



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

“Detección de parásitos intestinales en *Bombus terrestris* y *Xylocopa augusti* en Chile Central mediante técnicas moleculares”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga con mención en Medio Ambiente.

Kiara Marcela Fernández Loyola

Director del Seminario de Título: Dr. Rodrigo Medel Contreras

Codirectora: Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Abril 2020

Santiago – Chile

BIOGRAFÍA



Nació el 14 de diciembre de 1994, en Santiago de Chile. Durante toda su vida ha vivido en la comuna de Puente Alto, junto a su abuela, su madre y sus tíos. Completó su enseñanza básica en el colegio Santa María de la Cordillera y la enseñanza media en el Liceo Carmela Carvajal de Prat. El año 2011 y debido a las movilizaciones estudiantiles, repitió tercero medio, lo que le sirvió para decidir mejor su futuro. Fue así que en el 2014 ingresó a Biología ambiental debido a su interés por la naturaleza y al trabajo en laboratorio. Le gusta nadar, comer sushi, viajar, estar con sus perritos y ver películas.

Para Charlie y July.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Tita, la mujer que me inspira todos los días y la que se ha esforzado por darnos lo mejor a mis tíos y a mis primos, muchas gracias, me faltará vida para agradecerle. Ella junto con mi mamá me apoyan incondicionalmente, celebran todos mis logros y siempre se preocupan por mí, muchas gracias mamá por todo. Gracias a mis tíos, Chavy, María, Benja, por siempre estar, gracias a mis primos Aziel, Mateo y Bruno. Gracias al tata, por quererme a su manera, por sus ricas comidas y por motivarme a dar lo mejor de mí. Gracias a mi familia de Temuco, porque sé que a pesar de la distancia puedo contar con ustedes, a mi tía Paty, Cami, Dani y tío Paty.

Gracias al Claudio, por ser mi compañero durante todos estos años, en las buenas y en las malas, por contenerme, por todos los buenos momentos, coincidir en esta etapa hizo que todo fuera más fácil.

Gracias a mis amigas, Amapola y Pascale, porque a pesar de no vernos mucho sé que están ahí para lo que necesite, gracias por todos estos años de amistad. Gracias a mis compañeros y amigos de la universidad Coni, Lucho, Dani, Roci, Lucas, Moni, y a todos los demás por los buenos momentos y hacer de estos años universitarios inolvidables.

Gracias a Dony por tu ayuda y paciencia, sin ti no hubiera sido posible esta tesis. Gracias a mis profes, a la profe Jennifer, por recibirme en su laboratorio, por creer en mí y por enseñarme a trabajar de forma metódica y profesional, al profe Rodrigo, por confiar completamente en mi propuesta y en mi trabajo. Gracias profe Carezza por guiarme cuando lo necesité y por su entrega. Le agradezco también a la Dra. Marina Arbetman que me brindó su ayuda sin conocerme y me proporcionó los controles necesarios para comenzar con mis experimentos.

Por último pero no menos importante, quiero darle las infinitas gracias a mis perritos, Charlie, July y Luna, por ser mis mejores amigos y por alegrarme mis días.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Contenidos	V
Índice de Tablas	VII
Índice de Figuras	VIII
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 <i>Bombus terrestris</i>	3
1.2 Efectos de la introducción de <i>Bombus terrestris</i>	4
1.3 Parásitos intestinales asociados a <i>Bombus terrestris</i>	5
1.4 <i>Xylocopa augusti</i>	7
1.5 ADNr como herramienta molecular para la identificación de especies	8
1.6 Planteamiento del problema	9
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1 Obtención de muestras	12
3.2 Extracción de ADNA	13
3.3 Prospección de parásitos mediante amplificación por PCR	13
3.4 Secuenciación y análisis de datos	16
4. Resultados	17
4.1 Obtención de muestras	17
4.2 Prospección de parásitos	18

4.2.1 Partidores	18
4.2.2 Controles positivos de infección	18
4.2.3 Control positivo de la reacción	19
4.2.4 Presencia de <i>Apicystis bombi</i>	20
4.2.5 Presencia de <i>Crithidia bombi</i>	21
4.2.6 Presencia de <i>Nosema bombi</i>	22
4.3 Secuenciación	24
5. Discusión	26
5.1 Presencia de parásitos en <i>Xylocopa augusti</i>	26
5.2 Presencia de parásitos en <i>Bombus terrestris</i>	27
5.3 Otros métodos de detección	30
6. Conclusiones	32
7. Bibliografía	33
8. Anexos	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Partidores utilizados en este seminario de título incluyendo secuencia, blanco de amplificación, tamaño del producto esperado y referencia.	15
Tabla II. Número de individuos colectados por especie en cada zona de muestreo.	17
Tabla III. Identificación de las muestras colectadas y presencia o ausencia de parásitos intestinales.	23
Tabla IV. Identificación de las secuencias utilizando el programa bioinformático BLAST.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) <i>Bombus terrestris</i> . (B) <i>Bombus dahlbomii</i> . (C) <i>Xylocopa augusti</i> hembra (D) <i>Xylocopa augusti</i> macho.	4
Figura 2. Organización cromosómica y genómica del ADNr en eucariontes adaptada de Malinska y col. (2011).	9
Figura 3. Mapa de la Región Metropolitana de Chile indicando, con círculos de colores, las zonas de muestreo de ambas especies.	12
Figura 4. Productos de PCR obtenidos visualizados en un gel de agarosa al 2%.	19
Figura 5. Productos de PCR obtenidos utilizando la pareja de partidores Neo-F2-FN y NeoR visualizados en un gel de agarosa al 2%.	21
Figura 6. Productos de PCR obtenidos utilizando la pareja de partidores Fw2-CB-GU y Rv2-CB-GU visualizados en un gel de agarosa al 2%.	22
Figura 7. Productos de PCR obtenidos utilizando la pareja de partidores Nbombi-Fw2 y Nbombi-Rv2 visualizados en un gel de agarosa al 2%.	23

RESUMEN

Bombus terrestris es un abejorro de la familia Apidae comercializado a nivel mundial para la polinización de cultivos. En Chile fue introducido en el año 1997 y después del escape de las colonias de los cultivos se estableció en el extremo sur del país y en la Patagonia Argentina, lo que coincidió con una fuerte reducción en la abundancia del abejorro nativo *Bombus dahlbomii*, presumiblemente a través de una competencia mediada por parásitos. Con respecto a lo anterior, uno de los riesgos potenciales asociados con la invasión de una tercera especie al sistema es la propagación de patógenos, es decir, la situación en la que una especie reservorio con una alta prevalencia de patógenos entra en contacto con nuevas especies hospederas. La recientemente introducida abeja carpintera *Xylocopa augusti*, se ha establecido en el centro de Chile, pero su rol funcional como potencial hospedero de los parásitos intestinales que afectan principalmente al género *Bombus* como *Apicystis bombi*, *Crithidia bombi* y *Nosema bombi* aún no se ha examinado. Como *B. terrestris* es un polinizador abundante en el centro de Chile, es probable que los patógenos se hayan propagado desde esta especie hasta la recién llegada *X. augusti*. En este trabajo, se evaluó la presencia de patógenos intestinales en *B. terrestris* y *X. augusti* coexistentes de diferentes localidades del centro de Chile mediante técnicas moleculares que incluyen extracción de ADN, ensayos de PCR y secuenciación. Los resultados indican que *X. augusti* no está parasitado por estos patógenos, mientras que los tres parásitos estudiados en este trabajo se detectaron en *B. terrestris*. La prevalencia de infección en *B. terrestris* fue muy similar a la reportada en otros estudios. En resumen, los resultados de este estudio indican que *X. augusti* no mostró evidencia de infección por los parásitos que infectan a *B. terrestris*.

ABSTRACT

Bombus terrestris is a bumblebee of the Apidae family commercialized worldwide for crop pollination. In Chile, *B. terrestris* was introduced in 1997 and after escape confinement was established in central-southern Chile, and in the Argentine Patagonia, where its arrival coincided with a strong reduction in abundance of the native bumblebee *Bombus dahlbomii*, presumably through parasite-mediated competition. In this regard, one of the potential risks associated with the invasion of a third species to the system is pathogen spillover, that is, the situation when a reservoir species with a high pathogen prevalence comes into contact with novel host species. The recently introduced carpenter bee *Xylocopa augusti*, has been established in central Chile, but its functional role as potential host of the intestinal parasites that mainly affect the *Bombus* genus such as *Apicystis bombi*, *Crithidia bombi* and *Nosema bombi* has not yet been examined. As *B. terrestris* is an abundant pollinator in central Chile, it is likely that pathogens have spread from this species to the recently arrived *X. augusti*. In this work, the presence of intestinal pathogens in coexisting *B. terrestris* and *X. augusti* from different localities of central Chile was evaluated by molecular techniques including DNA extraction, PCR assays and sequencing. The results indicate that *X. augusti* is not parasitized by these pathogens, while the three parasites studied in this work were detected in *B. terrestris*. The prevalence of infection in *B. terrestris* was largely similar to that reported in other studies. In summary, results from this study indicate that *X. augusti* did not show evidence of infection by the parasites infecting *B. terrestris*.

INTRODUCCIÓN

1.1 *Bombus terrestris*

Bombus terrestris, es un abejorro de la familia Apidae (Figura 1a) cuyo rango de distribución natural se limita principalmente al hemisferio norte templado (Goulson, 2003). La especie es reconocida mundialmente como un polinizador eficiente, convirtiéndose en un importante insumo para los agricultores (Estay, 2007). Entre las características que destacan a esta especie como apta para su comercialización e introducción en distintas partes del mundo para mejorar la polinización de los cultivos se incluyen su hábito generalista, que le permite forrajear una amplia variedad de plantas con flores; su extenso rango de vuelo, que va desde los 2,5-5,0 km (Montalva y col., 2008); su capacidad de visitar un gran número de plantas por vuelo y de forrajear a temperaturas más bajas que el resto de las abejas y su facultad para adaptarse a diversos ambientes (Goulson, 2003). La comercialización de esta especie comenzó en la década de los 90, llegando a países como China, Australia, Japón, Uruguay y México. Actualmente ha sido importado a 57 países, 16 de ellos fuera de su rango nativo (Murray y col., 2013).

Bombus terrestris fue introducido a Chile en 1997 principalmente para la polinización de tomates de invernadero (Estay, 2007). Posteriormente se utilizó fuera de invernaderos para la polinización de paltos, pimientos y arándanos. Uno de los efectos de la introducción intencional de *B. terrestris* ha sido el escape de los cultivos, estableciéndose incluso en el extremo sur de Sudamérica y en la Patagonia Argentina (Morales y col., 2013), país donde se ha prohibido reiteradamente su importación (Aizen y col., 2018).



