestras en poco tiempo permitiría ahorrar dinero al largo plazo. Además, cada vez más los equipos de PCR en tiempo real son más comunes en los laboratorios (Weile y Knabbe, 2009).

Se debe desarrollar una estrategia de cuantificación creando una curva estándar y correlacionando el número de ciclos de amplificación determinados por qPCR con el número de individuos determinados por otra metodología ya estandarizada. Estas curvas se basan en muestras de distintas matrices contaminadas con un número conocido de esporas del organismo estudiado (Procop, 2007; Lourenco y col., 2008).

Esta técnica se ha utilizado para la detección de *P. larvae* y *M. plutonius* (Martínez y col., 2010; Han y col., 2008), utilizando generalmente el gen ARNr 16S como blanco y

usando las sondas SYBR® Green I y TaqMan®. En el caso del análisis de las bacterias causantes de loque americana y europea se debe correlacionar el número de ciclos de amplificación con el número de unidades formadoras de colonias (CFU) determinadas en cultivo. Sin embargo, el método de cultivo solo permite el conteo de esporas germinadas, mientras que el qPCR detecta las esporas en estado vegetativo y germinadas (Martínez y col., 2010).

También se ha utilizado para la detección diferencial de *N. apis* y *N. ceranae* y su cuantificación. En todos los estudios se ha utilizado el gen ARNr 16S como blanco y en la mayoría se ha utilizado la sonda TaqMan® (Martínez y col., 2012; Bourgeois y col., 2010; Evans, 2006).

Evans (2006) analizó *P. larvae*, *M. plutonius* y *A. apis*, y su relación con la expresión de genes del sistema inmune de la abeja utilizando placas de 96 pocillos que le permitió hacer el análisis de estos patógenos en pocos ensayos.

Es una técnica no muy compleja y costo efectivo (Moritz y col., 2010), y si se complementa con información de transcriptómica se puede utilizar para identificar genes que son expresados diferencialmente en estados de desarrollo patogénicos.

RT-qPCR es la variante que permite la cuantificación de virus de ARN de abejas (Dainant y col., 2011; Carletto y col., 2010; Chantawannakul y col., 2006).

Como desventaja presenta que su alta sensibilidad puede inducir a una mala interpretación de los resultados. Por ejemplo la detección de pequeñas cantidades de un patógeno no quiere decir que la enfermedad se haya desarrollado, pudiendo

detectarlo en estado vegetativo o incluso muertos. Además, para que la interpretación de los resultados tenga un significado biológico es necesario calibrar los valores de qPCR a una cuantificación por otro método. Sin embargo esto se basa en la suposición de que el genoma contiene solo una copia del gen blanco, pero en el caso de *N. ceranae* se encuentran 10 copias del gen ARNr 16S. En este sentido es crucial saber el número de copias de genes en el organismo estudiado para correlacionar los valores de qPCR con número de microorganismos por muestra y por lo tanto puede ser necesario un análisis genómico del patógeno a analizar.

Microarrays, análisis metagenómicos y secuenciación son métodos que pueden permitir un análisis más exhaustivos, pero siguen siendo metodologías más caras por el equipamiento asociado (Procop, 2007; Runckel y col., 2011; Moritz y col., 2010). Además, debido a la gran cantidad de datos generados es necesario un poderoso software y personal capacitado para interpretarlos (Weile y Knabbe, 2009).

Al comparar, evaluar y rankear los distintos parámetros descritos asociados a la implementación de cada metodología para el análisis de patógenos apícolas se obtiene que el PCR en tiempo real es la mejor opción (Fig. 16).

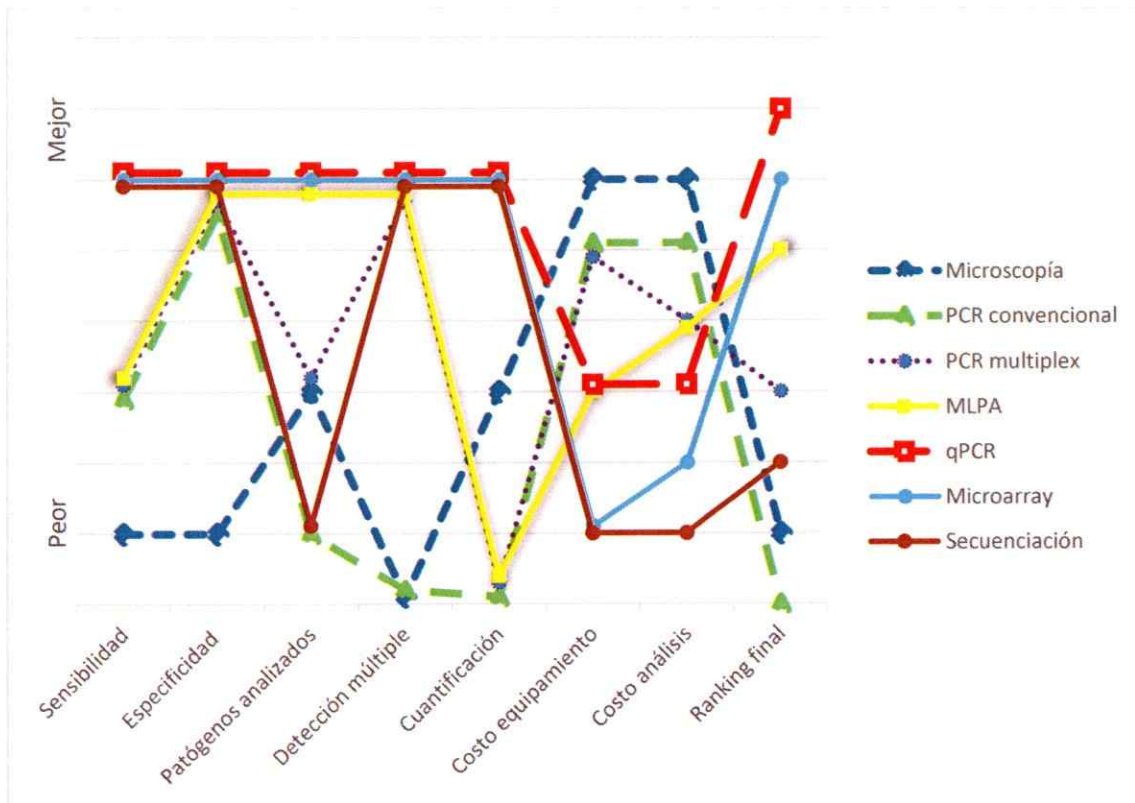


Figura 16. Curva de Valor de las principales técnicas para la detección y/o diagnóstico de patógenos en *A. mellifera*.

El PCR en tiempo real permite cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en una muestra de forma mucho más sencilla, precisa y con un menor límite de detección. Además, se podría estudiar como la presencia de mutaciones puntuales están relacionadas a resistencia a medicamentos de uso apícola.

Una ventaja de los equipos de PCR en tiempo real es que en uno solo se pueden realizar ensayos cualitativos, cuantitativos, análisis filogenéticos, PCR múltiple, entre otros, mientras que para los procedimientos tradicionales se requieren varios equipamientos y etapas.

La técnica de PCR en tiempo real combina la amplificación de secuencias de ADN con la detección del producto en un único pocillo. Esto es favorable debido a que elimina el riesgo de contaminación por manipulación de los tubos que si puede ocurrir con otras metodologías (Zhao y col., 2014). Por otro lado, disminuye el tiempo de análisis y puede entregar resultados cuantitativos.

