



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Microbiología

**Análisis de genes de tRNA en *Paenibacillus* y sus aplicaciones como diagnóstico en la enfermedad Loque Americana (*Paenibacillus larvae*).**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Microbiología

**Presenta:**

Ana Gabriel Estrada Martínez

**Dirigido por:**

Dr. Juan Campos Guillen



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Microbiología

**Análisis de genes de tRNA en *Paenibacillus* y sus aplicaciones como diagnóstico en la enfermedad Loque Americana (*Paenibacillus larvae*).**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Microbiología

**Presenta:**

Ana Gabriel Estrada Martínez

**Dirigido por:**

Dr. Juan Campos Guillen

**Sinodales:**

**DR. JUAN CAMPOS GUILLÉN**

DIRECTOR

**DR. CARLOS SALDAÑA GUTIERREZ**

CO-DIRECTOR.

**M.S.P. SÉRGIO PACHECO HERNÁNDEZ**

ASESOR

**DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ RAMOS**

ASESOR

**DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ**

ASESOR

## RESUMEN

La enfermedad Loque Americana en la abeja melífera (*Apis mellifera*) es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*, la cual es una preocupación ambiental importante y es considerada como la más destructiva por su fácil diseminación. Por lo anterior su diagnóstico oportuno resulta una prioridad para la apicultura y en específico en polen comercial. Por lo tanto, en este trabajo, desarrollamos una estrategia molecular de detección por la técnica de PCR basada en la amplificación del locus tRNA<sup>cys</sup> como un diagnóstico rápido y confiable para la detección de *Paenibacillus larvae* en polen.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR mostraron que el análisis realizado en las colonias de bacterias esporuladas obtenidas de muestras de polen proveniente de México, Chile y Europa fue negativo para *Paenibacillus larvae*. La validación de este resultado negativo fue a través de la identificación bacteriana por MALDITOF-MS, los géneros encontrados fueron *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. sonorensis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis*, *Paenibacillus odorifer*, *P. peoriae*, *P. polymyxa* y *P. cookie*. Por lo tanto, este ensayo de PCR podría ser útil para estudios adicionales como método de diagnóstico para la identificación de *Paenibacillus larvae* como control de calidad microbiano en polen comercial mejorando su diagnóstico oportuno.

**PALABRAS CLAVE:** *Paenibacillus larvae*, Loque Americana, tRNA<sup>cys</sup>, *Apis mellifera*.

## SUMMARY

American Foulbrood (AFB) caused by *Paenibacillus larvae* is the most destructive honeybee (*Apis mellifera*) bacterial disease and its dissemination via commercial bee pollen is an important mechanism for the spread of this bacterium. In this work, we developed a tRNA<sup>Cys</sup>-PCR strategy and complemented that strategy with MALDI-TOF MS to evaluate the presence of *P. larvae* in commercial pollen samples. *P. larvae* was not detected when the tRNA<sup>Cys</sup>-PCR approach was applied to spore-forming bacterial colonies obtained from three different locations (Mexico, Europa and Chile) and this result was validated by bacterial identification via MALDI-TOF MS. The genera identified in the latter analysis were *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. sonorensis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis*, *Paenibacillus odorifer*, *P. peoriae*, *P. polymyxa* and *P.cookie* . Our results indicate that the tRNA<sup>Cys</sup>-PCR, combined with other molecular tools, will be a useful approach for identifying *P. larvae* in commercial pollen samples and will assist in controlling the spread of the pathogen.

**KEYWORDS:** *Paenibacillus larvae*, Loque Americana, tRNA<sup>cys</sup>, *Apis mellifera*

## **DEDICATORIAS**

**A MI FAMILIA, EN ESPECIAL A MIS PAPÁS QUE CON SU AMOR, DEDICACIÓN Y APOYO INCONDICIONAL ME IMPULSARON A SEGUIR ADELANTE EN CADA MOMENTO.**

***"NO EVITÉIS LAS DIFICULTADES DE LA VIDA A VUESTROS HIJOS, MÁS BIEN ENSEÑADLES A SUPERARLAS."***

***-LOUIS PASTEUR***

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **AGRADECIMIENTOS**

**A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO POR PERMITIRME SER PARTE DE ELLA Y DARME UNA SEGUNDA CASA.**

**AL DR. JUAN CAMPOS GUILLEN POR SUS ENSEÑANZAS Y QUE SIEMPRE HA ESTADO EN LA MEJOR DISPOSICIÓN PARA ORIENTARME, IMPULSARME A PESAR DE LAS ADVERSIDADES PRESENTADAS DURANTE MI TRAYECTORIA ACADÉMICA Y POR PERMITIRME COLABORAR EN DIFERENTES PROYECTOS.**