Figura 1. (A) *Bombus terrestris* (tomada por Andrés Cecconi). (B) *Bombus dahlbomii* (tomada por Pablo Vial). (C) *Xylocopa augusti* hembra (tomada por Juan Domingo Cerutti). (D) *Xylocopa augusti* macho (tomada por Joao Vitor Andriola).

1.2 Efectos de la introducción de *Bombus terrestris*

Algunos de los impactos asociados con la introducción de abejorros para la polinización de cultivos son: 1) modificación de la estructura de la comunidad de plantas nativas debido a la disrupción de la polinización efectiva. Se ha documentado que cuando la estructura de la flor hace que los nectarios sean inaccesibles, *B. terrestris* utiliza la mandíbula para morder la base de la corola, removiendo néctar sin depositar polen sobre los estigmas, es decir, sin participar como agente de polinización (Kenta y col., 2007; Montalva y col., 2008), 2) competencia por zonas de nidificación o por recursos florales, 3) posible hibridación con especies nativas, lo que disminuiría los encuentros intraespecíficos, podría generar híbridos no viables y reducción del tamaño

poblacional, (Kanbe y col., 2008) y 4) transmisión de patógenos, evidenciada por una asociación positiva entre *B. terrestris* y la abundancia de parásitos en poblaciones naturales de especies coexistentes (Arbetman y col., 2012). Esto se debe, en parte, a que las especies invasoras pueden actuar como vectores de parásitos y patógenos exóticos capaces de infectar especies nativas y otras estrechamente relacionadas (Stout y Morales, 2009), probablemente a través del uso compartido de flores (Durrer y Schimid-Hempel, 1994).

Un claro ejemplo de los impactos negativos de la introducción de polinizadores exóticos es el caso de *Bombus dahlbomii* (Figura 1b), única especie de abejorro nativo del sur de Chile y Argentina. En la última década, *B. dahlbomii* ha desaparecido en el 80% de las zonas que habitaba antes de la colonización por *B. terrestris*, mientras que *B. terrestris* se ha convertido en una de las especies más abundantes en aquellos sitios, en particular en la zona central de Chile (Montalva, 2012).

1.3 Parásitos intestinales asociados a *Bombus terrestris*

Existe un amplio rango de parásitos que afectan a *B. terrestris*, entre ellos ácaros, nemátodos y protozoos. Dentro de este último grupo destacan parásitos intestinales tales como:

1. *Nosema bombi*, microsporidio cuyas esporas se presentan principalmente en el tracto digestivo (McIvor y col., 1995) y también en el sistema traqueal. Este parásito intracelular obligado afecta a distintas especies de abejorros en Europa y puede producir diarrea, deformaciones en las alas e inhibición del apareamiento en sus hospederos (Murray y col., 2013).

2. *Crithidia bombi*, tripanosoma flagelado que es transmitido por la ingesta y por células infecciosas desprendidas en las heces (Durrer y Schmid-Hempel, 1994), además por compañeros de nido infectados o por el uso compartido de flores. Reside en el intestino de sus hospederos y sólo puede sobrevivir por períodos muy breves fuera de éstos (Schmid-Hempel y col., 1999).
3. *Apicystis bombi*, parásito que ha sido registrado en aproximadamente 20 especies de *Bombus* en el mundo (Macfarlane y col., 1995). Causa una gran preocupación debido a su alta virulencia, infecta el tejido adiposo causando su ruptura, reduce el éxito en el establecimiento de colonia y aumenta la tasa de mortalidad de las obreras (Rutrecht y Brown, 2008). También ha sido detectado parasitando *Apis mellifera*, (Plischuk y col., 2011).

Nosema bombi ha sido detectado en el sur de Chile (Vallejos, 2013) y en la Patagonia Argentina (Schmid-Hempel y col., 2014), en *B. terrestris*, *Bombus ruderatus*, abejorro introducido en Chile en 1982 para la polinización del trébol rosado y en *B. dahlbomii*. *Crithidia bombi* y *A. bombi* fueron detectados por primera vez en *B. terrestris* en Sudamérica en un estudio realizado en la Patagonia Argentina el año 2009 (Plischuk y Lange, 2009). Si bien muchos de estos trabajos se han realizado en Argentina, estos abejorros exóticos proceden de Chile, ya que en Argentina se ha prohibido de manera sistemática la importación de dichas especies.

Aunque se ha documentado que los parásitos mencionados parecieran ser específicos del género *Bombus* (Meeus y col., 2011), existe el riesgo latente que puedan extenderse a especies de otros géneros que hasta ahora no han sido expuestas, a través del uso cada vez mayor de esta especie para la polinización (Colla y col., 2006).

1.4 *Xylocopa augusti*

Las abejas carpinteras del género *Xylocopa* habitan principalmente en los trópicos y subtropicos, donde son consideradas eficientes polinizadores ya que favorecen la producción en los cultivos principalmente de maracuyá (Gerling y col., 1989).

La diversidad de este grupo en Chile es baja, en comparación con otros países vecinos. En años recientes se registró por primera vez en Chile, específicamente en la Región Metropolitana, la presencia de la abeja carpintera *Xylocopa augusti* (Figura 1c y 1d) cuya distribución original es en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. Esta introducción podría haber sido accidental desde Argentina a través de nidos no detectados en estructuras de empaque en importaciones comerciales (Montalva y col., 2013). Sin embargo, los efectos de su introducción aún no han sido estudiados.

Uno de los patógenos que afectan a *X. augusti* son *Ascosphaera apis*, hongo que produce el fenómeno de la cría yesificada (Reynaldi y col., 2015) y que afecta también a *A. mellifera*. Además, en 2013 se detectó en Argentina el virus que deforma las alas, que afecta a otros polinizadores como *A. mellifera* y *B. terrestris* (Lucia y col., 2015).

1.5 ADNr como herramienta molecular para la identificación de especies

El ADN ribosómico (ADNr) corresponde a un conjunto de genes que codifican ARN ribosómico (ARNr) (Figura 2), y actualmente es utilizado como una herramienta taxonómica para la identificación molecular. Está formado por regiones codificantes separadas por espaciadores que se transcriben y otros que no. Existen genes que codifican el ARNr de la subunidad mayor del ribosoma y aquellos que codifican el ARNr de la subunidad menor del ribosoma. Los genes que codifican el ARNr de la subunidad menor (SSU ARNr) son secuencias de referencia estándar para la clasificación taxonómica de organismos, lo que ha contribuido a que existan bases de datos muy amplias (Wang y col., 2014). Esta región, ya sea en eucariontes (ARNr 18S) o en procariontes (ARNr 16S) es utilizada como un marcador molecular ya que contiene una variabilidad y una divergencia genética significativa a nivel de especie, posee sitios conservados que permiten construir partidores universales que pueden utilizarse para secuenciar el ADNr de muchas especies o para amplificar regiones de interés mediante el uso de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (Hillis y Dixon, 1991) y porque tiene una longitud adecuada que permite la secuenciación de una forma fácil y reproducible (Kress y Erickson, 2012). El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos. Se ha utilizado ampliamente para la identificación bacteriana, ya que, al tratarse de una molécula muy antigua, se encuentra presente en todas las bacterias en la actualidad. Además, su estructura y función han permanecido constantes en largos períodos de tiempo y los cambios que ocurren son de manera lo suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariontes (Rodicio y Mendoza, 2004). La macromolécula equivalente en eucariontes es el ARNr 18S. El gen que codifica esta macromolécula es universal en los eucariontes y al igual

que en procariontes, presenta una velocidad evolutiva muy lenta. Además, los genes ribosómicos están agrupados (organizados en *cluster*) y se encuentran repetidos en una gran cantidad de veces en el genoma lo que facilita la extracción, amplificación y secuenciación de ellos (Fayet-Lebaron y col., 2009).

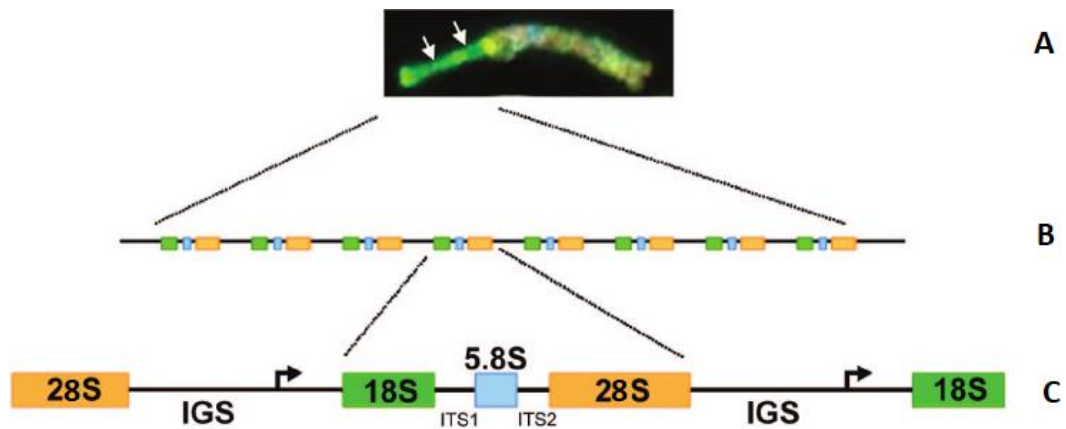


Figura 2. Organización cromosómica y genómica del ADNr en eucariontes adaptada de Malinska y col. (2011). (A) Cromosoma, con flechas blancas se indican la parte terminal donde a menudo se encuentran los grupos de genes de ARNr. (B) Cada grupo de genes está compuesto de cientos a miles de unidades dispuestas en tándem. (C) Estructura genómica del ADNr, cada unidad está compuesta de regiones genéticas conservadas que codifican el ARNr de la subunidad mayor del ribosoma 18S y 5.8S (rectángulos verde y celeste respectivamente) y ARNr de la subunidad menor 28S (rectángulo amarillo) que están separadas por los espaciadores transcritos internos (ITS1, ITS2) y por espaciadores intergénicos (IGS).

1.6 Planteamiento del problema

Actualmente la introducción de polinizadores es un importante agente que afecta negativamente la biodiversidad de los sistemas planta-polinizador que habitan los hábitats invadidos. Uno de los mecanismos a través de los cuales la introducción de polinizadores impacta en las comunidades locales es mediante la propagación de parásitos. Si bien las especies de parásitos del abejorro *B. terrestris* han sido ampliamente estudiadas alrededor del mundo, actualmente existe poca información para el hemisferio sur, y en particular para la zona central de Chile. Mucho más preocupante es el caso de la reciente introducción de *X. augusti*, cuyos impactos en Chile aún no han sido estudiados. Al ser *B. terrestris* una especie generalista abundante en la zona central del país (Montalva y col., 2012), existe la posibilidad que los patógenos se hayan extendido a otras especies invasoras, como *X. augusti*. En este seminario de título se indagó mediante técnicas moleculares la presencia de algunos de los parásitos intestinales en ejemplares del abejorro europeo *B. terrestris* y de la abeja carpintera *X. augusti* en distintas poblaciones de Chile Central.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Detectar la presencia de los parásitos intestinales *Nosema bombi*, *Crithidia bombi* y *Apicystis bombi* mediante técnicas moleculares en el abejorro europeo *Bombus terrestris* y en la abeja carpintera *Xylocopa augusti* en distintos contextos de coexistencia en Chile central.