3.3 Diseño de ensayo de qPCR

Un ensayo de qPCR exitoso requiere la amplificación eficaz y específica del segmento de ADN blanco, y por lo tanto es crucial el uso de partidores diseñados y validados para los ensayos de qPCR con un objetivo claro. A continuación se presentan los pasos a seguir para un correcto diseño de ensayo de qPCR con el fin de cuantificar los 10 principales patógenos de *A. mellifera* en Chile.

La estrategia de diseño de ensayo de qPCR comprende las siguientes actividades:

- Recopilar información de publicaciones científicas y bases de datos para partidores existentes.
- Elegir una secuencia blanco.
- Diseño de partidores.
- Comprobar especificidad de partidores.
- Evaluar las propiedades de los partidores (estructuras secundarias, T_m y complementariedad).
- Definir las propiedades del producto de PCR.
- Validar los partidores y optimizar el protocolo.

3.3.1 Revisión de la literatura y bases de datos

Se puede realizar una búsqueda de secuencias de partidores que hayan sido descritos en trabajos científicos y/o que se encuentren publicados en bases de datos especializadas. Si la cantidad de partidores encontrados es alta, se deben privilegiar aquellos que provengan de publicaciones científicas de alto impacto, con mayor número de citas, de publicación más recientes, y que hayan sido utilizados y optimizados para qPCR (en comparación con partidores optimizados para otras técnicas).

Esta revisión también permite encontrar secuencias blanco utilizadas. Una herramienta que también puede ser útil es elegir secuencias blanco y/o partidores que hayan sido utilizados en estudios locales, lo cual aumentaría la probabilidad de que sean efectivos al detectar un determinado microorganismo, en el cual ya se ha probado su especificidad (considerando variables filogenéticas en distintas zonas geográficas).

Luego se procede a evaluar si los partidores descritos en la literatura pueden servir para el ensayo que se desea implementar.

Para analizar si estos partidores pueden servir para el análisis de múltiples patógenos en un ensayo se debe verificar que cumplan con los siguientes requisitos del diseño de partidores para este propósito (Kubista y col., 2006):

3.3.2 Elección de secuencia blanco

Para elegir una secuencia blanco a amplificar se recomienda fuertemente tener las siguientes consideraciones:

- El tamaño del producto a amplificar debe ser de 60-150pb. En general los productos de PCR pequeños son amplificados con mayor eficiencia que los grandes, sin embargo para que los amplicones no sean confundidos con posibles dímeros de partidores formados deben superar las 60pb.
- Elegir una región con contenido GC de 50 a 60%.
- Utilizar programas para predecir y evitar que el amplicón forme estructuras secundarias en las condiciones de la reacción.
- Evitar regiones con más de cuatro repeticiones de nucleótidos individuales.

3.3.3 Elección de partidores

Para lograr su especificidad para una determinada región de DNA existen recomendaciones mínimas de diseño de partidores, las cuales se ven complementadas por consideraciones del ensayo de qPCR. Estas se exponen a continuación:

- Longitud entre 18 y 25 pares de bases.
- T_m de los partidores debe estar entre 57 y 63 °C, calculada con valores de 50 mM de concentración de sal y 300 nM de concentración de oligonucleótidos (teniendo precaución con el programa calculador de T_m elegido, ya que no todos permiten ingresar estos parámetros).
- La T_m debe ser lo más parecida posible entre partidores, evitando que exista una diferencia superior a los 3°C.
- Contenido de G-C entre 50 y 60%.
- Preferir guanina y citosina en los extremos.
- Evitar regiones con más de cuatro repeticiones de nucleótidos individuales.
- Evitar que los extremos 5' y 3' sean complementarios para disminuir la probabilidad de formación de dímeros u horquillas que alteren la amplificación.
- Evitar la complementariedad entre partidores directo e inverso para evitar la formación de dímeros.
- Verificar la especificidad de los partidores elegidos realizando un BLAST.

Si bien existen varias opciones de partidores para patógenos de abejas, incluyendo algunos utilizados en estudios en Chile, tomando como base las consideraciones antes expuestas se eligieron los partidores que se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencias blanco, partidores directo (Fw) e inverso (Rv) y sus valores de Tm y %GC descritos en la literatura para los 10 principales patógenos apícolas.

Especie	Blanco	Partidor (5' -> 3')	Tm (°C) ¹	Largo amplicón ¹	Usado para	Referencia
<i>V. destructor</i>	ARNr 16S	Fw GACTTACGTCGGTCTGAACCTCAA	61,0	-	qPCR	Chantawannakul y col., 2006
		Rv TTGCGACCTCGATGTTGAATT	61,9			
<i>A. woodi</i>	CO1	Fw TGATATCCCAATTATCTGAGTAATG	55,6	113	qPCR	Sammanro y col., 2013
		Rv AATATCTGTCATGAAGAATAATGTC	52,7			
<i>N. ceranae</i>	ARNr 16S	Fw CGGATAAAAGAGTCCGTTACC	56,9	250	qPCR	Chen y col., 2009
		Rv TGAGCAGGGTTCTAGGGAT	56,3			
<i>N. apis</i>	ARNr 16S	Fw CCATTGCCGGATAAGAGAGT	58,3	269	qPCR	Chen y col., 2009
		Rv CCACCAAAAACCTCCAAGAG	58,7			
<i>A. apis</i>	ARNr 5.8S	Fw TGTGTCTGTGCGGCTAGGTG	62,5	136	PCR multiplex	Garrido-Bailón, 2012
		Rv GCTAGCCAGGGGGAACTAA	61,8			
<i>P. larvae</i>	ARNr 16S	Fw CGGGAGACGCCAGGTTAG	60,8	380	qPCR	Martínez y col., 2014*
		Rv TTCTTCCTTGGCAACAGAGC	59,6			
<i>M. plutonius</i>	CO1	Fw GTTAAAAGCGCTTTTCGGGT	61,8	281	PCR multiplex	Garrido-Bailón, 2012
		Rv GAGGAAAACAGTACTCTTTCCCTA	60,6			
ABPV	Gen de proteína de la cápside	Fw AATGGCCTATGGACTTTTCTA	58,2	178	qPCR	Siede y col., 2008
		Rv AAATCTCCTGCAATAACCTTGG	58,7			
BQCV	Gen de poliproteína no estructural (orf1)	Fw GGTGCGGGAGATGATATGGA	62,2	-	qPCR	Chantawannakul y col., 2006
		Rv GCCGTCTGAGATGCATGAATAC	61,0			
DWV	Gen de poliproteína	Fw CCTGGACAAGGTCTCGGTAGAA	61,9	-	qPCR	Chantawannakul y col., 2006
		Rv ATTCAGGACCCCAACAAAT	61,7			
<i>A. mellifera</i> (control)	Act1	Fw TGCCAACACTGTCTTTCTG	58,9	156	qPCR	Lourenco y col., 2008
		Rv AGAATTGACCCACCAATCCA	59,0			

¹En rojo se muestran los valores de Tm y tamaños de amplicones que estarían fuera de los valores recomendados. El guion representa que la información no pudo ser obtenida.

*Partidores utilizados en Chile.

De los partidores presentes en la Tabla 6 se marcaron aquellos valores de parámetros que escapan de las recomendaciones y por lo tanto podrían tener complicaciones al momento de su utilización para el ensayo de qPCR. Sin embargo la mayoría de los

partidores ya han sido utilizados en análisis de PCR en tiempo real, excepto los partidores de *M. plutonius*, que amplificarían un producto de 281 pb de largo.