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 POLEN	2
2.2 NUTRIENTES ESENCIALES	3
2.3 CALIDAD SANITARIA	4
2.4 MICROORGANISMOS INDICADORES	5
2.5 DIVERSIDAD MICROBIANA DEL POLEN	6
2.6 MICROBIOMA	6
2.7 GENERO PAENIBAICILLUS	7
2.7.1 <i>Paenibacillus larvae</i>	9
2.7.2 CICLO DE VIDA	9
2.7.3 VÍA DE TRANSMISION	11
2.7.4 GENOTIPOS	11
2.8 DIAGNÓSTICO	12
2.8.1 CULTIVOS	12
2.8.2 PERFILES BIOQUÍMICOS	12
2.8.3 MICROSCOPIA	12
2.8.4 INMUNO-TÉCNICAS	12

2.8.5	TÉCNICAS MOLECULARES	
2.9	IMPORTANCIA DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA COMO MARCADOR MOLECULAR	13
		14
III.	JUSTIFICACIÓN	
IV.	HIPÓTESIS	16
V.	OBEJTIVO GENERAL	17
VI.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
VII.	METODOLOGÍA	17
7.1	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	18
7.2	DETECCIÓN DE <i>Paenibacillus larvae</i> POR PCR	20
7.3	CULTIVO	21
7.4	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN	21
7.5	PCR	21
VIII.	RESULTADOS	24
8.1	OBTENCIÓN DE NÚMERO DE COPIAS DE GENES DE tRNA EN EL GÉNERO <i>Paenibacillus</i>	24
8.2	ESTANDARIZACIÓN DEL PCR PARA AMPLIFICAR LA REGION HYDROLASA-tRNA <sup>CYS</sup> USANDO LA CEPA DE REFERENCIA <i>Paenibacillus larvae</i>	26
8.3	DETECCIÓN DE <i>Paenibacillus larvae</i> EN COLONIAS OBTENIADAS DE POLEN COMERCIAL	28
IX.	DISCUSIÓN / CONCLUSIONES	30
X.	BIBLIOGRAFÍA	32

## ÍNDICE DE TABLAS

	PAGINA
I. CONTENIDO NUTRITIVO DEL POLEN	2
II. ESPECIES DE <i>Paenibacillus</i> Y SU IMPORTANCIA	8
III. GENES LOCALIZADOS EN LA REGION PLV:ERIC2	19
IV. CEPAS BACTERIANAS Y CEBADORES	23
V. IDENTIFICACION DE COLONIAS BACTERIANAS OBTENIDAS DE POLEN COMERCIAL POR MEDIO DE MALDITTOF-MS	29

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
I. REPRESENTACIÓN DE LA FASE NO INVASIVA Y FASE INAVASIVA	10
II. LOCALIZACIÓN DEL GEN $tRNA^{CYS}$ EN LA REGIÓN <i>plv:ERIC2_c30780</i> .	18
III. DISEÑO DE CEBADORES Y PRODUCTOS DE $tRNA^{CYS}$ -PCR	22
IV. DISTRIBUCIÓN Y NÚMERO DE COPIAS DE GENES DE $tRNA$ EN GENOMAS DE <i>Paenibacillus</i>	25
V. CONDICIONES DE PCR	26
VI. ELECTROFORESIS DE $tRNA^{CYS}$ EN DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS	27

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## I.- INTRODUCCIÓN

Las abejas y otros insectos eusociales comprenden la mayor parte de la biomasa de insectos en el mundo contribuyendo a la polinización para la producción de diversos cultivos, siendo uno de los insectos más importantes como polinizadores. La apicultura es la actividad de crianza y cuidado de las abejas para la producción de miel, propóleo, jalea real, veneno, polen y cera; además de la polinización en plantas. En México el producto más comercializado es la miel generando una producción de 57 mil 200 toneladas al año posicionándolo en el quinto lugar en producción y como exportador en tercer lugar con 32 mil 354 toneladas de miel registrados en los últimos 5 años (SAGARPA 20015). Una de las principales abejas que se utiliza en la apicultura es del género *Apis* (abejas melíferas) por su alta eficiencia como polinizador y mejora los resultados que la polinización manual ó mecánica (Torres et al 2013) su valor comercial de una abeja reina va de 130-150 pesos, cada apicultor puede producir de 1000 a 1500 abejas reinas mensualmente, la polinización de cultivos que estas llevan a cabo es del 90% (Djukic et al 2014), por lo que es de vital importancia mantener su salud no solo para la apicultura sino también para la agricultura y sobre todo para la seguridad alimentaria del humano. Sin embargo en las ultimas décadas su salud se ha ido en declive haciéndolas susceptibles a un alto número de enfermedades causadas por ácaros, hongos, parásitos, virus, bacterias, etc; estos son adquiridos durante el proceso de la recolección del polen, algunos de estos microorganismos identificados son pertenecientes a fitopatógenos, entomopatógenos y patógenos causantes de deterioro de alimentos y enfermedades en abejas y humanos; los microorganismos que se han encontrado son: *Pantoea agglomerans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Curtobacterium flaccumfacien*, *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata* (Kačániová et al., 2009; Hutchison et al 2014; Lozo, 2015), *Paenibacillus larvae*, *Apis bombi*, *Crithidia bombi*, *Nosema bombi*, *Nosema ceranae* y *Nosema apis* (Graystock et al., 2013). La importancia para la detección de *Paenibacillus* en etapa oportuna es primordial para la apicultura, el uso de diversos métodos para su identificación y eliminación de *P.larvae* no están bien definidos siendo una enfermedad declaratoria obligatoria para el control y producción de las colmenas.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 POLEN