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar mediante técnicas moleculares la presencia de *N. bombi*, *C. bombi* y *A. bombi* en el abejorro europeo *Bombus terrestris*
2. Detectar mediante técnicas moleculares la presencia de *N. bombi*, *C. bombi* y *A. bombi* en *Xylocopa augusti*.
3. Determinar si existe potencial de transmisión de patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de muestras

Se realizaron campañas de muestreo entre octubre y diciembre de 2018 en distintas poblaciones de la ciudad de Santiago (Figura 3). Se tomó en cuenta sitios donde sólo habitara *B. terrestris*, sólo habitara *X. augusti* y sitios de coexistencia de ambas especies. La recolección se llevó a cabo entre las 11:00 y las 15:00 h del día, considerando entre 2-9 días por sitio. Los abejorros se capturaron utilizando frascos de eutanasia estériles, y posteriormente fueron almacenados en alcohol 95% a -20°C .

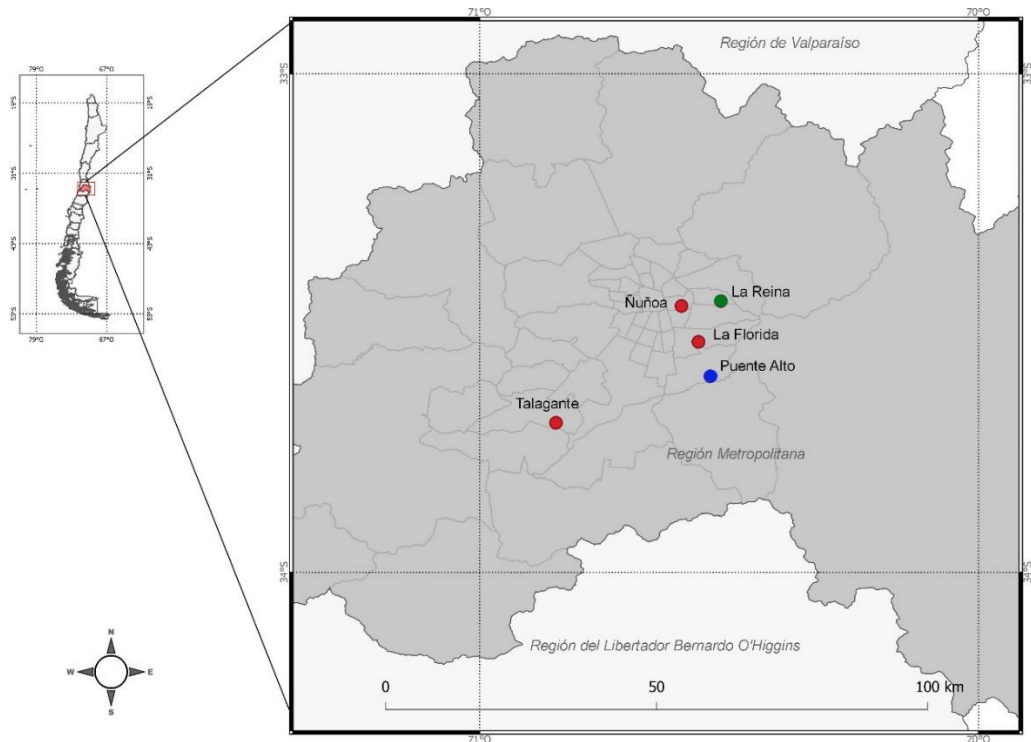


Figura 3. Mapa de la Región Metropolitana de Chile indicando, con círculos rojos, las zonas de muestreo de ambas especies, con círculo verde donde se colectó sólo *B. terrestris* y con un círculo azul la zona donde sólo se colectó *X. augusti*.

3.2 Extracción de ADN

Para el análisis de muestras se extrajeron entre 10-30 mg del sistema digestivo de cada insecto utilizando pinzas de punta fina y bisturí quirúrgico de uso individual, el que se almacenó en tubos de 1,5 ml a -20°C. La extracción de ADN se realizó con el kit E.Z.N.A.® Tissue ADN (Omega Bio-tek) según instrucciones del fabricante. Finalmente, se cuantificó la concentración del ADN obtenido utilizando un espectrofotómetro para microplacas Epoch 2 (Biotek).

3.3 Prospección de parásitos mediante amplificación por PCR

Se realizaron análisis de PCR para determinar la presencia de parásitos. Para esto, se probaron partidores previamente descritos: ApBF1 y ApUR2 (Meeus y col., 2010) para la detección de *A. bombi*, CBSSU-F2 y CBSSU-B4 (Schimid- Hempel y Tognazzo, 2010) para la detección de *C. bombi*, y el par Nbombi-SSU-Jf1 y Nbombi-SSU-Jr1 (Klee y col., 2006) para la detección de *N. bombi*. Cuando los partidores descritos en la literatura no funcionaron, se diseñaron partidores propios a partir de secuencias almacenadas en la base de datos NCBI correspondientes a secuencias parciales del gen que codifica el ARN de la subunidad menor del ribosoma (SSU rRNA) para cada parásito, las cuales son FN546182 (Meeus y col., 2010) para *A. bombi*; GU321194 (Schmid-Hempel y Tognazzo, 2010) para *C. bombi* y AY741110 (Tay y col., 2005) para *N. bombi*. El detalle de todos los partidores utilizados en este trabajo se indica en la Tabla I.

Como control positivo de la reacción de PCR se amplificó la región 18S de la familia Apidae utilizando la pareja de partidores ApidaeF y ApidaeR (Tabla I) (Meeus y

col., 2010; Arbetman y col., 2012). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l, las que contenían 24 μ l de mezcla de PCR (2,5 μ l de buffer PCR 10X, 2,5 μ l de buffer de carga BCP, 0,2 μ l de una mezcla de dNTPs, 1,0 μ l de cada partidor a 25 μ M, 1,0 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 0,3 μ l de *Taq* ADN polimerasa y agua libre de nucleasas para completar el volumen) y 0,5-1,0 μ l de ADN molde (100-130 ng, aproximadamente). La amplificación se realizó en un termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 94°C por 3 min; 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s; hibridación a 53°C por 30 s y polimerización a 72°C por 3 min. Simultáneamente se realizaron controles negativos de la reacción reemplazando el ADN por agua destilada y controles positivos de infección, los que corresponden a ADN de *B. terrestris* colectados en Argentina, uno positivo para *C. bombi* (control 1) y otro positivo para *C. bombi* y *A. bombi* (control 2) que fueron suministrados por el Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INBIOMA) de la Universidad Nacional del Comahue en Bariloche, Argentina. Los tamaños de los productos de PCR se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñidos con SafeView™ Plus (Applied Biological Materials) y se fotografiaron al exponerse a un transiluminador-UV (Major Science).

Tabla I. Partidores utilizados en este seminario de título incluyendo secuencia, blanco de amplificación, tamaño del producto esperado y referencia.

Nombre	Secuencia	Blanco	Tamaño (pb)	Referencia
ApidaeF	AGATGGGGGCATTCGTATTG	Gen SSU ARNr Familia Apidae	130	Meeus y col. (2010)
ApidaeR	ATCTGATCGCCTTCGAACCT			
BT-F	AGGATTAGACGTTGATACACGAGC	Genoma mitocondrial <i>B. terrestris</i>	447	Este trabajo
BT-R	GGATAATCTGAGTATCGTCGAG			
XA-F	TCCAATAGGAGGAGGAGATC	Gen COI <i>X. augusti</i>	657	Este trabajo
XA-R	CGTCGAGGTATTCCTATCAATCC			
ApBF1	CGTACTGCCCTGAATACTCCAG	Gen SSU ARNr <i>A. bombi</i>	desconocido	Meeus y col. (2010)
ApUR2	TTTCTCATTCTTCAGATGATTTGG			
CB-SSUrRNA-F2	CTTTTGACGAACAACACTGCCCTATC	Gen SSU ARNr <i>C. bombi</i>	desconocido	Schmid- Hempel y Tognazzo (2010)
CB-SSUrRNA-B4	AACCGAACGCACTAAACCCC			
Nbombi-SSU-Jf1	CCATGCATGTTTTTGAAGATTATTAT	Gen SSU ARNr <i>N. bombi</i>	323	Klee y col. (2006)
Nbombi-SSU-Jr1	CATATATTTTTAAAATATGAAACAATAA			
Neo-F2	GCGGTAATTCCAGCTCCAATA	Gen SSU ARNr <i>A. bombi</i>	477	Este trabajo
NeoR	GACAGCTTCCAATCTCTAGTCG			Meeus y col. (2010)
Fw2-CB-GU	TTAGGGTTCGATTCCGGAGAG	Gen SSU ARNr <i>C. bombi</i>	404	Este trabajo
Rv2-CB-GU	CATGCGTGGATCAGGAAAGGA			
Nbombi-Fw2	TGAGGTGATTAATTGGAGGGC	Gen SSU ARNr <i>N. bombi</i>	396	Este trabajo
Nbombi-Rv2	CTCCTTGTGGTATTCTTCCGT			

3.4 Secuenciación y análisis de datos

Para confirmar si efectivamente los productos de PCR obtenidos corresponden a lo esperado, éstos se enviaron a la Unidad de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica. Las muestras fueron procesadas en un ABI PRISM 3500 xl (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software VectorNTI. La identidad de las secuencias se determinó utilizando el programa bioinformático BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

RESULTADOS

4.1 Obtención de muestras

Se capturaron en total 59 ejemplares, 26 individuos de la especie *B. terrestris* y 33 de la especie *X. augusti*. Para identificar a cada individuo de manera sencilla se utilizó la nomenclatura BT o XA (según especie que corresponda, *B. terrestris* o *X. augusti*) + un número del 1 al 59 según orden de muestreo (ejemplo XA 1) (ver Anexo 1). En la Tabla II se detalla la cantidad de individuos colectados por lugar de muestreo y por especie. De las cinco zonas de muestreo, en tres de ellas se capturaron ambas especies, mientras que en La Reina sólo se capturaron *B. terrestris* y en Puente Alto sólo se capturaron *X. augusti*.

Tabla II. Número de individuos colectados por especie en cada zona de muestreo.