3.3.4 Validación y optimización

Es necesario validar el ensayo de qPCR con los partidores y blancos seleccionados con el fin de corroborar que en cada reacción se amplifique solamente el producto deseado y determinando la eficiencia de la amplificación con SYBR-Green®. Para esto existen distintas formas (Lourenco y col., 2008).

Curva estándar: Se puede construir una curva estándar para determinar la eficiencia de amplificación y la reproducibilidad de un ensayo de qPCR. Los valores de C_T de las réplicas deben ser similares, la eficiencia debe ser superior al 90% y el valor de R^2 de la curva estándar debe ser superior a 0,98.

Ensayo de especificidad y verificación: El análisis de la curva de melting se utiliza para identificar productos de PCR no específicos o dímeros de partidores, los cuales pueden reducir la eficiencia de amplificación y la exactitud del ensayo de qPCR. A partir del análisis de las curvas de melting se puede determinar cuántos amplicones se generaron a partir del ensayo. Finalmente se procede a hacer un análisis de los productos de qPCR en gel de agarosa, observando las bandas que corresponderían a productos de PCR, corroborando que tengan el tamaño del amplicón blanco.

Temperatura de alineamiento: Se debe determinar la temperatura de alineamiento a través de la repetición de una reacción en varias temperaturas distintas. Si no es así, y se tienen temperaturas de alineamiento demasiado bajas, se pueden producir productos de PCR no específicos, mientras que si es demasiado alta el rendimiento de

amplificación puede ser muy bajo. La temperatura óptima de alineamiento es aquella que permite el valor de C_T más bajo sin amplificación inespecífica.

Debido a que SYBR-Green® se une a todos los segmentos de ADN de doble hebra, es necesario comprobar la especificidad del ensayo mediante análisis del producto de reacción de qPCR. Para esto se realiza un análisis de la curva de fluorescencia en función de la temperatura y un posterior análisis en gel de agarosa.

Una vez realizadas todas estas actividades se obtiene como resultado un protocolo de análisis mediante qPCR, el cual debe ser acompañado de un protocolo de muestreo.

Los partidores de la Tabla 6 no han sido validados y optimizados para el análisis de cada patógeno blanco en las mismas condiciones, sin embargo dado que los protocolos descritos para cada ensayo de qPCR son similares, y que las T_m no superan los 4°C de diferencia, se presume que pueden ser utilizados bajo un mismo ensayo.

En base a este supuesto se plantea el siguiente protocolo.

3.4 Protocolo y presupuesto de diagnóstico múltiple de patógenos de abejas mediante ensayo de PCR en tiempo real cuantitativo

Este protocolo servirá para determinar la prevalencia y cuantificar los 10 principales patógenos descritos en Chile: *V. destructor*, *A. woodi*, *N. ceranae*, *N. apis*, *A. apis*, *P. larvae*, *M. plutonius*, ABPV, BQCV y DWV.

A continuación se describe el protocolo para recolección de muestras, su procesamiento y posterior análisis mediante un ensayo de qPCR.

3.4.1 Muestreo

En recipientes de plástico herméticos de 50 ml rotulados se deben coleccionar 50 abejas adultas desde la periferia de marcos con cría al interior de las colmenas. Cada frasco rotulado se almacena inmediatamente en una nevera con hielo en condiciones de campo para su posterior almacenamiento a -80°C en un freezer laboratorio. Esto se debe realizar para el 10% de las colmenas presentes en el apiario, elegidas de forma aleatoria.

3.4.2 Extracción de ácidos nucleicos

Se cortan los abdómenes de 8 abejas de cada muestra, los cuales se maceran en conjunto con 1 ml de buffer de lisis guanidina tiocinato, y luego se extrae una alícuota de 700 μ l de ARN del sobrenadante usando el procedimiento de RNAqueous (Ambion) descrito por el protocolo del fabricante. El ARN es utilizado para el análisis de ABPV, BQCV, DWV y el control positivo (act1). Se genera ADNc a partir de 500 ng aproximadamente del total del ARN utilizando una mezcla de partidores oligo-dT de 12-18 nt de largo y transcriptasa reversa Superscript II (vanEngelsdorp y col., 2009).

El sobrenadante restante es procesado para la extracción de ADN utilizando el purificador de ADN Wizard® SV Genomic (Promega, USA) (Rodríguez y col., 2014). El ADN es utilizado para la detección de *A. woodi*, *N. ceranae*, *N. apis*, *A. apis*, *P. larvae*, *M. plutonius* y *V. destructor*.

Para el ensayo de qPCR se utiliza el intercalador fluorescente SYBR-Green® I y las reacciones se llevan a cabo en placas de 96 pocillos en termociclador Bio-Rad o equivalente. En cada pocillo hay 1,5 µg de ADN, una unidad de Taq polimerasa con su buffer, 1 mM de mix de dNTP, 1 mM de MgCl₂, 0,2 uM de cada partidor, 1X de concentración de SYBR-Green® I y 10nM de fluoeresceina en 25 ul de volumen de reacción.

El perfil térmico del ensayo de qPCR consiste en una pre-incubación de 5 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de cuatro etapas: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 1 min y 78°C por 20 s. La etapa de 78°C se usa para evitar posibles señales de potenciales dímeros de partidores u otro tipo de formas, y de esta forma se aprovecha para realizar las mediciones de fluorescencia e inferir la concentración del ADN diana.

La eficiencia promedio de amplificación de cada par de partidores se estima en un análisis de dilución serial. La abundancia de transcritos de cada patógeno se normaliza con el método de ΔC_T , utilizando el promedio de los valores de C_T de un gen constitutivo de *A. mellifera* como referencia para la abundancia de transcritos. Luego, se puede calcular un valor de $\Delta\Delta C_T$ como la diferencia entre valores de ΔC_T en dos muestras o condiciones distintas, y se calcula la diferencia en abundancia de un patógeno particular como $(1+eficiencia)^{\Delta\Delta C_T}$. EL valor de eficiencia de amplificación de cada partidor debería ser cercano a 1.

Para el proceso de cuantificación de patógenos, se puede estimar un rendimiento de extracción de ARN de 50 ug por abeja y que cada reacción de qPCR se realiza con el ADN generado a partir de 100 ng de ARN, cada pocillo representa 1/500 de una abeja individual, y por lo tanto el número de genoma viral por abeja se puede calcular como el valor de número de copias de qPCR por 500 (Runckel y col., 2011).

Por otra parte, el factor de conversión desde número de copias/ μ L a número de esporas de *Nosema*/abeja se calcula de la siguiente forma (Bourgeois y col, 2010):

$$\frac{N^{\circ} \text{ de esporas de } Nosema}{abeja} = \frac{\left(\frac{a \text{ copias de nosema}}{\mu L \text{ PCR}} \right) \left(\frac{25 \mu L}{(0,04)(b \text{ abejas})} \right)}{10 \text{ copias por genoma}}$$

dónde a = número de copias obtenidas a partir de qPCR, y b = número de abejas en la extracción de ADN.

Para el resto de los patógenos se puede tomar como base el factor de conversión utilizado en *Nosema*, ajustado al número de copias por genoma que corresponda en cada caso.