Es una estructura vegetativa, al madurar es conocido como microgametófito y se encuentra en los estambres de las flores en la parte superior de las anteras sobre el filamento de las flores (Bedinger, 1992). Durante la meiosis es producido en los sacos polínicos a partir de microesporas maduras. Su formación se ve afectada por la hormona vegetal del ácido giberélico y lípidos, debido a su efecto sobre el proceso de citocinesis meiótica (Erdtman, 2013; Liu et al., 2017). Este es recolectado, almacenado y posteriormente mezclado con capas delgadas de miel y enzimas presentes en las secreciones salivares de abejas, formando los gránulos que son colocados en el panal de abejas (Barbara et al., 2015). Siendo esencial por su alto contenido y calidad nutritiva (Tabla I) (Bárbara et al., 2015; Cardoso et al Silva, 2016) para el desarrollo y supervivencia de las colonias de abejas (Keller et al., 2005). Cuando se presenta una deficiencia nutricional impacta en la disminución de la población colonial y salud de las abejas, lo cual puede afectar en la capacidad de las abejas para resistir ciertos tipos de estrés (patógenos y pesticidas) (Le Conte et al., 2011).

**TABLA. I CONTENIDO NUTRITIVO DEL POLEN**

<b>Componentes</b>	<b>Contenido Mínimo-Máximo</b>
	g/100g
Carbohidratos	13 – 55
Fibra	0.3 – 20
Proteína	10 – 40
Lípidos	1 – 10
	mg/100g
Minerales	500 -3000
Vitaminas	20 – 100
Flavonoides	40 – 3000

## 2.2 NUTRIENTES ESENCIALES

En el polen las proteínas juegan un papel importante durante el desarrollo y crecimiento de las abejas (Cohen, 2003). La longevidad de estos organismos, cría y producción de miel se reducen de manera importante cuando la disponibilidad de proteína no es la adecuada (De Grandi-Hoffman, 2010; Herbert, 2000). Su deficiencia también afecta la habilidad de las abejas para resistir enfermedades (Matilla et al Otis, 2006). Es necesario que las proteínas sean de alta calidad y una composición definida de aminoácidos para el óptimo crecimiento de los individuos y para el correcto desarrollo de las glándulas hipofaríngeas de las obreras nodrizas, estas glándulas son indispensables para producir el alimento para las larvas (Crailsheim et al Stolberg, 1989). Si las nodrizas no obtienen polen o alguna otra fuente apropiada de proteína, sus secreciones no resultan adecuadas para promover el crecimiento y desarrollo normal de las larvas y la producción de huevos de la reina. Cuando su labor como nodrizas termina, los requerimientos de proteína disminuyen y su principal dieta se vuelve a base de carbohidratos obtenidos del néctar y la miel (Standifer et al 1977).

La composición de aminoácidos determina la cantidad de polen requerido por las abejas más que el contenido de proteína. Un desempeño pobre en el desarrollo de la colonia puede ser causado por los bajos niveles de varios aminoácidos (Loper et al, 1987). En abejas, la producción de jalea real con la que se alimenta a las larvas de reina contiene cerca de un 12% de azúcares en los primeros días de su desarrollo, mientras que la jalea para obreras sólo contiene un 4% de azúcares (Shuel et al, 1959). Los adultos pueden utilizar monosacáridos como: glucosa, fructosa, sacarosa, trehalosa, maltosa y melezitosa; pero son incapaces de metabolizar galactosa, manosa, lactosa, rafinosa, dextrina, inulina, ramnosa, xilosa y arabinosa. Los azúcares de caña y remolacha son sustitutos aceptables; las abejas pueden utilizar algunos frutos como fuente de carbohidratos (Standifer et al., 1977). Los lípidos (ácidos grasos omega 3 y omega 6, esteroides y grasas) son usados como fuente de energía para larvas e individuos jóvenes y para la síntesis de reservas de grasa y glucógeno (Estevinho et al., 2011).