Sitio	Coordenadas	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Xylocopa augusti</i>
Ñuñoa	33° 27' 56" S 70° 35' 44" O	10	11
La Reina	33° 27' 22" S 70° 30' 60" O	5	-
La Florida	33° 32' 16" S 70° 33' 42" O	3	9
Talagante	33° 41' 60" S 70° 50' 50" O	8	7
Puente Alto	33° 36' 24" S 70° 32' 16" O	-	6
Total		26	33

4.2 Prospección de parásitos

4.2.1 Partidores

Antes de comenzar con la prospección de parásitos se realizó un análisis de los partidores obtenidos de la literatura, sin embargo, en la bibliografía no se encontró información acerca del tamaño del producto de PCR esperado y tampoco se pudo determinar a partir de las secuencias utilizadas para su diseño, incluso en algunos casos se detectó la formación de horquillas por lo que el uso de estos partidores se descartó. Por este motivo se diseñaron nuevos partidores que se alinearan con las secuencias almacenadas en la base de datos NCBI (Tabla I). Cabe destacar que el partidor NeoR fue obtenido de la literatura (Meeus y col., 2010) ya que alineó correctamente con la secuencia utilizada.

4.2.2 Controles positivos de infección

Una vez que los partidores diseñados estuvieron disponibles, se realizó un análisis de PCR con los dos controles positivos de infección para confirmar si efectivamente amplifican ADN de los parásitos estudiados. Los productos obtenidos fueron del tamaño esperado para ambas muestras (Figura 4, carriles 1-4-7) y no se obtuvieron bandas en el control negativo ni en el control biológico (Figura 4, carriles 2-5-8 y 3-6-9, respectivamente), el que corresponde a ADN de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* proporcionado por el laboratorio de Genética. A partir de estos resultados es posible aseverar que los partidores diseñados estarían detectando la presencia de cada parásito en los controles utilizados.

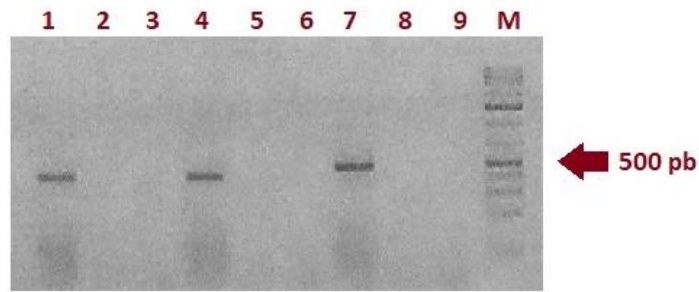


Figura 4. Productos de PCR obtenidos visualizados en un gel de agarosa al 2%. Carriles 1 y 4: banda de aprox. 400 pb detectando *C. bombi* en ambos controles utilizando la pareja de partidores Fw2-CB-GU y Rv2-CB-GU. Carril 7: banda de aprox. 500 pb detectando *A. bombi* utilizando la pareja de partidores Neo-F2 y NeoR. Carriles 2, 5 y 8: controles biológicos negativos. Carriles 3, 6 y 9: controles negativos sin ADN. M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).

4.2.3 Control positivo de la reacción

Con el propósito de confirmar la calidad del ADN utilizado en las reacciones de PCR para ser efectivamente amplificado en reacciones de PCR, independientemente de la presencia o ausencia de infección, se amplificó la región 18S de las 59 muestras utilizando los partidores ApidaeF y ApidaeR específicos para especies de la familia Apidae. Como resultado se obtuvo un producto de PCR de 130 pb, aproximadamente, que corresponde al tamaño esperado con las 59 muestras de ADN obtenidas (ver detalle de los geles en el Anexo 2). De manera complementaria, se diseñó una pareja de partidores específica para cada especie, *B. terrestris* y *X. augusti*, ya que el tamaño de la banda obtenida con los partidores ApidaeF y ApidaeR era muy pequeña y presentó dificultades en su secuenciación. Los partidores se diseñaron a partir de las secuencias almacenadas en la base de datos NCBI con el número de acceso KT164618 (correspondiente secuencia del genoma mitocondrial parcial de *B. terrestris*) y EU122101 (correspondiente a secuencia parcial del gen citocromo oxidasa 1 (COI) de *Xylocopa violacea*) para *B. terrestris* y *X. augusti*, respectivamente (Tabla I). Cabe

destacar que no se encontró una secuencia de nucleótidos específica para *X. augusti*, por lo que se utilizó una secuencia correspondiente a una especie del mismo género. Al realizar reacciones de PCR con estos nuevos partidores, el resultado fue el esperado; es decir, se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado en las 26 muestras de ADN de *B. terrestris* (450 pb, aproximadamente) y en las 33 muestras de ADN de *X. augusti* (650 pb, aproximadamente) (Anexo 3 y 4). Adicionalmente, los partidores diseñados para *B. terrestris*, no amplifican el ADN de *X. augusti* y viceversa, apoyando que dichos partidores son específicos para cada especie (Anexo 5). Finalmente se seleccionaron dos productos de PCR al azar, uno correspondiente a ADN de *B. terrestris* y el otro a ADN de *X. augusti* para confirmar el resultado mediante secuenciación.

4.2.4 Presencia de *Apicystis bombi*

Luego de haber confirmado la efectividad de los partidores diseñados y la calidad del ADN, se evaluó la presencia de *A. bombi* en todas las muestras. Se obtuvieron siete bandas del tamaño esperado (477 pb) (Figura 5, carriles 1-7). Dichos productos de PCR corresponden a ADN de *B. terrestris*, tres de ellos recolectados en Ñuñoa y cuatro en La Reina, lo que corresponde a una prevalencia de 26,9% considerando sólo *B. terrestris*. No se obtuvieron bandas positivas en ninguna muestra de ADN obtenida desde *X. augusti* (ver detalle de todos los geles en Anexo 6). Estos resultados sugieren que *X. augusti* no estaría infectado con *A. bombi*.

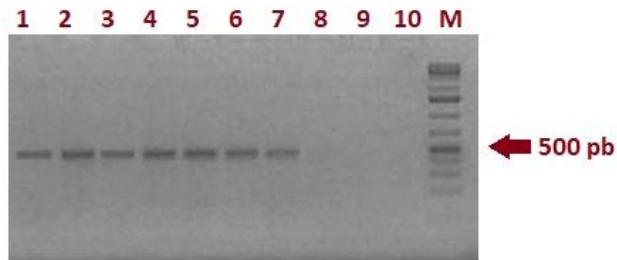


Figura 5. Productos de PCR obtenidos utilizando la pareja de partidores Neo-F2-FN y NeoR visualizados en un gel de agarosa al 2%. Carriles 1-7: bandas de aprox. 500 pb detectando *A. bombi* en los casos positivos en muestras de ADN obtenidas desde individuos *B. terrestris* colectados en Ñuñoa (carriles 1 y 4) y en La Reina (carriles 2-3 y 5-7). Carriles 8-9: ADN de *B. terrestris* y *X. augusti* respectivamente, con resultados negativos para *A. bombi* a modo de ejemplo. 10: control negativo (sin ADN molde). M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).

4.2.5 Presencia de *Crithidia bombi*

Con respecto a la detección de muestras infectadas por *C. bombi*, de las 59 que se analizaron, seis de ellas fueron positivas para este parásito (Fig. 6, carriles 1-6), lo que corresponde a una prevalencia del 23,07%. Dichas bandas corresponden a ADN de *B. terrestris*, uno de ellos capturado en Ñuñoa, uno en La Florida, dos en La Reina y dos en Talagante. Es decir, se detectó la presencia de *C. bombi* en todos los sitios donde se colectó *B. terrestris*. Al igual que en el caso de la detección de *A. bombi*, sólo se detectó la presencia de *C. bombi* en muestras de ADN obtenidas desde *B. terrestris*, lo que sugiere que *X. augusti* no estaría infectado con *C. bombi* (ver detalle de todos los geles en Anexo 7). Cabe destacar que, de los seis individuos infectados con *C. bombi*, dos de ellos resultaron positivos también para *A. bombi* (Tabla III).

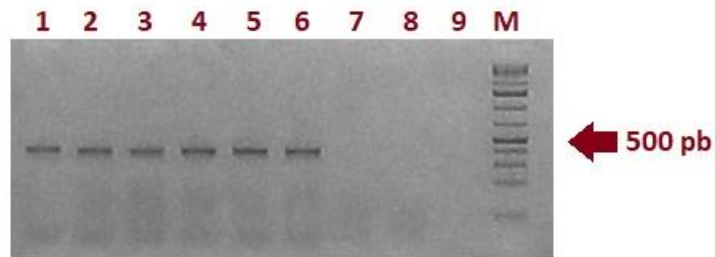


Figura 6. Productos de PCR obtenidos utilizando la pareja de partidores Fw2-CB-GU y Rv2-CB-GU visualizados en un gel de agarosa al 2%. Carriles 1-6: bandas de aprox. 400 pb detectando *C. bombi* en los casos positivos en muestras de ADN obtenidas desde *B. terrestris* colectados en Nuñoa (carril 1), La Florida (carril 2), La Reina (carriles 3 y 6) y Talagante (carriles 4 y 5). Carriles 7-8: ADN de *B. terrestris* y *X. augusti* respectivamente, negativos para *C. bombi* a modo de ejemplo. Carril 9: control negativo. M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).

4.2.6 Presencia de *Nosema bombi*

Finalmente se evaluó la presencia del microsporidio *N. bombi* en las 59 muestras y el resultado fue de dos productos de PCR del tamaño esperado, los que corresponden a ADN de *B. terrestris* capturados en La Florida y Talagante, respectivamente, alcanzando una prevalencia del 7,69% (Fig. 7, carriles 1-2). Los dos individuos infectados resultaron también ser positivos para *C. bombi* (Tabla III). No se obtuvieron bandas detectando *N. bombi* en muestras de ADN obtenidas desde *X. augusti*, por lo que los resultados sugieren que *X. augusti* tampoco estaría infectado con este microsporidio (ver detalle de los geles en Anexo 8).

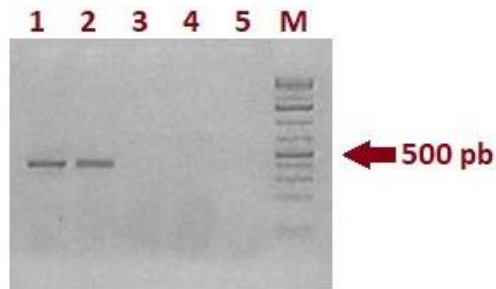


Figura 7. Productos de PCR obtenidos utilizando los partidores Nbombi-Fw2 y Nbombi-Rv2 visualizados en un gel de agarosa al 2%. Carriles 1-2: bandas de aprox. 400 pb detectando *N. bombi* en los casos positivos en muestras de ADN obtenidas desde *B. terrestris* colectados en La Florida y Talagante (carril 1 y 2, respectivamente) Carriles 3-4: ADN de *B. terrestris* y *X. augusti* respectivamente, negativos para *N. bombi* a modo de ejemplo. Carril 5: control negativo. M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).