Cada reacción, con un par de partidores específicos para cada patógeno blanco por pocillo, se realiza por triplicado. Para normalizar se ocupa el blanco del gen constitutivo de actina (Tabla 6). Considerando que se ocupa una placa con 96 pocillos, es posible hacer un ensayo de qPCR para 3 muestras en que se analicen los 10 patógenos blancos, por triplicado, más el control para normalizar y el control negativo.

El presupuesto detallado asociado al ensayo de qPCR se presenta en el Anexo. Considerando que se utiliza SYBR-Green®, que se hace una extracción total de ácidos

nucleicos y que se podrían analizar al menos 4 placas por día, se calculó un costo estimado de \$25.267 por muestra, siendo 3 muestras el número mínimo para analizar (\$75.800). Este valor considera solo los insumos y mano de obra asociada al procesamiento de las muestras, dejando fuera los gastos de inversión (compra de equipamiento e infraestructura), gastos de pre-inversión (personal capacitado, know-how), la optimización del protocolo y el análisis de los resultados ya que son gastos que pueden variar según el tipo de institución y modelo de negocio asociado al análisis.

A modo de ejemplo, si se desea realizar un estudio de un número representativo de colmenas de la Región Metropolitana, un análisis de 600 muestras de abejas podría realizarse en 1200h con un presupuesto de al menos \$15.160.017.

Por otra parte, si se desea ofrecer un servicio de detección y cuantificación de 10 patógenos apícolas mediante qPCR el valor mínimo de análisis, de 1 a 3 muestras, sería de \$98.540 (costo + 30% de gastos generales). Sin embargo para ofrecer este servicio antes se debe inscribir como laboratorio de diagnóstico veterinario ante el SAG, ajustándose a la normativa vigente.

Adicionalmente, el análisis de estos diez patógenos puede ser optimizado al realizar ensayos que abarquen más de un patógeno blanco por pocillo aumentando la cantidad de muestras analizadas por pocillo y reducido tiempo y gastos.

3.4.3 qPCR multiplex

Las sondas marcadas con fluorescencia se pueden utilizar para una mayor especificidad en un ensayo de qPCR. Los más comunes son sondas de hidrólisis tales como TaqMan®. Es posible amplificar y cuantificar hasta cinco blancos en un único ensayo qPCR, dependiendo de las características del termociclador. El análisis múltiple en un mismo ensayo, o multiplexación, confiere un aumento de rendimiento de los análisis, reduciendo el costo total de los ensayos de qPCR. Además habría menos manipulación de la muestra y por lo tanto disminuye aún más la probabilidad de contaminación.

Para distinguir cada reacción de amplificación por separado se deben ocupar fluoróforos reporteros distintos, con mínima superposición de espectros de emisión. Para obtener resultados precisos a partir de un ensayo múltiple, se debe asegurar que la amplificación de un blanco no interfiere en la amplificación de otro. Para determinar si todas las reacciones transcurren de forma independiente en el ensayo multiplex se pueden realizar ensayos multiplex e individuales para los blancos en la misma placa y comparar los valores C_T . Si los valores C_T de las reacciones de amplificación individual y múltiple son significativamente diferentes, es necesario optimizar el protocolo de las reacciones.

Un método para la optimización de las reacciones multiplex se basa en el aumento secuencial de las concentraciones de ADN polimerasa, dNTPs, y de $MgCl_2$.

3.5 Implementación en un Monitoreo Nacional Apícola

Se propone ejecutar un primer monitoreo en colmenas que prestan el servicio de polinización y aquellas que no para establecer un diagnóstico general sobre la prevalencia y el nivel de infestación de las principales 10 enfermedades presentes en las abejas de miel de Chile. Una opción es que este monitoreo sea ejecutado gracias a financiamiento público y privado, cuyas alternativas se explican a continuación:

3.5.1 Opciones de Financiamiento

Financiamiento público:

- Concurso Fondef IDeA, financia la ejecución de iniciativas de investigación científica y tecnológica, con potencial impacto económico y social. Esta propuesta se ajustaría a la categoría de proyecto de Interés Público (o Bien Público). En esta convocatoria el monto máximo de subsidio a entregar por CONICYT es de hasta 70% del costo total del proyecto, con un límite máximo total de 150 millones de pesos. El proyecto debe ser financiado a lo menos en un 10% de su costo total por la entidad beneficiaria del subsidio, y cofinanciado a lo menos en un 20% de su costo total por empresas o entidades asociadas. El proyecto puede durar un plazo máximo de 24 meses.
- FONDOSAG, co-financia proyectos para mejorar la condición de los recursos productivos silvoagrícolas del país. Algunas de las áreas estratégicas establecidas para estos fondos incluyen el "Control y erradicación de plagas cuarentenarias, vigilancia y defensa del patrimonio sanitario agrícola", y la "Defensa, vigilancia, control y erradicación de enfermedades que afecten el patrimonio sanitario pecuario". En esta convocatoria el monto máximo de subsidio a entregar por SAG es de hasta 65% del costo total del proyecto, con un límite máximo anual de 65 millones de pesos. El proyecto debe ser cofinanciado a lo menos en un 35% de su costo total por las

empresas o entidades asociadas. El proyecto puede durar un plazo máximo de 48 meses.

Financiamiento privado:

Como alternativa complementaria al financiamiento público, y apuntando a obtener el cofinanciamiento necesario de entidades asociadas, se aspira a lograr que los mismos apicultores cuyas colmenas son monitoreadas sean capaces de subvencionar un 30% del costo de los análisis. Una alternativa es que grupos de empresas apícolas se unan para crear un análogo a la Fundación para el Desarrollo Frutícola, la cual recibe aportes de cada empresa con el fin de financiar iniciativas de I+D de forma asociativa. Otra alternativa es ofrecer el servicio de análisis piloto en el cual se haga un cobro particular a cada apicultor o empresa a cambio de entregar un informe con los resultados y recomendaciones a seguir.

3.5.2 Postulación para incorporarse como Laboratorio Autorizado por el SAG

Para formar parte de la Lista de laboratorios de diagnóstico veterinario oficial del SAG se debe contestar la Encuesta "Determinación de la actividad y capacidad diagnóstica veterinaria del país, 2013 (formulario señalado en el resuelto 1 de la Resolución N° 5.070/2012)" y enviar a: laboratorio.diagnostico@sag.gob.cl. Luego se debe seguir el Instructivo Técnico Comunicación de Resultados de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario.

Para el caso de Loque americana, la inspección clínica se debe desarrollar de acuerdo a los métodos y procedimientos específicos establecidos por el SAG en el documento Protocolo de Inspección de un Apiario, incorporado en el Anexo N° 5 del Reglamento Específico de Acreditación de Terceros para la realización de inspección clínica de la enfermedad loque americana en apiarios del país. Actualmente no hay ningún

laboratorio tercero autorizado para la realización de inspección clínica de la enfermedad loque americana de apiarios en el país.

Para la postulación se debe cumplir con la Resolución Exenta N° 4.420 la cual menciona el reglamento específico de acreditación de terceros para la realización de inspección clínica.

La tarifa de acreditación incluye 0,75 UTM de postulación y 1,28 UTM de mantención, establecidos mediante Resolución Exenta del Director Nacional de SAG N° 3997 de 25 de agosto de 2006.