### 2.3 CALIDAD SANITARIA

Un alimento de buena calidad sanitaria debe ser: nutritivo, idóneo, fresco, sensorialmente aceptable, inocuo y larga vida de anaquel (*Fernández, 2008*). Existen diferentes factores que alteran la calidad del polen debido a el contacto con polinizadores, exposición a fuentes de contaminación (agua, aire, tierra) manipulación durante su producción y comercialización, equipo y superficies mal saneadas e inadecuado almacenamiento, el uso de sustancias químicas como plaguicidas, acaricidas, ácidos orgánicos, insecticidas, fungicidas, herbicidas y bactericidas teniendo efectos carcinógenos en seres humanos; se han encontrado 150 plaguicidas diferentes en colmenas (*Mullin et al., 2010*). Muchas sustancias tóxicas usadas para controlar la varroasis y ascosporiosis; estas sustancias se acumulan en miel, cera de abejas, polen y panales de abeja; los metales pesados y el uso continuo de antibióticos por parte de los apicultores utilizados para el tratamiento de enfermedades en las abejas, genera la acumulación de residuos en los productos apícolas, lo que conduce a la disminución de la calidad, dificultad para su comercialización y pueden tener efectos tóxicos directos sobre los consumidores (*Al-Waili et al., 2012*). Algunos compuestos alérgenos como glicoproteínas solubles en agua, ácidos y proteasas podrían causar reacciones alérgicas al momento de su consumo (*Sicherer et al, 2006*).

Otro factor importante en la calidad y seguridad sanitaria es la presencia de microorganismos patógenos en el polen entre los cuales destacan bacterias, virus, protozoarios, hongos y levaduras (*Graystock et al., 2016; Goulson et al, 2015; Belhadj et al., 2014; García-García et al., 2006*), que provienen de las abejas durante la recolección de la miel, del néctar o de fuentes externas (manipulación humana, equipos y recipientes, aire y tierra)(*González et al., 2005; Multinelli et al, 2008*).

## 2.4 MICROORGANISMOS INDICADORES

Los microorganismos de interés sanitario incluyen a grupos que son causantes de deterioro y agentes etiológicos de enfermedades asociadas al consumo de los alimentos entre ellos se encuentran:

- Bacterias mesófilas aeróbicas (BMA), son un grupo muy heterogéneo, que se desarrolla a temperaturas entre 25-37°C en presencia de oxígeno. Una elevada carga de BMA pone de manifiesto la exposición a diversas fuentes de contaminación (tierra, agua, aire, equipo y utensilios mal saneados), inadecuadas condiciones de almacenamiento, prácticas higiénicas deficientes o nulas, entre otras (Fernández, 2008).

- Bacterias esporuladas, diversas especies participan en el deterioro y su presencia en concentraciones elevadas indica la exposición al medio ambiente y falta de higiene en áreas y equipo (Jensen, 2012). son bacilos ampliamente distribuidos en la naturaleza, existen varias especies de importancia que afectan a los humanos (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*) y otras en abejas (*Paenibacillus larvae*) (Chagas et al., 2012) son adquiridas durante el contacto con el alimento de los insectos, algunas bacterias colonizan la estípula y otras dependen de las condiciones de pH, oxígeno y nutrientes para su desarrollo, pueden ser transmitidos por interacciones sociales mediante trofalaxia y coprofagia a otras especies de insectos que en algunos casos dependiendo de la especie los conduce a la muerte (Engel et al 2013). Las bacterias del género *Paenibacillus* spp., son trascendentales en la cría masiva de insectos polinizadores, debido a que especies como *P. larvae* provoca la muerte de abejas (*A. mellifera*) durante la etapa larval (Pridal, 2001; Graystock et al., 2013).

- Coliformes, son bacilos Gram Negativos fermentadores de lactosa a 35°C dentro de las primeras 24h de incubación. Los géneros más prominentes incluyen a *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Son indicadores de calidad sanitaria en el POLEN y pueden causar deterioro en diversos alimentos. (Fernández, 2008; Feng et al., 2002).

- Hongos y levaduras, su presencia en EL POLEN se asocia a una exposición de fuentes de contaminación y falta de frescura. Las levaduras son deterioradoras generando turbiedad, gasificación, malos olores, cambios de color, mucosidad; los hongos, generan un aspecto indeseable y tienen potencial tóxico (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*) para el hombre y animales (Fernández, 2008).