Tabla III. Identificación de las muestras colectadas y presencia o ausencia de parásitos intestinales.

Identificación	<i>A. bombi</i>	<i>C. bombi</i>	<i>N. bombi</i>	Identificación	<i>A. bombi</i>	<i>C. bombi</i>	<i>N. bombi</i>
XA 01	-	-	-	BT 31	-	+	-
BT 02	-	-	-	BT 32	-	+	+
XA 03	-	-	-	XA 33	-	-	-
BT 04	-	+	-	XA 34	-	-	-
XA 05	-	-	-	XA 35	-	-	-
XA 06	-	-	-	BT 36	-	-	-
XA 07	-	-	-	BT 37	-	-	-
BT 08	-	-	-	BT 38	-	-	-
XA 09	-	-	-	BT 39	-	-	-
XA 10	-	-	-	BT 40	-	-	-
XA 11	-	-	-	BT 41	-	-	-
BT 12	-	-	-	XA 42	-	-	-
XA 13	-	-	-	XA 43	-	-	-
BT 14	-	-	-	XA 44	-	-	-
BT 15	-	-	-	XA 45	-	-	-
XA 16	-	-	-	XA 46	-	-	-
BT 17	+	-	-	XA 47	-	-	-
BT 18	-	-	-	XA 48	-	-	-
BT 19	+	-	-	XA 49	-	-	-
XA 20	-	-	-	XA 50	-	-	-
XA 21	-	-	-	XA 51	-	-	-
XA 22	-	-	-	XA 52	-	-	-
XA 23	-	-	-	XA 53	-	-	-
BT 24	-	-	-	XA 54	-	-	-
BT 25	-	-	-	XA 55	-	-	-
BT 26	-	+	+	BT 56	+	+	-
BT 27	+	+	-	BT 57	-	-	-
BT 28	+	-	-	BT 58	+	-	-
XA 29	-	-	-	BT 59	+	-	-
XA 30	-	-	-				

4.3 Secuenciación

Una vez finalizados los ensayos de PCR, en primer lugar, se enviaron a secuenciar los productos de PCR obtenidos con ADN de los controles positivos de infección para confirmar su identidad. Éstos arrojaron una identidad de bases superior al 90% con *C. bombi* en el caso del Control 1 y con *C. bombi* y *A. bombi* en el caso del Control 2 (Tabla IV). Dicho resultado permite ratificar la efectividad de los partidores diseñados. Como se mencionó anteriormente, no fue posible secuenciar las bandas de 130 pb obtenidas con la pareja de partidores ApidaeF y ApidaeR utilizados para confirmar la calidad del ADN dado que amplifican el ADN del hospedero, por lo que se secuenciaron dos productos de PCR seleccionados al azar obtenidos con las parejas de partidores BT-F y BT-R; y XA-F y XA-R diseñados específicos para *B. terrestris* y *X. augusti*, respectivamente. Las muestras escogidas fueron BT 17 y XA 55 y el alineamiento arrojó una identidad correspondiente al 98,37% con el genoma mitocondrial completo de *B. terrestris* en el caso de BT 17 y para XA 55, el mayor porcentaje de identidad fue con la misma secuencia utilizada como blanco de amplificación en el diseño de los partidores (Tabla I). Con respecto a los productos de PCR obtenidos en la prospección de parásitos, se enviaron a secuenciar cuatro de los siete productos obtenidos en la detección de *A. bombi*, cinco de los seis productos en el caso de la detección de *C. bombi* y los dos que se obtuvieron en la detección de *N. bombi*. En todos los casos las secuencias obtenidas presentaron un porcentaje de identidad superior al 90% con la especie de parásito correspondiente. A pesar de no contar con un control positivo de infección para *N. bombi*, ambos productos de PCR obtenidos corresponden a dicha especie debido a su alto porcentaje de identidad (>90%) con aquellas disponibles en la base de datos (Tabla IV).

Tabla IV. Identificación de las secuencias utilizando el programa bioinformático BLAST, se tomó en cuenta sólo el resultado que arrojó el mayor porcentaje de identidad.

Muestra	pb^a	Cobertura; % identidad	Nro. de acceso Genbank	Descripción
Control 1	396	361/388; 93	MH010977	<i>Crithidia bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
Control 2	391	369/384; 96	MH010977	<i>Crithidia bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
Control 2	479	454/477; 95,18	FN546182	<i>Apicystis bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 17	431	423/430; 98,37	NC_045179	<i>Bombus terrestris</i> , Genoma mitocondrial completo
XA 55	635	575/634; 90,69	EU122101	<i>Xylocopa violacea</i> Gen COI, secuencia parcial
BT 27	480	478/478; 100	FN546182	<i>Apicystis bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 28	471	468/469; 99,79	FN546182	<i>Apicystis bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 56	459	458/459; 99,78	FN546182	<i>Apicystis bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 58	459	458/459; 99,78	FN546182	<i>Apicystis bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 04	401	366/395; 92,66	GU321194	<i>Crithidia bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 26	383	373/376; 99,2	GU321194	<i>Crithidia bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 27	384	377/382; 98,69	GU321194	<i>Crithidia bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 31	385	382/382; 100	GU321194	<i>Crithidia bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 56	383	379/381; 99,48	GU321194	<i>Crithidia bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 26	391	368/389; 94,6	KF188740	<i>Nosema bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial
BT 32	389	385/386; 99,74	AY741110	<i>Nosema bombi</i> Gen SSU ARNr, secuencia parcial

^a Largo de los contigs

DISCUSIÓN

5.1 Presencia de parásitos en *Xylocopa augusti*

Los resultados obtenidos, sugieren que *X. augusti* se encontraría libre de los parásitos intestinales que afectan a *B. terrestris*. Algunos estudios afirman que los parásitos intestinales principalmente encontrados en *Bombus* spp podrían ser género específico, pero al mismo tiempo se han clasificado como parásitos generalistas (Meeus y col., 2011), probablemente debido a su detección en especies de géneros diferentes de *Bombus*. Por ejemplo, se ha detectado la presencia de *A. bombi* en *A. mellifera* (Plischuk y col., 2011) y del microsporidio *Nosema ceranae*, asociado principalmente a *A. mellifera* (Huang y col., 2007), en abejorros nativos de Argentina, aparentemente como consecuencia del contacto cercano entre ambas especies de polinizadores (Plischuk y col., 2009). Dichos hallazgos permiten concluir que las introducciones de polinizadores fuera de sus rangos naturales han permitido que los diversos patógenos encuentren nuevos hospederos, por lo tanto, no se debe descartar *a priori* la posibilidad de que los parásitos intestinales u otros patógenos asociados al género *Bombus* afecten también a *X. augusti*

Un factor importante a considerar es la procedencia de los abejorros infectados, ya sea de individuos escapados de invernaderos o de poblaciones naturalizadas. Hacer esta diferencia es de suma relevancia ya que las colonias comerciales de abejorros pueden sostener niveles de infección mayores que las colonias asilvestradas, debido a que las instalaciones donde se realizan las crías de abejorros para usos comerciales proveen las condiciones ideales para la proliferación de parásitos y patógenos producto de la gran densidad de hospederos que facilitan la transmisión. Adicionalmente, las condiciones que se mantienen en los criaderos (por ejemplo, alimentación *ad libitum*)

aumentan las probabilidades de supervivencia y reproducción a pesar de las altas cargas parasitarias (Brown y col., 2000; Meeus y col., 2011). En un estudio realizado en Irlanda, se evaluó la presencia de parásitos considerando distintas distancias de los invernaderos, los resultados fueron que a mayor cercanía de los invernaderos la prevalencia de parásitos fue mayor (Murray y col., 2013). Por lo tanto, para descartar completamente la presencia de parásitos intestinales en *X. augusti*, éstos deberían estar expuestos a poblaciones de *B. terrestris* provenientes de invernaderos o sectores cercanos, ya que así la probabilidad de adquirir parásitos podría ser mayor, elemento importante en la propagación de patógenos. Otros elementos importantes que permitirían dilucidar si es que *X. augusti* es capaz de portar los mismos parásitos que *B. terrestris* son conocer la calidad que posee como hospedero (por ejemplo, la respuesta inmune), la virulencia de los parásitos y las dinámicas de transmisión, información que es limitada y en algunos casos, nula (Meeus y col., 2011).

5.2 Presencia de parásitos en *Bombus terrestris*

En cuanto a la detección de parásitos intestinales en *B. terrestris*, los resultados obtenidos fueron los esperados considerando las prospecciones que se han hecho en otras regiones del país y en Argentina. La prevalencia de *A. bombi* en *B. terrestris* fue de un 26,9%, porcentaje menor a lo obtenido en la Patagonia Argentina (Arbetman y col., 2012) que fue de un 47% (14 individuos infectados de un total de 30). Cabe destacar que en dicho estudio se concluyó que la zona se encontraba libre de este parásito hasta la llegada del abejorro europeo, por lo que *A. bombi* fue cointroducido a esta zona junto con *B. terrestris*. Otro estudio realizado en la misma región de Argentina (Plischuk y col., 2011) 13 de 107 individuos resultaron positivos para *A. bombi* (12,1%). Estos porcentajes son muy altos si se comparan con las prevalencias encontradas en Europa

(1-8%) (Baer y Schimid-Hempel, 2001; Allen y col., 2007). Según Arbetman y col. (2012), estas altas prevalencias halladas en Sudamérica pueden ser una consecuencia de la selección artificial en las colonias comerciales. En cuanto a la detección de *C. bombi*, el resultado fue de individuos infectados en todos los sitios donde se colectaron *B. terrestris*, lo que coincide con lo descrito por Schimid-Hempel y col. (2014), que asegura que *C. bombi* es un parásito muy abundante donde sea que se encuentre *B. terrestris*. Imhoof y Schmid-Hempel (1999) sostienen que la transmisión horizontal de *C. bombi* ocurre a altas tasas y uno de los efectos importantes de este parásito sobre los abejorros es restringir la capacidad de la reina de fundar exitosamente una colonia. En el caso de la detección de *N. bombi*, los resultados obtenidos sugieren una muy baja prevalencia de este microsporidio (7,7%), lo que concuerda con otros estudios que sugieren que este microsporidio posee un bajo nivel de transmisión horizontal y virulencia, siendo más infeccioso para las larvas que para los abejorros adultos (Rutrecht y col., 2007). Por último, los resultados de este trabajo señalan la presencia de más de una especie de parásito sobre un mismo ejemplar de *B. terrestris*, lo que se debe en parte, a que estos microorganismos se encuentran usualmente asociados entre ellos (Plischuk y Lange, 2009; Murray y col., 2013).