Adicionalmente es necesario cumplir con los requisitos de Infraestructura, Equipos, Materiales y Reactivos, y de Personal (responsable técnico y analistas). También es necesario contar con un sistema de gestión de calidad (Basado en NCh-ISO 17025 o Buenas Prácticas de Laboratorio), el cual garantice la validez y confiabilidad de los resultados

La postulación se hace efectiva al presentar los "Formularios para postular a la acreditación de terceros para la realización de inspección clínica de la enfermedad Loque Americana en apiarios del país".

3.5.3 Modelo de Negocios y ejecución de la propuesta

Se propone que la Fundación Fraunhofer Chile Research ejecute el servicio de análisis propuesto. Para esto se deben considerar los siguientes aspectos del modelo de negocio, análisis interno y externo y periodo de puesta en marcha.

Modelo de Negocios

Oferta: Servicio de análisis de plagas de alta resolución para el sector apícola a un precio asequible, cumpliendo estándares internacionales y complementando con asesorías técnicas.

Infraestructura:

- Capacidades Centrales: Infraestructura tecnológica de primer nivel y optimizada; expertise técnica; conocimiento de los mercados locales.
- Redes: Asociaciones con el gremio apícola (RAN) y agrícola (Fedefruta); respaldo y trabajo directo con el SAG.
- Configuración del Valor: Implementar métodos competitivos; construir conocimiento que agregue valor a los clientes; generar expertise técnica; aportar conocimiento para proponer planes de sanidad apícola a nivel nacional.

Clientes:

- Mercado objetivo: apicultores que ofrecen el servicio de polinización; agricultores que tienen colmenas propias para polinización de sus huertos; SAG.
- Relaciones con los Clientes: De largo plazo; atención especializada y comunicación constante vía web y teléfono.
- Canales de distribución y Comunicación: operaciones a nivel nacional, e-newsletter técnicos; email marketing; seminarios y talleres.

Finanzas:

- Costos: Recursos Humanos asociados al monitoreo, análisis de laboratorio e interpretación de datos; depreciación de equipos; arriendos; insumos.
- Ingresos: toma de muestras; análisis de muestras; consultorías técnicas.

Finalmente, la propuesta contiene amenazas y debilidades que deben ser superadas (Tabla 7) para que el servicio pueda comenzar a funcionar en un periodo estimado de cuatro meses (Tabla 8).

Tabla 7. Análisis de fortalezas y debilidades (FODA) del Servicio de Diagnóstico.

Análisis Interno	Debilidades	Fortalezas
	Falta de reconocimiento histórico por el sector productivo. Red de contactos limitada. Espacio y tiempo reducido de acceso al equipamiento del laboratorio. Especialización excesiva.	Equipo cualificado y comprometido. Amplia oferta de servicios. Eficiencia en el manejo de muestras y entrega de resultados. Experiencia de servicios similares en otros mercados. Tecnología optimizada. Capacidad de crecimiento.
Análisis Externo	Amenazas	Oportunidades
	El mercado puede no valorar las ventajas del servicio. Competidores con mejor posicionamiento estratégico.	Demanda satisfecha parcialmente, mercado no saturado. Ningún laboratorio autorizado por el SAG. Aumento de demanda de control de calidad de colmenas para polinizar. Cambios de reglamentación sobre el manejo sanitario apícola. Adaptaciones a nuevas necesidades de los clientes y sectores relacionados. Fondos públicos para co-financiamiento.

Tabla 8. Carta Gantt de puesta en marcha del Servicio de Diagnóstico de plagas apícolas.

N°	Actividades	Mes 1				Mes 2				Mes 3				Mes 4			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	Compra de Materiales	■	■														
2	Pruebas y optimización		■	■	■	■	■										
3	Postulación a Lab. aut. SAG			■	■	■	■										
4	Diseño de logística				■	■	■	■									
5	Promoción del Servicio					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6	Prestación del Servicio								■	■	■	■	■	■	■	■	■
7	Evaluación del proceso			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8	Evaluación de resultados											■	■	■	■	■	■
9	Control de calidad																

4 DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

El aumento en mortalidad de abejas y pérdida de colmenas y el surgimiento de nuevos agentes patógenos pone en peligro el normal funcionamiento de las colmenas de *A. mellifera* como agente polinizador de especies frutícolas de importancia económica. Sumado al hecho de que el número de hectáreas de cultivos agrícolas que requieren de polinización ha aumentado 6 veces más que el número de colonias de abejas (Smith y col., 2014), se hace evidente la necesidad de tomar medidas para asegurar la salud y funcionamiento de las abejas.

Existen múltiples factores que afectan la salud de las abejas dentro de las cuales destaca la acción de diversos patógenos que incluyen ácaros, hongos, bacterias y virus. En Chile solo se han realizado estudios aislados en colmenas destinadas principalmente a la producción de miel, y en ningún caso enfocándose en colmenas que se dediquen al servicio de polinización. Por lo tanto, a la fecha no existe información científica acerca del estado sanitario de estas colmenas.

La primera parte de este trabajo muestra los resultados de un estudio de abundancia de los principales patógenos descritos en las colmenas de nuestro país: *Nosema* spp. y *V. destructor*. Este estudio se realizó en colmenas contratadas para prestar el servicio de polinización en huertos comerciales de almendros, ciruelos, cerezos, kiwis y paltos de la Región Metropolitana durante el año 2014.

Como resultado se obtuvo que la prevalencia de *V. destructor* y *Nosema* spp. para el total de las colmenas muestreadas corresponde a 30,1% y 40,9%, respectivamente. Al

comparar estos valores con algunos obtenidos a partir de estudios anteriores (del Rfo, 2013; Reinike, 2013), se observa que habría un 57,9% menos de prevalencia de *Varroa* en las colmenas que están polinizando, mientras que la prevalencia de *Nosema* spp. sería sobre un 10,1% menor. Esto ilustra que hay una diferencia entre los resultados obtenidos a partir de un muestreo del 2012 en colmenas destinadas a la producción de miel principalmente respecto de los resultados obtenidos de colmenas que polinizan cultivos frutícolas durante el 2014.

Existe una diferencia significativa en el nivel de infección de *Nosema* spp. entre muestras provenientes de colmenas que se encontraban polinizando almendros respecto al resto de los cultivos. Esto podría explicarse en parte porque la polinización del almendro ocurre en invierno (julio-agosto), caracterizándose por temperaturas bajas y alta humedad, mientras el resto de los cultivos florece desde septiembre a diciembre. Estas características ambientales podrían provocar una mayor susceptibilidad de las colmenas a *Nosema*, lo cual ha sido descrito anteriormente (Chen y col, 2012; Hinojosa y González, 2004) y por lo tanto podría indicar que la polinización en cultivos de almendros podría estar siendo cubierta por colmenas más débiles y que no otorgan un óptimo servicio.

Se puede apreciar que en un 42% de las muestras analizadas no se detectó la presencia de los principales patógenos que afectan a las abejas. Queda claro que al menos el 58% de estas colmenas no cumpliría con el requisito de estar libres de enfermedades de la Norma Chilena de Polinización, sin embargo esto solo considera el resultado de un análisis bajo microscopía óptica y conteo de ácaros, dejando fuera al menos 7 otros patógenos que podrían estar presente en estas muestras pero que no han sido estudiados.

La presencia de patógenos en las colmenas no implica necesariamente un colapso en la colonia. Existen diversos factores tales como la nutrición, genética o incluso factores externos como la aplicación de pesticidas que pueden afectar directamente en la susceptibilidad o resistencia a enfermedades, pero un diagnóstico positivo para ciertos patógenos no es una limitante para que pueda prestar un servicio de polinización eficiente, si se tienen cubiertos los demás aspectos.