## 2.5 DIVERSIDAD MICROBIANA EN POLEN

En 1966 se reportaron microorganismos asociados al polen en condiciones de almacenamiento tales como *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Saccharomyces* (Pain et al 1966). Gilliam (1979), reportó la presencia de levaduras y bacterias del género *Bacillus*: *B. subtilis* fue aislada de muestras de polen tomadas directamente de las flores, mientras que *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. circulans* de polen almacenado. Pridal y colaboradores (1997), aislaron *B. circulans*, *B. licheniformis*, *Paenibacillus pabuli*, *Ascosphaera apis*, *Flavimonas (Pseudomonas) oryzihabitans* y *Pantoea agglomerans* de polen colectado directamente de trampas. La carga microbiana de polen joven y maduro colectado de colmenas incluye a *Yersinia* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp., y de polen corbicular a *Pseudomonas* sp. y *Streptococcus* sp. (García-García et al. 2006). *Serratia marcescens* (Brindza et al 2010), *Proteus mirabilis*, *Citrobacter diversus*, *Providencia* sp., *Enterobacter cloacae* (Belhadj et al 2014), *Listeria*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, aisladas de alimentos derivados de abejas y polen comercializado y almacenado (Belhadj et al 2014; Serra et al 1997).

## 2.6 MICROBIOMA

El sistema inmune de las abejas comprende varias líneas de defensa; entre ellas, barreras físicas, químicas, cutícula y membranas peritróficas, estas son la primera línea de defensa evitando que los patógenos se adhieran al cuerpo; cuando los patógenos rompen estas primeras líneas de defensa la respuesta inmune humoral representa la segunda línea de defensa activando la inmunidad innata dando respuestas de un amplio reconocimiento altamente conservado; la unión de PAMP por PRRs activa una serie de cascadas de señalización que conllevan a la activación de la respuesta inmune-celular mediada por hematocitos, formación de nódulos y encapsulación de microorganismos invasores. El intestino de las abejas contiene 1% de levaduras, 27% de bacterias gram positivas como *Bacillus*, *Bacteridium*, *Streptococcus*, *Clostridium* y 70% de gram negativas como *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Pseudomonas* (Al-Waili et al. 2012), las cuales aportan beneficios a las abejas participando en la digestión de los componentes del polen y otras como *Pseudomonas* contribuyen al rompimiento de la pared del grano de polen (Pain et al, 1966).

La micobiota presente en polen empacado y destinado para consumo humano, incluye a *Aspergillus* spp., *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *Penicillium* spp., *P. verrucosum*, *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *A. alternata*, *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *M. hiemalis*, *Botrytis* spp., *Epicoccum* spp., y diversas levaduras (Belhadj et al. 2014; García-García et al. 2006; González et al. 2005). La mayoría de ellos producen micotoxinas causantes de intoxicaciones agudas y crónicas con efectos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos, neurotóxicos y nefrotóxicos en humanos (Refai et al. 1996; FAO, 2000).

## 2.7 GÉNERO *Paenibacillus*

El género *Paenibacillus* se constituye de especies bacterianas que son de importancia para humanos, animales, plantas y medio ambiente; en plantas algunas de estas especies promueven el desarrollo mediante la fijación de los nutrientes, la protección contra insectos herbívoros y fitopatógenos, aplicaciones en la medicina con la producción de antimicrobianos, producción de detergentes, biocombustibles, etc; la mayoría de este género se encuentra en el suelo ó en las raíces de las plantas; de acuerdo a sus diversas características que presentan han sido descubiertos en diferentes hábitats desde regiones polares hasta trópicos, ambientes acuáticos hasta desiertos. En la siguiente TABLA II se muestran algunos ejemplos de las especies y su importancia (Grady et al 2016).

**Tabla. II Especies de *Paenibacillus* y su importancia.**

ESPECIE	IMPORTANCIA
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Antimicrobianos: - Polimixinas - Fusaricidinas
<i>Paenibacillus zanthoxyli</i> <i>Paenibacillus peoriae</i>	- Fijadoras de nitrógeno
<i>Paenibacillus elgii</i> <i>Paenibacillus kribbensis</i> <i>Paenibacillus macerans</i> <i>Paenibacillus muciliginosus</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	- Solubilización de fósforo
<i>Paenibacillus polymixa</i> <i>Paenibacillus larvae</i>	- Producción de sideróforos
<i>Paenibacillus alveii</i> <i>Paenibacillus brasiliensis</i> <i>Paenibacillus dendritiformis</i> <i>Paenibacillus ehimensis</i> <i>Paenibacillus elgii</i> <i>Paenibacillus kobensis</i> <i>Paenibacillus lentimorbus</i> <i>Paenibacillus macerans</i> <i>Paenibacillus peoriae</i>	- Biocontrol
<i>Paenibacillus popilliae</i>	- Insecticida