En Chile, el organismo encargado de realizar la inspección sanitaria de los abejorros que ingresan al país provenientes de empresas que realizan su comercialización es el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Según la Resolución Exenta N°:5889/2019 que “Establece exigencias sanitarias para la importación a Chile de *Bombus Terrestris* (L) desde los orígenes que indica y manejo de las colonias en territorio”, los ejemplares deben venir amparados por un Certificado Sanitario Oficial que acredite el cumplimiento de ciertas exigencias sanitarias. Entre ellas, se menciona que las colonias no deben presentar signos de los parásitos *Melittobia acasta* (avispa

parasitoide), *Sphaerularia bombi* (nemátodo), y *A. bombi*. Esto concuerda con lo descrito por Estay (2007), ya que asegura que este organismo estatal se enfoca en dichos parásitos. Sin embargo, los distintos hallazgos hechos en el continente con respecto a la presencia de *N. bombi* y *C. bombi* durante los últimos años, establecen que el organismo gubernamental no ha actualizado sus protocolos. En un trabajo realizado por Graystock y col. (2013) en Inglaterra, se compraron abejorros a diferentes empresas europeas y los examinaron en busca de parásitos de los que supuestamente se encontraban libres, pero el resultado fue la presencia de múltiples patógenos, entre ellos *A. bombi*, *N. bombi* y *C. bombi*. Por lo tanto, algunas de las medidas que se deben tomar para el control oportuno de estas enfermedades son: a) el uso de herramientas diagnósticas adecuadas para garantizar la ausencia de estos parásitos, b) actualizar los protocolos a medida que la información disponible sea mayor y, por otro lado, c) mitigar la propagación de parásitos evitando el escape de abejorros comerciales a las poblaciones silvestres. Mientras no se regule correctamente la presencia de estos patógenos, las principales amenazas para los abejorros nativos son la introducción de cepas nuevas de parásitos o adaptadas comercialmente y la capacidad de los abejorros introducidos de actuar como reservorios de parásitos, lo que se traduce en altas prevalencias (Meeus y col., 2011). No obstante, aunque *B. terrestris* se encuentre libre de parásitos, todos los impactos negativos asociados a su introducción e invasión a nivel mundial demuestran que resulta imperante desalentar la introducción de abejorros exóticos en zonas que albergan abejorros nativos.

Si bien no se pudo comprobar la presencia de parásitos en la abeja carpintera y, por ende, analizar la vía de transmisión, este seminario de título aporta información en cuanto a los patógenos que porta *B. terrestris* en Chile Central teniendo en cuenta que existen muy pocos datos empíricos con respecto a la epidemiología de la mayoría de

los parásitos asociados con el género *Bombus*, particularmente las poblaciones silvestres (Ruiz-González y col., 2012). Los estudios existentes demuestran que una compleja comunidad de parásitos desafía constantemente a los hospederos, por lo tanto, es probable que ni la respuesta de los hospederos frente a una sola especie de parásito ni el impacto individual de éstos sean tan limitados como lo sugieren los estudios de sistemas de parásitos con un solo hospedero (Rutrecht y Brown, 2008). Tal como es el caso de los parásitos que afectan a *B. terrestris*, los estudios para comprender la biología de éstos y los impactos sobre la salud de los abejorros deberían enfocarse en las interacciones multiparasitarias que se producen dentro del hospedero (Murray col., 2013). La reciente introducción de *X. augusti* en el país y la creciente abundancia de *B. terrestris* en Chile y Argentina ha permitido aumentar el contacto entre ambas especies. Sin embargo, las implicancias de esta nueva interacción siguen siendo desconocidas. Considerando el impacto negativo que ha tenido la introducción de *B. terrestris* en el abejorro nativo *B. dahlbomii*, este nuevo escenario podría generar un futuro mucho más incierto para esta especie.

5.3 Otros métodos de detección

Diferentes estudios han detectado la presencia de *A. bombi*, *C. bombi* y *N. bombi* mediante microscopía óptica (Vallejos, 2013; Folly y col., 2017; Plischuk y col., 2017). Un estudio que detectó la presencia de *N. bombi* mediante estas dos técnicas, arrojó que mediante el método de PCR se pudieron identificar cuatro veces más individuos infectados (Klee y col., 2006), por lo que el autor asegura que la técnica del PCR proporciona ventajas sobre la microscopía óptica, especialmente por el nivel de sensibilidad mayor de detección que proporciona el PCR. Esto se debe a que la detección de la infección mediante técnicas moleculares reduce el riesgo de falsos positivos atribuibles a la presencia de otros parásitos, y brinda la capacidad de detectar al patógeno en todas las etapas de su desarrollo. Por lo tanto, el método de detección basado en PCR proporciona una identificación rápida y confiable.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de los principales parásitos intestinales que afectan a *B. terrestris* en Chile Central. *Apicystis bombi* presentó la prevalencia más alta (26,9%), seguido por *Crithidia bombi* (23,1%) especie que se detectó en todos los sitios donde se colectó *B. terrestris*. En el caso de *Nosema bombi*, la prevalencia fue baja, probablemente debido a su baja transmisión. Debido a las altas cargas parasitarias que pueden portar las poblaciones comerciales de *B. terrestris* y a todos los impactos negativos asociados a su importación, la introducción de esta especie debería cesar.

No se detectó presencia de patógenos en la abeja carpintera *Xylocopa augusti*. Sin embargo, debido a su reciente introducción al país y a la poca información existente es necesario realizar más estudios que permitan descartar completamente la transmisión de parásitos desde *B. terrestris* hacia *X. augusti*.

En este seminario de título se presenta un método rápido y confiable para la detección de parásitos internos mediante técnicas moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

- Aizen, M. A., Smith-Ramírez, C., Morales, C. L., Vieli, L., Sáez, A., Barahona-Segovia, R. M., Arbetman, M. P., Montalva, J., Garibaldi, L. A., Inouye, D. W. y Harder, L. D. 2018. Coordinated species importation policies are needed to reduce serious invasions globally: The case of alien bumblebees in South America. *Journal of Applied Ecology*, 56(1): 100-106.
- Allen, G. R., Seeman, O. D., Schmid-Hempel, P., y Buttermore, R. E. 2007. Low parasite loads accompany the invading population of the bumblebee, *Bombus terrestris* in Tasmania. *Insectes Sociaux*, 54(1): 56-63.
- Arbetman, M.P., Meeus, I., Morales, C.L., Aizen, M.A., y Smagghe, G. 2012. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. *Biological Invasions*, 15(3): 489-494.
- Baer, B., y Schmid-Hempel, P. 2001. Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Evolution*, 55(8): 1639-1643.
- Brown, M.J.F., Loosli, R. y Schmid-Hempel, P. 2000. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos* 91: 421–427.
- Colla, S. R., Otterstatter, M. C., Gegear, R. J. y Thomson, J. D. 2006. Plight of the bumble bee: pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological conservation*, 129(4): 461-467.
- Durrer, S. y Schmid-Hempel, P. 1994. Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 258(1353): 299-302.
- Estay, P. 2007. *Bombus* en Chile: especies, biología y manejo. 82p. Colección de Libros INIA N°22 Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Santiago, Chile.
- Fayet-Lebaron, E., Atzorn, V., Henry, Y. y Kiss, T. 2009. 18S rRNA processing requires base pairings of snR30 H/ACA snoRNA to eukaryotespecific 18S sequences. *The EMBO Journal*, 28(9): 1260-1270.
- Folly, A.J., Koch, H., Stevenson, P.C. y Brown, M.J. 2017. Larvae act as a transient transmission hub for the prevalent bumblebee parasite *Crithidia bombi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 148: 81-85.
- Gerling, D., Velthuis, H.H.W., y Hefetz, A. 1989. Bionomics of the large carpenter bees of the genus *Xylocopa*. *Annual Review of Entomology*, 34: 163–190.
- Goulson, D. 2003. Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1): 1-26.

- Graystock, P., Yates, K., Evison, S. E., Darvill, B., Goulson, D., y Hughes, W. O. 2013. The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *Journal of Applied Ecology*, 50(5): 1207-1215.
- Hillis, D. M. y Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4): 411-453.
- Huang, W. F., Jiang, J. H., Chen, Y. W., y Wang, C. H. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38(1): 30-37.
- Imhoof, B., y Schmid-Hempel, P. 1999. Colony success of the bumble bee, *Bombus terrestris*, in relation to infections by two protozoan parasites, *Crithidia bombi* and *Nosema bombi*. *Insectes Sociaux*, 46(3), 233-238.
- Kanbe, Y., Okada, I., Yoneda, M., Goka, K., y Tsuchida, K. 2008. Interspecific mating of the introduced bumblebee *Bombus terrestris* and the native Japanese bumblebee *Bombus hypocrita sapporoensis* results in inviable hybrids. *Naturwissenschaften*, 95(10): 1003-1008.
- Kenta, T., Inari, N., Nagamitsu, T., Goka, K., y Hiura, T. 2007. Commercialized European bumblebee can cause pollination disturbance: an experiment on seven native plant species in Japan. *Biological Conservation*, 134(3): 298-309.
- Klee, J., Tay, W. T. y Paxton, R. J. 2006. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumblebees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. *Journal of invertebrate pathology*, 91(2): 98-104.
- Kress, W. J. y Erickson, D. L. 2012. DNA barcodes: methods and protocols. In *DNA Barcodes*, 3-8. Humana Press, Totowa, NJ.
- Lucia, M., Reynaldi, F.J., Sguazza, G. H. y Abrahamovich, A.H. 2014. First detection of deformed wing virus in *Xylocopa augusti* larvae (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 53(4): 466-468.
- Macfarlane, R.P., Lipa, J.J. y Liu, H.J. 1995. Bumble bee pathogens and internal enemies. *Bee World*, 76(3): 130-148.
- Malinska, H., Tate, J. A., Mavrodiev, E., Matyasek, R., Lim, K. Y., Leitch, A. R., Soltis D. E., y Kovarik, A. 2011. Ribosomal RNA genes evolution in *Tragopogon*: a story of new and old world allotetraploids and the synthetic lines. *Taxon*, 60(2): 348-354.
- Meeus, I., De Graaf, D.C., Jans, K. y Smagghe, G. 2010. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1): 107-115.
- Meeus, I., Brown, M.J., De Graaf, D.C. y Smagghe, G.U.Y. 2011. Effects of invasive parasites on bumble bee declines. *Conservation Biology*, 25(4): 662-671.