Sin embargo, la detección de patógenos sería una limitante para el cumplimiento de la Norma Chilena de Polinización, y por lo tanto podría repercutir en los precios de arriendo de cada colmena. Esto es un factor relevante si se considera que podría ser utilizado como herramienta para excluir colmenas del servicio de polinización, pero también es una oportunidad para que se pueda responder a la Norma Chilena de Polinización y negociar a mejores precios de arriendo con un correcto análisis y manejo sanitario.

En promedio la Norma Chilena de Polinización no se cumple, por lo tanto es necesario reformular el objetivo que tiene esta norma. Para las colmenas que funcionan como un sistema compuesto de muchos individuos, es altamente probable que contengan al menos una especie de agente patógeno, y si es así ya estaría incumpliendo la norma. Al pasar esto, automáticamente se estaría diciendo que ninguna colmena cumple con todos los requisitos para polinizar. Esto debe ser analizado más profundamente, estudiando la interacción entre los distintos patógenos, su relación con la fuerza de la colmena, el efecto que tienen parámetros externos a la colmena y finalmente como repercuten estos en la eficiencia de la polinización.

La segunda parte del trabajo consistió en la evaluación de la incorporación de metodologías basadas en biología molecular para el análisis de los principales patógenos descritos en Chile.

Se seleccionó la técnica de PCR en tiempo real por permitir realizar un diagnóstico rápido, preciso y altamente sensible y a la vez ser costo-eficiente. Se calculó un valor de \$25.267 aproximado para la cuantificación de los 10 patógenos principales por muestra. Si se compara con el valor estimado de \$3.000 por muestra para detectar un patógeno mediante PCR convencional, al multiplicarlo por el número de patógenos y considerando el mayor tiempo asociado al procesamiento, el qPCR resaltaría por ser más costo-eficiente considerando que además cuantifica los patógenos. Si bien el precio del posible servicio de análisis de patógenos estaría rondando los \$100.000 por 1-3 muestras (incluyendo gastos generales de un 30% sobre el costo), el resultado de este análisis permitiría tomar decisiones sobre el manejo sanitario. Así por ejemplo podría orientar en la correcta aplicación de algún medicamento evitando excesos y gastos de dinero, y a la vez disminuir la probabilidad de resistencia y de contaminación en los productos de la colmena.

En la actualidad no existen en el mercado kits de diagnóstico o un servicio de análisis de algún tipo para la mayoría de los patógenos presentados en este estudio. Esto permite la posibilidad de que un protocolo de este tipo sea incluido para diagnosticar y hacer seguimiento de enfermedades con fines de investigación, como servicio, o como levantamiento de información más precisa para tomar decisiones de la sanidad animal, como sería en el caso del SAG.

La principal desventaja de la metodología propuesta es el alto costo del equipamiento requerido (termociclador en tiempo real). Los diagnósticos sustitutos del PCR en tiempo real, como el análisis de microscopio o cultivo microbiológico son un orden de magnitud más baratos. Es por esto que la principal aplicación de un análisis múltiple de patógenos con el fin de cuantificarlos estaría ligada a algún proyecto de investigación.

En este sentido surge la opción de postular a al menos dos fuentes de financiamiento público que pueden ser complementados con aportes directos de los apicultores para el análisis de sus colmenas. La Fundación Fraunhofer Chile Research cumple con los requisitos técnicos, logísticos y de capital humano para ejecutar esta propuesta, la cual se podría poner en marcha en alrededor de cuatro meses.

A modo de proyección, la aplicación de esta metodología de análisis permitiría la detección y cuantificación de diversos patógenos, lo que posibilita el estudio de sus interacciones. Así por ejemplo se puede estudiar la dinámica poblacional de cada patógeno y su efecto en el sistema inmune, cuantificando transcritos asociados a esto, todo dentro de un mismo ensayo de qPCR.

También sería posible realizar análisis filogenético de patógenos en Chile. Para esto se requiere secuenciar los amplicones generados y alinearlos, permitiendo construir arboles filogenéticos pero además dando la posibilidad de encontrar ciertas líneas que sean más susceptibles o resistentes a medicamentos (Chen y col., 2009b).

Otra aplicación de gran relevancia es que el método se puede utilizar para el estudio de patógenos en polinizadores nativos, sobre lo que aún no hay antecedentes en Chile, sin embargo se han detectado patógenos en diversas especies de abejas y abejorros

silvestres en otros países, lo cual aumenta la preocupación por la seguridad de la polinización (Manley y col., 2015; Vanbergen, 2013).

Es posible aplicar esta metodología para el análisis de patógenos de cultivos agrícolas tales como la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*, más conocida como PSA, que ha afectado considerablemente a la industria de kiwis nacional y mundial, y que se ha descrito que puede ser dispersada a través de abejas (Pattimore y col., 2014).

También sería posible el estudio de la genética de *A. mellifera* en Chile, analizando la presencia de marcadores de la abeja africanizada y definir cuál es la subespecie más prevalente.

Finalmente, surge la posibilidad de detectar a tiempo nuevas plagas y enfermedades que aún no se encuentran en Chile, pero que son potenciales riesgos para la industria apícola nacional. Para esto es necesario hacer un monitoreo continuo con el fin de evitar que ocurran focos y se disperse un nuevo agente en nuestro país, requiriendo optimizar el protocolo de análisis incorporando los partidores específicos para el patógeno que se desee estudiar.

5 CONCLUSIONES

Colmenas que prestan el servicio de polinización en la Región Metropolitana presentan una alta prevalencia de *V. destructor* y *Nosema* spp., encontrándose la prevalencia más alta de ambos patógenos en almendros, floración que ocurre en invierno y cuyas condiciones ambientales posiblemente afectan en la susceptibilidad a estas enfermedades.

El estudio de la literatura asociada a metodologías de análisis de enfermedades y plagas en las colmenas de *A. mellifera* es concluyente en términos de las ventajas de PCR en tiempo real por sobre los métodos de microscopía y otras técnicas basadas en PCR: mayor rapidez, sensibilidad y especificidad, con la capacidad de cuantificar.