### 2.7.1 *Paenibacillus larvae*

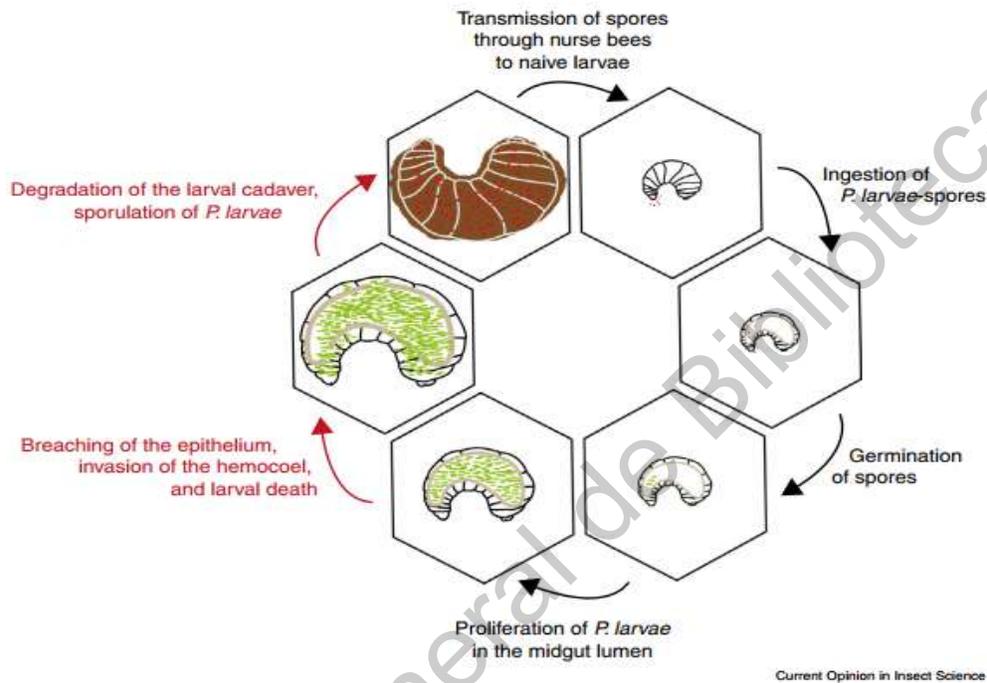
*Paenibacillus larvae* es un patógeno altamente infeccioso que solo afecta los estadios larvales de las abejas (Schild et al 2014); esta enfermedad ha generado pérdidas económicas estimadas en 5 millones de dólares o más en los Estados Unidos (Medina, 2014), en el año de 1932 fue introducida a México (en el estado de Puebla) por la importación de abejas reinas provenientes de E.U.A (OIE organización Internacional de la Salud Animal 2008).

Las especies de *Paenibacillus* se incluyeron originalmente al género *Bacillus* basándose en las características morfológicas comunes con *Bacillus subtilis*, En 1906 White describió la especie *Bacillus larvae* como agente patógeno de la enfermedad Loque Americana años más tarde en 1993 esta especie fue integrada a un nuevo género llamado *Paenibacillus* (Alippi et al 2004) el nombre de *Paenibacillus* se deriva del adverbio “paene” que significa “casi-bacillus”. *Paenibacillus larvae* es una bacteria flagelada, forma de varilla, Gram-Positiva, anaerobia facultativa, catalasa negativo, fermentan el manitol y la salicina, formadora de esporas (forma infectiva) y biofilm, resistentes al calor, agentes químicos y desecación (Alippi et al 2002), secreta enzimas implicadas en el metabolismo de hidratos de carbono capaz de metabolizar diferentes azúcares (glucosa y fructosa) e hidrolizar la caseína para el favorecimiento del crecimiento vegetativo. La susceptibilidad de las larvas ocurre durante las primeras etapas larvales (24-48 hrs de edad) después de la eclosión de los huevos (Poppinga et al 2015).

### 2.7.2 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *Paenibacillus larvae* se divide en dos etapas: La fase no invasiva que comienza cuando las abejas nodrizas proporcionan el alimento contaminado por esporas hacia las larvas; posteriormente las esporas germinan en el tracto intestinal medio larval en donde proliferan masivamente durante varios días sin destruir el epitelio del intestino, compitiendo con el microbioma de la larva durante los primeros días de vida eliminando con éxito a las demás bacterias y hongos presentes (Riessberger et al 2001), *P. larvae* es capaz de sintetizar antibióticos a través de genes que codifican la síntesis de péptidos antimicrobianos (Ebeling et al 2016 ) durante esta etapa *Paenibacillus larvae* es considerada como una bacteria comensal. La fase invasiva o destructiva comienza cuando destruye la matriz peritrófica por medio de enzimas como quitinasas(PI CBP49), colagenasas, hialurasas , proteasas (Djukic et al 2014), péptidos no ribosómicos (NRP) y péptidos-policéticos (NRP/PK) estos últimos factores de virulencia se activan

durante esta etapa para la eliminación de competidores (*Fünfhaus et al 2018*) como bacterias (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) y hongos (*Metschnikowia reukaufi* y *Aureobasidium pullulans*) presentes en la microbiota de *Apis mellifera* (*Good et al 2014*) posterior a esto rompen el intestino medio y pasan a hemolinfa generando septicemia y finalmente la muerte (*Alippi et al 2002*), esto ocurre dentro de 3-12 días después de la infección (*Ebeling et al 2016*) generando el colapso de la colonia; en este transcurso la larva cambia de color marrón a negro formando una masa viscosa que contiene millones de esporas, la ingesta necesaria para el inicio de la infección exitosa es de aproximadamente 8-10 esporas (*Genersch et al 2010*).