- Mclvor, C. A., y Malone, L. A. 1995. *Nosema bombi*, a microsporidian pathogen of the bumble bee *Bombus terrestris* (L.). *New Zealand Journal of Zoology*, 22(1): 25-31.
- Montalva, J., Ruz, L. y Arroyo, M. 2008. *Bombus terrestris* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae: Bombini) en Chile: causas y consecuencias de su introducción. *Revista del Jardín Botánico Chagual*, 6(6): 13-20.
- Montalva, J. 2012. La difícil situación del abejorro más austral del mundo (*Bombus dahlbomii* Guérin-Méneville, 1835). *Boletín de Biodiversidad de Chile*, 7: 1-3.
- Montalva, J.M., Allendes, J.L. y Lucia, M. 2013. The large carpenter bee *Xylocopa augusti* (Hymenoptera: Apidae): New record for Chile. *Journal of Melittology*, 12: 1-6.
- Morales, C. L., Arbetman, M. P., Cameron, S. A. y Aizen, M. A. 2013. Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(10): 529-534.
- Murray, T.E., Coffey, M.F., Kehoe, E. y Horgan, F.G. 2013. Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biological Conservation*, 159: 269-276.
- Plischuk, S. y Lange, C.E. 2009. Invasive *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) parasitized by a flagellate (Euglenozoa: Kinetoplastea) and a neogregarine (Apicomplexa: Neogregarinorida). *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(3): 263-265.
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A. H., Lange, C. y Higes, M. 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 1(2): 131-135.
- Plischuk, S., Meeus, I., Smagghe, G. y Lange, C.E. 2011. *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5): 565-568.
- Plischuk, S., Salvarrey, S., Arbulo, N., Santos, E., Skevington, J.H., Kelso, S. y Lange, C. E. 2017. Pathogens, parasites, and parasitoids associated with bumble bees (*Bombus* spp.) from Uruguay. *Apidologie*, 48(3): 298-310.
- Reynaldi, F.J., Lucia, M., y García, M. 2015. *Ascospaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): First report in South America. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(4): 261-264.
- Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4): 238-245.

- Ruiz-González, M. X., Bryden, J., Moret, Y., Reber-Funk, C., Schmid-Hempel, P. y Brown, M. J. 2012. Dynamic transmission, host quality, and population structure in a multihost parasite of bumblebees. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 66(10), 3053-3066.
- Rutrecht, S.T., Klee, J. y Brown, M.J. 2007. Horizontal transmission success of *Nosema bombi* to its adult bumble bee hosts: effects of dosage, spore source and host age. *Parasitology*, 134(12): 1719-1726.
- Rutrecht, S.T. y Brown, M.J. 2008. The life-history impact and implications of multiple parasites for bumble bee queens. *International Journal for Parasitology*, 38(7): 799-808.
- Schmid-Hempel, P., Pühr, K., Krüger, N., Reber, C. y Schmid-Hempel, R. 1999. Dynamic and genetic consequences of variation in horizontal transmission for a microparasitic infection. *Evolution*, 53(2): 426-434.
- Schmid-Hempel, R. y Tognazzo, M. 2010. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(4): 337-345
- Schmid-Hempel, R., Eckhardt, M., Goulson, D., Heinzmann, D., Lange, C., Plischuk, S. y Schmid-Hempel, P. 2014. The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. *Journal of Animal Ecology*, 83(4): 823-837.
- Stout, J.C., y Morales, C.L. 2009. Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie*, 40(3): 388-409.
- Tay, W.T., O'Mahony, E.M. y Paxton, R.J. 2005. Complete rRNA gene sequence reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts yet contains multiple polymorphic sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 505-513.
- Vallejos, E. 2013. Prospección de parásitos y comensales asociados a insectos adultos en *Bombus* spp (Hymenoptera: Apidae) en Valdivia (tesis de pregrado), Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Wang, Y., Tian, R.M., Gao, Z. M., Bougouffa, S. y Qian, P.Y. 2014. Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis. *PLOS One*, 9(3), e90053.

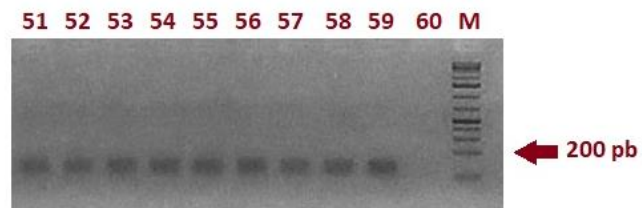
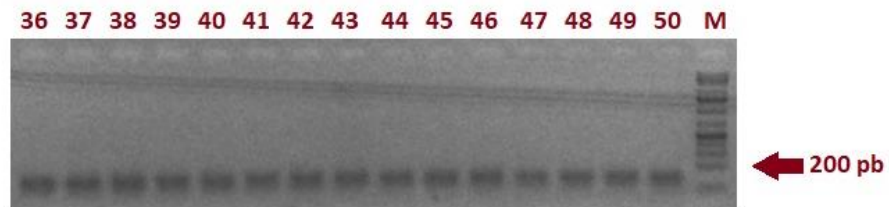
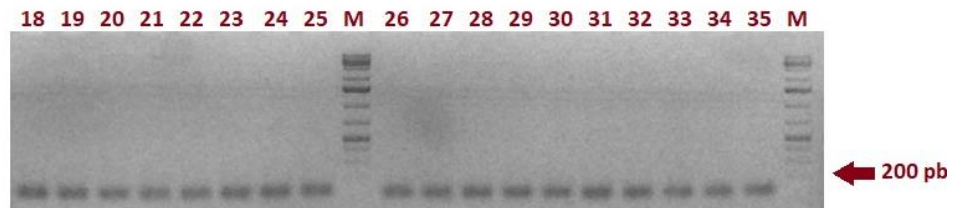
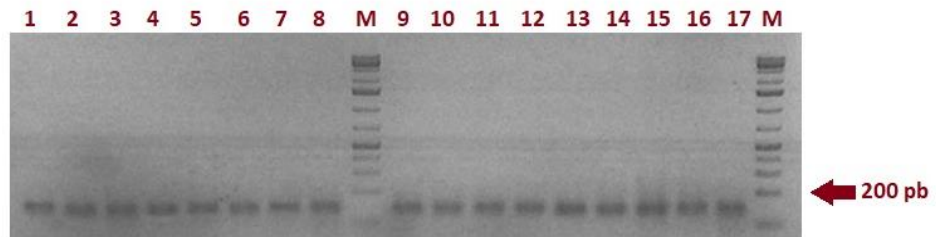
ANEXO

Anexo 1. Muestras obtenidas indicando identificación, lugar y fecha de colecta

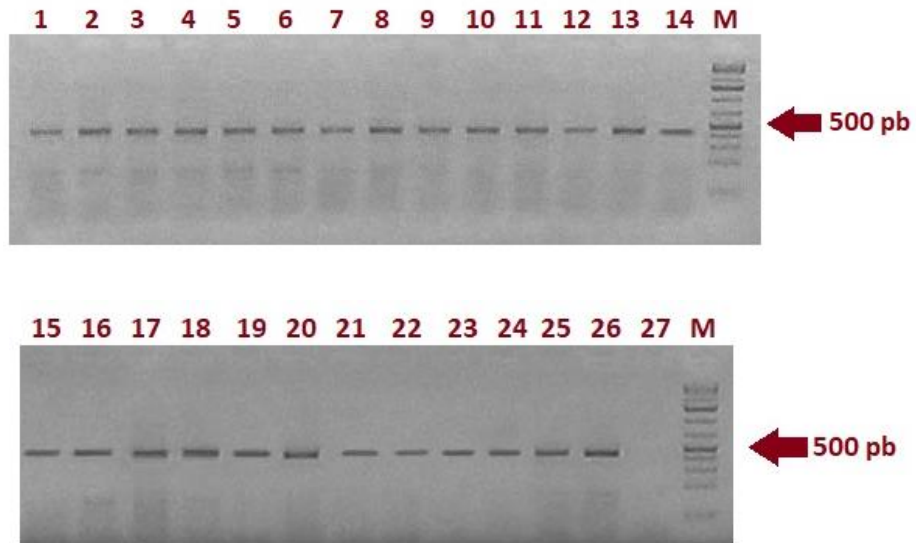
Identificación	Lugar	Fecha
XA 01	Ñuñoa	18-10-2018
BT 02	Ñuñoa	18-10-2018
XA 03	Ñuñoa	18-10-2018
BT 04	Ñuñoa	25-10-2018
XA 05	Ñuñoa	25-10-2018
XA 06	Ñuñoa	25-10-2018
XA 07	Ñuñoa	07-11-2018
BT 08	Ñuñoa	07-11-2018
XA 09	Ñuñoa	07-11-2018
XA 10	Ñuñoa	08-11-2018
XA 11	Ñuñoa	08-11-2018
BT 12	Ñuñoa	08-11-2018
XA 13	Ñuñoa	08-11-2018
BT 14	Ñuñoa	09-11-2018
BT 15	Ñuñoa	09-11-2018
XA 16	Ñuñoa	09-11-2018
BT 17	Ñuñoa	09-11-2018
BT 18	Ñuñoa	13-11-2018
BT 19	Ñuñoa	15-11-2018
XA 20	Ñuñoa	15-11-2018
XA 21	Puente Alto	15-11-2018
XA 22	Puente Alto	16-11-2018
XA 23	Puente Alto	16-11-2018
BT 24	La Florida	17-11-2018
BT 25	La Florida	19-11-2018
BT 26	La Florida	19-11-2018
BT 27	La Reina	24-11-2018
BT 28	Ñuñoa	24-11-2018
XA 29	Talagante	26-11-2018
XA 30	Talagante	27-11-2018

Identificación	Lugar	Fecha
BT 31	Talagante	28-11-2018
BT 32	Talagante	28-11-2018
XA 33	Puente Alto	28-11-2018
XA 34	Puente Alto	29-11-2018
XA 35	Puente Alto	29-11-2018
BT 36	Talagante	02-12-2018
BT 37	Talagante	02-12-2018
BT 38	Talagante	02-12-2018
BT 39	Talagante	02-12-2018
BT 40	Talagante	02-12-2018
BT 41	Talagante	02-12-2018
XA 42	La Florida	03-12-2018
XA 43	La Florida	03-12-2018
XA 44	La Florida	03-12-2018
XA 45	La Florida	03-12-2018
XA 46	La Florida	03-12-2018
XA 47	Talagante	08-12-2018
XA 48	Talagante	12-12-2018
XA 49	La Florida	14-12-2018
XA 50	La Florida	14-12-2018
XA 51	La Florida	14-12-2018
XA 52	La Florida	14-12-2018
XA 53	Talagante	15-12-2019
XA 54	Talagante	18-12-2019
XA 55	Talagante	22-12-2019
BT 56	La Reina	24-12-2018
BT 57	La Reina	24-12-2018
BT 58	La Reina	24-12-2018
BT 59	La Reina	24-12-2018