Se estima un costo moderado para la aplicación del protocolo de muestro y diagnóstico rápido, sensible y específico de los 10 principales patógenos en colmenas chilenas y se establecen los pasos a seguir para su implementación.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Aizen, M., Garibaldi, L., Cunningham, S., Klein, M. 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany*. **103**: 1579-1588.
- Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*. **11**: 2284-2290.
- Barriga, P., Cifuentes-Muñoz, N., Rivera, P., Gutierrez, M., Shmaryahu, A., Valenzuela, P., Engel, E. 2012. First detection and complete genome sequence of *Deformed wing virus* in Chilean honeybees. *Virus Genes*. **45**:606-9.
- Bourgeois, A., Rinderer, T., Beaman L., Danka R. 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* **103**: 53-58.
- Boecking, O., Genersch, E. 2008. Varroosis - the Ongoing Crisis in Bee Keeping. *J. Verbr. Lebensm.* **3**: 221-228.
- Carletto J., Gauthier A., Regnault J., Blanchard P., Schurr F. & Ribière-Chabert M. 2010. Detection of main honeybee pathogens by multiplex PCR. *EuroReference*,**4**: 413-415.
- Chantawannakul, P., Ward, L., Boonham, N., Brown, M. 2006. A Scientific Note on the Detection of Honeybee Viruses Using real-time PCR(TaqMan®) in Varroa Mites Collected from a Thai Honeybee (*Apis mellifera*) Apiary. *Journal of Invertebrate Pathology*. **91**: 69-73.
- Chen, Y., Evans, J.D., Murphy, C.A., Gutell, R., Lee, J., Zuker, M., Gundersen, D.E., Pettis, J.S. 2009. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **56**:142-147.
- Chen Y., Evans J.D., Zhou L., Boncristiani H., Kimura K., Xiao T., Litkowski A.M., Pettis J.S. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees, *J. Invertebr. Pathol.* **101**: 204-209.
- Chen Y., Chung W., Wang C., Solter L., Huang W.. 2012. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *Journal of Invertebrate Pathology* **111**: 264-267
- Chen, Y., y Siede, R., 2007. Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* **70**: 33-80.
- Dainat, B., Evans, J., Chen, Y., Neumann P. 2011. Sampling and RNA quality for diagnosis of honey bee viruses using quantitative PCR. *J Virol Methods* **174**: 150-152.
- Danty, J. 2007. Mesa Apícola Nacional, Instancia de articulación público privada, acciones desarrolladas desde su origen. *Agro Sur* **35**: 16-21.
- de la Cuadra, S. 2010. Polinización de cultivos agrícolas: Una mirada actualizada. *Actualidad Apícola* **2**: 2-5.
- de Miranda, J., Cordoní, G., Budge, G., 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmirbee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*. **103**: 30-47.
- De Smet, L., Ravoet, J., de Miranda, J., Wenseleers, T., Mueller, M., Moritz,R., de Graaf, D. 2012. BeeDoctor, a versatile MLPA-based diagnostic tool for screening bee viruses. *PLoS ONE*. **7**: e47953.

Del Río, P. 2013. Prevalencia de Varroasis y Braulosis al inicio de la temporada apícola en apiarios de la Provincia de Melipilla, Región Metropolitana. Tesis.

Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., Ellis, J.D. 2013. Standard methods for varroa research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. J. Apicult. Res. 52(1).

Doublet V, Natsopoulou ME, Zschieche L, Paxton RJ. 2015. 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.

Eilers, E. J., Kremen, C., Smith Greenleaf, S., Garber, A. K. & Klein, A.-M. 2011. Contribution of Pollinator-Mediated Crops to Nutrients in the Human Food Supply. PLoS ONE **6**: e21363.

El Tipógrafo. (24 de julio del 2014). *Fedemiel en alerta por mortandad de abeja*. Consultado el 02 de febrero del 2015 en www.eltipografo.cl/2014/07/fedemiel-en-alerta-por-mortandad-de-abejas

Ellis A., Myers S, Ricketts TH.2015. Do Pollinators Contribute to Nutritional Health? PLoS ONE **10**: e114805.

Estay, P. Patricia. (ed.) 2012. Abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): polinización según especie objetivo. Boletín INIA N° 235.163 p Boletín 2012.

EurekaAlert!. (13 de mayo del 2015). University of Maryland: *U.S. beekeepers lost 40 percent of bees in 2014-15*. Consultado el 14 de mayo del 2015 en www.eurekaalert.org/pub_releases/2015-05/uom-nbl051115.php

European Union Reference Laboratory for honeybee health (EURL). 2011. Guidelines for a pilot surveillance project on honeybee colony losses. 1–34 p.

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

Gallai, N., Salles, J., Settele, J. & Vaissière, B. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecological Economics. **68**: 810–821

Garrido-Bailón E., Higes M., Martínez-Salvador A., Antúnez K., Botías C., Meana A., Prieto L., Martín-Hernández R. 2013. The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. **6**: 731-9

Garrido-Bailón E. 2012. Repercusión Potencial en la Cabaña Apícola Española de Agentes Nosógenos Detectados en Colonias de *Apis Mellifera Iberiensis*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Sanidad Animal. Tesis Doctoral.

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

- Han S.H., Lee D.B., Lee D.W., Kim E.H. & Yoon B.S. 2008. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood (AFB). *J. Invertebr. Pathol.*, **99**: 8–13.
- Hinojosa, A. y González, D. 2004. Prevalencia de parásitos en colmenares del secano costero e interior de la VI Región, Chile. *Parasitol. Latinoam*, **59** : 137-141.
- Huang W., Solter L.F., Yau P.M., Imai B. 2013. *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathogens*. **9**: e1003185.
- Kanbar G, Engels W. 2003. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctionured by Varroa mites. *Parasitology*. **9**: 349-354.
- Kennedy C., Lonsdorf1, E., Neel, M., Williams, T. H. Ricketts, R. Winfree, R. Bommarco, C. Brittain, A. L. Burley, D. Cariveau, L. G. Carvalheiro, N. P. Chacoff, S. A. Cunningham, B. N. Danforth, J.-H. Dudenhofer, E. Elle, H. R. Gaines, L. A. Garibaldi, C. Gratton, A. Holzschuh, R. Isaacs, S. K. Javorek, S. Jha, A. M. Klein, K. Krewenka, Y. Mandelik, M. M. Mayfield, L. Morandin, L. A. Neame, M. Otieno, M. Park, S. G. Potts, M. Rundlof, A. Saez, I. Steffan-Dewenter, H. Taki, B. F. Viana, C. Westphal, J. K. Wilson, S. S. Greenleaf and C. Kremen. 2013. A global quantitative synthesis of local and landscape effects on wild bee pollinators in agroecosystems. *Ecol Lett*. **16**: 584–599.
- Klatt, B., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., Tschardtke, T. 2014. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proc. R. Soc.* **281**: 20132440.
- Klein, A., Vaissiere B., Cane, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S., Kremen, C., Tschardtke, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of The Royal Society Biological Science*. **274**: 303 - p313.
- Kubista, M., Andrade, M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects*. **27**: 95–125.
- Lach L., Kratz M., Baer B. 2015. Parasitized honey bees are less likely to forage and carry less pollen. *J Invertebr Pathol*. **130**:64-71.
- Lourenco, A., Mackert, A., Cristino, A, Simoes, Z. 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* **39**:372–385.
- Manley, R., Boots, M. , Wilfert, L. 2015. Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *Journal of Applied Ecology*. doi: 10.1111/1365-2664.12385.
- Martínez, J., Simon, V., Gonzalez, B., Conget P. 2010. A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Lett. appl. Microbiol.* **50**: 603–610.
- Moritz, R., de Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P., Paxton, R. 2010. Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*. **41**: 227-242
- Neira, M.; Dussaubat, C.; Manquián N., Bahamonde, Py Vera, M. 2007. Sanidad apícola en Chile, situación de las principales enfermedades. *Agro Sur*. **35**: 47-48.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2014. Principios y avances sobre Polinización como servicio ambiental para la Agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe.

ODEPA. (sin fecha). Frutales: superficie y producción. Consultado el 14 de octubre del 2014 en <http://www.odepa.cl/frutales-superficie-y-produccion-2/>.

OIE. Oficina Internacional de Epizootias. 2012. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

Pattemore D., Goodwin R., McBrydie H., Hoyte S., Vanneste J. 2014. Evidence of the role of honey bees (*Apis mellifera*) as vectors of the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Australasian Plant Pathology. 43: 571-575.