**FIGURA.I REPRESENTACIÓN DE LA FASE NO INVASIVA Y FASE INVASIVA.**(*Poppinga et al 2015*).

### 2.7.3 VÍA DE TRANSMISIÓN

La ingesta de polen y néctar aportan proteínas, carbohidratos y minerales esenciales que requieren para sus procesos fisiológicos tanto en el crecimiento e inmunidad de las crías, son recursos que recogen en mayores cantidades cumpliendo con sus necesidades nutricionales de la colonia; durante el proceso de recolección esta vía es común para la transmisión y propagación de *Paenibacillus larvae* por medio de las abejas adultas que alimentan a sus larvas diseminando la enfermedad mediante el desplazamiento de estas entre las colonia. Otra manera de propagación es llevada a cabo por los apicultores en donde la transmisión es a través del movimiento de la miel, equipo y introducción de reinas procedentes de colonias infectadas (*Ebeling et al 2016*). Las esporas de *Penibacillus larvae* pueden permanecer durante mas 35 años en los colmeneros, actualmente para prevenir la propagación la forma más eficaz es la quema total de colmeneros como equipo y materiales que estuvieron en contacto (*Morrissey et al 2015*).

### 2.7.4 GENOTIPOS

Dentro de esta especie comprende cuatro genotipos ERIC I-IV que se han definido de acuerdo al análisis de elementos repetitivos PCR (repPCR) realizado con cebadores específicos que amplifican los elementos de consenso, estos difieren fenotípicamente incluyendo la morfología, metabolismo y factores de virulencia a nivel larval y colonial. Estudios de bioensayos demostraron que ERIC I en 10-12 días mata todas las larvas mientras que los otros ERIC II-IV resultaron ser más rápidos de 5-7 días (*Morrissey et al 2015*); epidemiológicamente ERIC I y II se han aislado con más frecuencia en brotes en todo el mundo (*Poppinga et al 2012*) y son los genotipos más importantes.

## **2.8 DIAGNÓSTICO**

La detección de Loque Americana (*Paenibacillus larvae*) en el campo se basa principalmente en la observación de los diferentes cambios físicos que presentan los apiarios y larvas, en colonias sin síntomas las esporas de *P.larvae* pueden ser detectados en muestras de abejas adultas; algunos apicultores utilizan antibióticos en polvo (tetraciclina) para tratar Loque Americana pero debido al incremento de la resistencia bacteriana y la alteración del microbioma del intestino de las abejas está practica es inapropiada; otro método efectivo pero costoso para los apicultores es quemar los colmeneros afectados, el resultado es la pérdida de material y colmenas. Debido a la falta de métodos eficaces y seguros surge la necesidad de crear alternativas para la detección (Yost et al 2016); actualmente se han implementado una serie de técnicas y métodos para la detección de *Paenibacillus larvae*, ejemplo de ello son:

### **2.8.1 CULTIVOS**

Para cultivar *Paenibacillus* los medios más utilizados son: Infusión de agar cerebro corazón suplementado con tiamina; Agar Muller-Hilton, extracto de levadura, fosfato de potasio, glucosa y piruvato (MYPGP); Columbia sangre; agar sangre de oveja y el más reciente agar *Paenibacillus larvae* (PLA) (De Graaf et al 2006). Sin embargo para el diagnóstico estos suelen ser tardados.

### **2.8.2 PERFILES BIOQUÍMICOS**

Este es un enfoque microbiológico tradicional para la identificación preliminar y con lectura inmediata en donde la identificación de las especies se basa de acuerdo al metabolismo de carbohidratos que genera cada una, estos sistemas pueden ser manuales o automatizados pero se requiere una primera etapa que es el cultivo (De Graaf et al 2006) (Mac Faddin. 2003)

### **2.8.3 MICROSCOPIA**

Es fundamental para la identificación microbiana basándose principalmente en la identificación morfológica dependiendo de los diferentes tipos de tinciones empleadas para su identificación.

### **2.8.4 INMUNO-TÉCNICAS**

Se basa en la interacción antígeno-anticuerpo y depende mucho de la especificidad del anticuerpo preparado (De Graaf et al 2006).