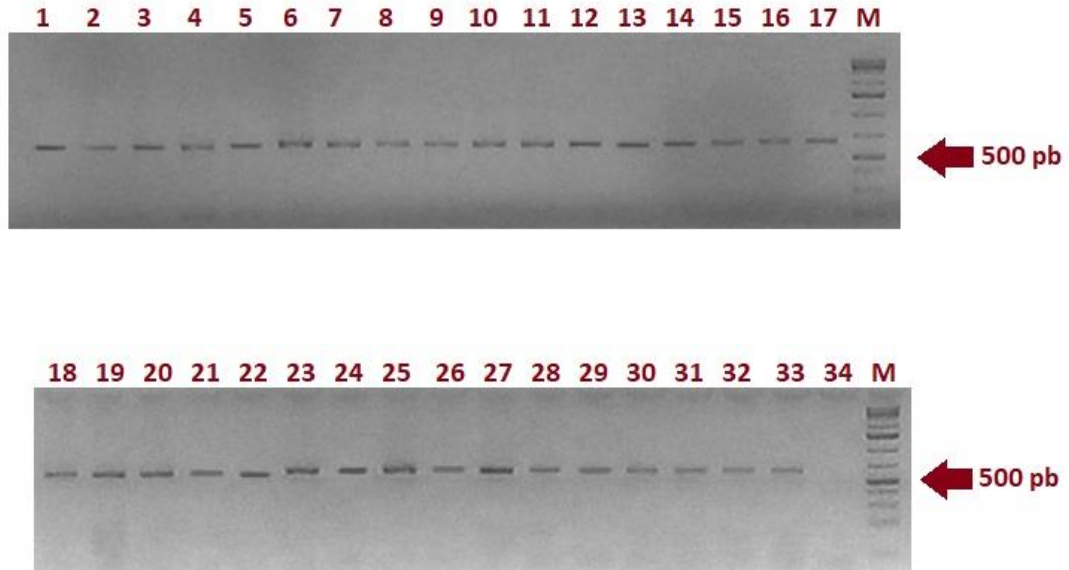
Anexo 2. Productos de PCR obtenidos visualizados en geles de agarosa al 2% utilizando la pareja de partidores ApidaeF y ApidaeR. Carriles 1-59: bandas de aprox. 100 pb detectando región 18S en las 59 muestras de ADN de *B. terrestris* y *Xylocopa augusti*. Carril 60: control negativo (sin ADN molde). M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).



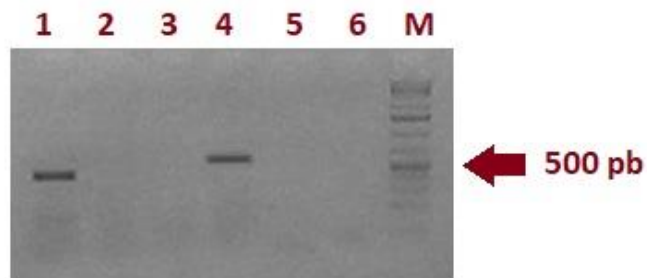
Anexo 3. Productos de PCR visualizados en geles de agarosa al 2%. Carriles 1-26: bandas de aprox. 450 pb detectando ADN de *B. terrestris* utilizando la pareja de partidores BT-F y BT-R. Carril 27: control negativo (sin ADN molde). M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).



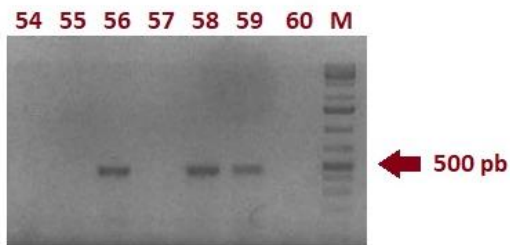
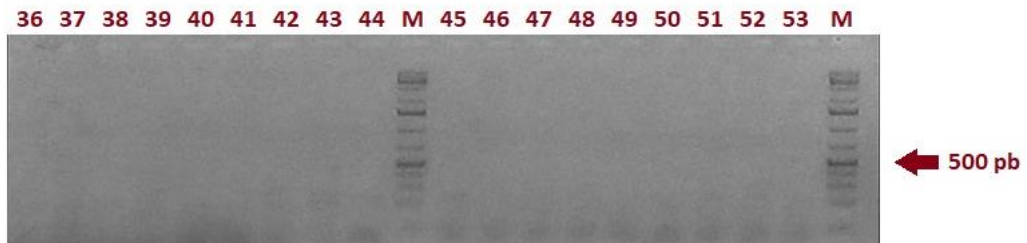
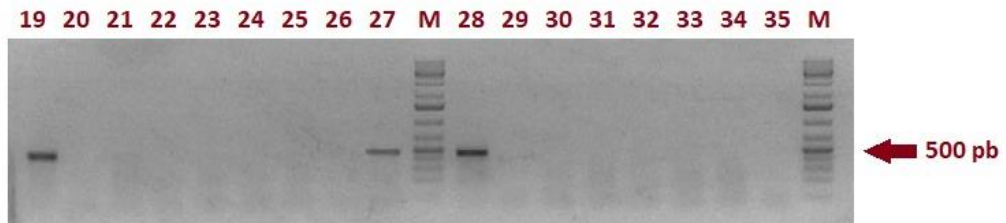
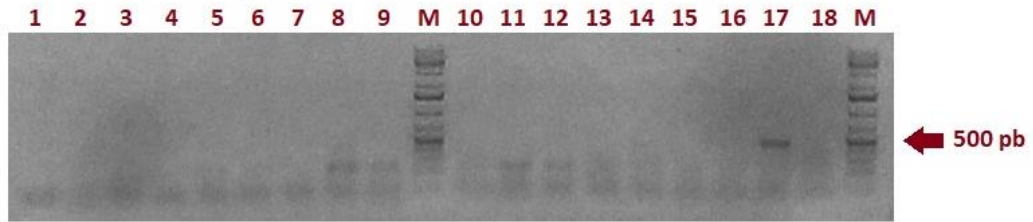
Anexo 4. Productos de PCR visualizados en geles de agarosa al 2%. Carriles 1-33: bandas de aprox. 600 pb detectando ADN de *X. augusti* utilizando la pareja de partidores XA-F y XA-R. Carril 34: control negativo (sin ADN molde). M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).



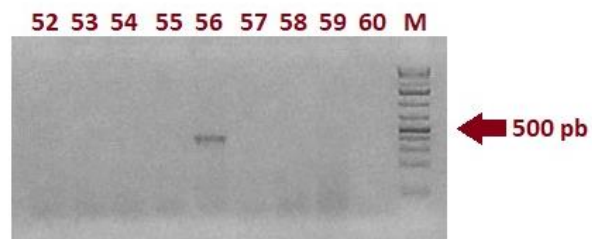
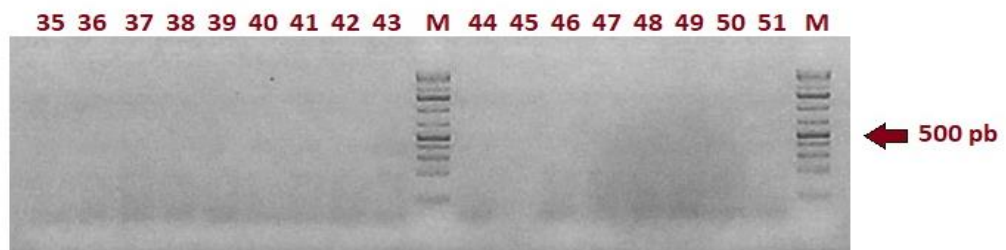
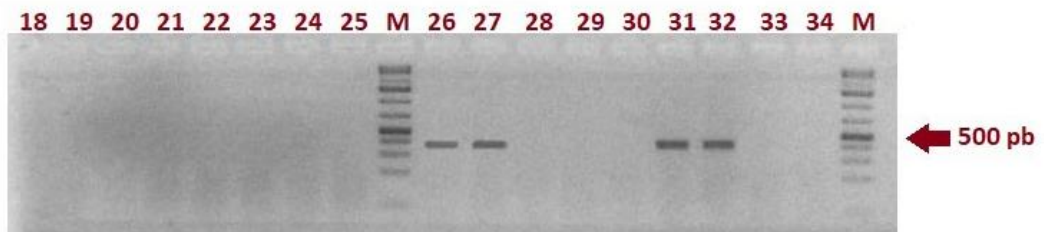
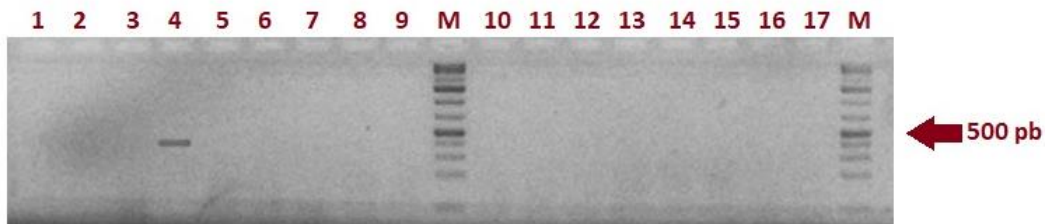
Anexo 5. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa al 2%. Carril 1: banda de aprox. 450 pb detectando ADN de BT 17 con los partidores BT-F y BT-R. Carril 2: reacción de PCR utilizando ADN de XA 52 con los partidores BT-F y BT-R. Carril 3: reacción de PCR utilizando ADN de BT 17 con los partidores XA-F y XA-R. Carril 4: banda de aprox. 600 pb detectando ADN de XA 52 con los partidores XA-F y XA-R. Carriles 5-6: controles negativos (sin ADN molde) para ambas parejas de partidores utilizados. M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).



Anexo 6. Productos de PCR obtenidos en la prospección de *A. bombi* en todas las muestras utilizando la pareja de partidores Neo-F2-FN y NeoR visualizados en un gel de agarosa al 2%. Carriles 17-19-27-28-56-58-59: bandas de aprox. 500 pb detectando la presencia de *A. bombi* en BT 17-19-27-28-56-58-59. Carril 60: control negativo (sin ADN molde). M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).



Anexo 7. Productos de PCR obtenidos en la prospección de *C. bombi* en todas las muestras utilizando la pareja de partidores Fw2-CB-GU y Rv2-CB-GU visualizados en un gel de agarosa al 2%. Carriles 4-26-27-31-32-56: bandas de aprox. 400 pb detectando la presencia de *C. bombi* en BT 04-26-27-31-32-56. Carril 60: control negativo (sin ADN molde). M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).



Anexo 8. Productos de PCR obtenidos en la prospección de *N. bombi* en todas las muestras utilizando la pareja de partidores Nbombi-Fw2 y Nbombi-Rv2 visualizados en un gel de agarosa al 2%. Carriles 26 y 32: bandas de aprox. 400 pb detectando la presencia de *N. bombi* en BT 26 y BT 32. Carril 60: control negativo (sin ADN molde). M: marcador GeneRuler de tamaño molecular 1 kb (Thermo Scientific).