ProChile. (sin fecha). Por qué los alimentos chilenos. Consultado el 14 de octubre del 2014 en <http://www.prochile.gob.cl/int/ecuador/sector/agricola-y-alimentos/>

Procop G. 2007. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. Clin Infect Dis. 2: 99-111.

Reinike, E. 2013. Prevalencia de *Nosema sp.* y *Malpighamoeba mellificae* al inicio de la temporada en apiarios de la Provincia de Melipilla, Región Metropolitana. Tesis.

Rivière, M., Ribière, M., Chauzat, M. 2013. Recent molecular biology methods for foulbrood and nosemosis diagnosis. Rev Sci Tech. 32: 885-92.

Rodríguez, M., Vargas, M., Antúnez, M., Gerding, M., Ovidio, 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. Chilean J. Agric. Res. 74. 2.

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. J. Invertebr. Pathol. 103: 80-95.

Runckel, C., Flenniken, M., Engel, J., Ruby, J., Ganem, D., Andino, R., DeRisi, J. 2011. Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, Nosema, and Crithidia. PLoS ONE. 6: e20656.

Sammatro, D., Gerson, U., Needham, G., 2000. Parasitic mites of honeybees: Life, History, Implications, and Impact. Annu. Rev. Entomol. 45: 519-548.

SAG. Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura de Chile. 2012. Informe Sanidad Animal Chile.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2000. Manual de Patología Apícola.

Shafer, J. 2011. Sanidad Apícola en Chile. Nosemosis, Varroosis y Acarapisosis. Tesis.

Sammataro, D., De Guzman, L.I., George, S., Ochoa, R. 2013. Standard methods for tracheal mite research. In: Dietemann, V., Ellis, J.D, Neumann, P., editors. COLOSS Beebook: Volume II: Standard Methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. United Kingdom:IBRA Publications. 1-20.

Siede, R., König, M., Büchler, R., Failing, K., Thiel, H.J., 2008. A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. Apidologie. 39: 650-661.

- Smith KM, Loh EH, Rostal MK, Zambrana-Torrel CM, Mendiola L, Daszak P. 2013. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *Ecohealth*. **10** :434-45.
- Vanbergen, A., Baude, M., Biesmeijer, J., Britton, N., Brown, M., Bryden, J., Budge, G., Bull, J., Carvell, C., Challinor, A., Connolly, C., Evans, D., Feil, E., Garratt, M., Greco, M., Heard, M., Jansen, V., Keeling, M., Kunin, W., Marris, G., Memmott, J., Murray, J., Nicolson, S., Osborne, J., Paxton, R., Pirk, C., Polce, C., Potts, S., Priest, N. K., Raine, N., Roberts, S., Ryabov, E., Shafir, S., Shirley, M., Simpson, S., Stevenson, P., Stone, G., Termansen, M. and Wright, G., 2013. Threats to an ecosystem service : Pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*. **11**: 251-259.
- Vanengelsdorp, D., Evans, J., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarry, D., Pettis, J. 2009. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*. **4**: e6481.
- vanEngelsdorp, D., & Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* **103**: 80-95.
- Winfree, R., Williams, N., Dushoff, J. & Kremen, C. 2007. Native bees provide insurance against ongoing honey bee losses. *Ecology Letters* **10**: 1105–1113.
- Weile J, Knabbe C. 2009. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **394**(3): 731-742
- Yang, X., & Cox-Foster, D., 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* .**134**: 405–412.
- Zhao X, Lin CW, Wang J, Oh DH. 2014. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J Microbiol Biotechnol*. **24**(3): 297-312.

ANEXO

Determinación de nivel de infestación por *Varroa* y *Nosema*.

El nivel de infestación de abejas con *Varroa* y el nivel de infección de abejas con esporas de *Nosema* se obtiene a partir de la Tabla 9.

Tabla 9. Interpretación del nivel de infestación con *Varroa* y *Nosema* en abejas.

Nivel de infestación	% Infestación con <i>Varroa</i>	Nº esporas <i>Nosema</i> /abeja
Muy leve	-	25.000 – 250.000
Leve	0,1 - 1	250.001 – 1.500.000
Medio	1,1 - 3	1.500.000 – 2.000.000
Grave	3,1 - 5	2.000.000 – 2.500.000
Muy grave	> 5	> 2.500.000

Tabla 10. Presupuesto de análisis de muestras por qPCR.

Preparación Muestra				
Insumo	Precio/cantidad min	n° rxns	\$ X1	x3 (muestras)
Frascos para muestras	\$ 50.000	100	\$ 500	\$ 1.500
MagJET RNA Kit	\$ 950.000	384	\$ 2.474	\$ 7.422
Superscript II	\$ 190.000	50	\$ 3.800	\$ 11.400
Random primers	\$ 70.000	50	\$ 1.400	\$ 4.200
Tubos Eppendorf	\$ 50.000	500	\$ 100	\$ 300
Agua destilada ultra pura	\$ 25.000	100	\$ 250	\$ 750
(otros)			800	\$ 2.400
Total extracción ácido nucleico	-	-	\$ 8.824	\$ 26.472

qPCR						
Insumo	Precio/cantidad min	n° rxns	Precio/Reacción	Precio 10 blancos	x3 (muestras)	1 Placa
Fast SybrGreen MasterMix	\$ 270.000	500	\$ 540	\$ 5.400	\$ 16.200	\$ 16.740
8 tubos strip	\$ 49.646	1000	\$ 50	\$ 496	\$ 1.489	\$ 1.539
8 tapas strip	\$ 70.092	1000	\$ 70	\$ 701	\$ 2.103	\$ 2.173
Puntas plásticas microamp FAST optical	\$ 5.000	100	\$ 50	\$ 500	\$ 1.500	\$ 1.550
96 well plate	\$ 21.991	960	\$ 2.200	\$ 2.200	\$ 2.200	\$ 2.200
Primer Fw	\$ 3.000	2000	\$ 2	\$ 15	\$ 45	\$ 47
Primer Rv	\$ 3.000	2000	\$ 2	\$ 15	\$ 45	\$ 47
(otros)			\$ 700	\$ 7.000	\$ 21.000	\$ 21.700
Total	-	-	\$ 3.613	\$ 16.327	\$ 44.582	\$ 45.995

Mano de obra	
N° muestras/persona/día	12
Salario Técnico	\$ 300.000
Pago por día	\$ 10.000
	\$ 3.333

por mano de obra / placa

Mano de obra + insumos (1 placa)	\$ 75.800
Mano de obra + insumos (1 muestra)	\$ 25.267

por 3 muestras analizadas para 10 blancos

por 1 muestra analizada para 10 blancos

Glosario

Colmena: conjunto formado por un enjambre de abejas, la estructura que lo contiene y los elementos propios necesarios para su supervivencia. La colmena de tipo móvil o moderna posee estructuras independientes que facilitan el manejo del apicultor al interior de la colmena.

Cría: estados del ciclo de vida de la abeja que incluye a huevos, larvas y pupas.

Explotación apícola: conjunto de apiarios, de un mismo dueño con independencia de su finalidad o emplazamiento.

Manejo (gestión): considera todas aquellas prácticas que se aplican en la producción, bienestar general, salud de las abejas y cuidados del medio ambiente.

Marco: Rectángulo removible que posee una lámina de cera o plástico sobre la cual las abejas construyen su panal.

Monitoreo: secuencia planificada de observaciones y mediciones relacionadas con el cumplimiento de actividad, y que se puede registrar.

Prevalencia: frecuencia de muestras positivas a una enfermedad respecto del total.