## 2.8.5 TÉCNICAS MOLECULARES

Los métodos moleculares más utilizados para la identificación de *Paenibacillus larvae* se basan en la región 16s rRNA por ejemplo:

-PCR 16S rRNA, el uso de cebadores específicos diseñados por Govan y colaboradores produce un único amplicón, mientras que los cebadores diseñados por Dobbelaere y colaboradores produce cuatro amplicones, el uso de ambos da como resultado cruza por lo tanto no permite la diferenciación entre especies; además reduce el número de especies analizadas de *Paenibacillus* y el grado de similitud entre genes 16s rRNA es aproximadamente del 99.44% (Alippi et al 2002).

-Análisis por PCR-RFLP de la región 16s rRNA con este método es posible diferenciar entre dos especies de *Paenibacillus* pero la técnica es laboriosa y costosa para la aplicación a un gran número de muestras (Alippi et al 2004).

-PCR anidada aunque esta es una prueba más específica y permite una amplia gama de muestras el diseño de cebadores tanto internos como externos es de suma importancia ya que este método tiene una alta sensibilidad pero es más propenso a contaminación (De Graaf et al 2006).

-ERIC-PCR: Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus PCR, es una técnica empleada para la clasificación de las bacterias a nivel sub-especie; estas secuencias son a menudo únicas en el genoma de la bacteria (Wang et al 2009); la desventaja es que la sensibilidad de esta técnica es menor cuando se emplea a nivel de comunidad microbiana dando bandas inespecíficas.

Sin embargo, estas estrategias moleculares tienen la desventaja de que son caras y difíciles de estandarizar, y durante la producción industrial de abejas estos métodos moleculares pueden ser costosos durante las pruebas microbiológicas.

## 2.9 IMPORTANCIA DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA (tRNA) COMO MARCADOR MOLECULAR

Los tRNAs, son esenciales para transferir aminoácidos específicos durante la síntesis de nuevas proteínas; durante el proceso de reconocimiento es crucial porque si se une un aminoácido equivocado al tRNA la síntesis de proteína será defectuosa durante el proceso de traducción, estas moléculas comprenden aproximadamente del 10 al 15% del total del RNA celular (*Levinger et al., 2004*). Existen alrededor de 60 tipos de tRNA y otros 100-110 en las células de los mamíferos, en las células bacterianas actúan como adaptadores de aminoácidos con los codones en los ARN mensajeros estos están implicados en la traducción de los codones de ARN mensajero durante la síntesis de proteínas (*Shepherd et al 2015*); son moléculas adaptadoras mejor caracterizadas de 73 a 93 nucleótidos, se transcriben como largos precursores que se modifican postranscripcionalmente para formar moléculas de tRNA funcional, algunas bases y estructuras secundarias son constantes para todos los tRNA, mientras otras partes son variables. Se encuentran en los tres dominios, los genes que codifican para los tRNA son generalmente parte de clusters de genes de tRNA, parte de operones de RNA ribosomal (rRNA), o partes de unidades de transcripción policistronica. Existe una gran variedad en las secuencias de las bases tanto de procariontas como eucariotas (*Chopra et al 2014*) cada molécula de tRNA sirve como adaptadores específicos para la decodificación de ARN mensajero a proteína, esto es a partir del transporte de aminoácidos hacia el ribosoma. En bacterias las unidades de transcripción de tRNA abarcan regiones espaciadoras de operones de ARN ribosómico y operones de tRNA que contienen genes que codifican las proteínas, la secuencia de los nucleótidos varía entre cada gen de tRNA en ellos hay de cuatro a cinco repeticiones invertidas formando el tallo bucle que contienen elementos de reconocimiento específico (*Shepherd et al 2015*).

Los tRNAs además de su papel central en la traducción, participan en otros procesos celulares, muchas de estas funciones aún están bajo estudio, estas incluyen el papel de tRNAs como iniciadores para la transcriptasa reversa retroviral, incluyendo el HIV (Virus de Inmunodeficiencia Humana); y el papel de los tRNAs en las transformaciones de aminoácidos tales como la conversión de ácido glutámico a glutamato semialdehído (el primer precursor en la biosíntesis de porfirinas en muchos organismos y en cloroplastos). Además algunos tRNAs están involucrados en la regulación de la expresión de genes de aminoacil-tRNA sintetetas, esta regulación puede ocurrir a nivel de transcripción del gen o de traducción del mRNA. (*Mörl et al., 2001; Söll et al., 1995*).

La generación de moléculas de tRNAs funcionales es un paso esencial en todos los organismos. Los tRNAs se transcriben primero como largos precursores que contienen secuencias adicionales

en los extremos 5' y 3', las cuales deben ser removidas para producir moléculas de tRNA funcionales (Dubrovsky et al., 2004). La remoción de la secuencia 5' es efectuada por la ribonucleoproteína RNasa P (Frank et al Pace, 1998), el cual es un proceso muy conservado en la mayoría de los organismos, mientras que la generación del extremo 3' maduro es mucho más complejo y varía de organismo a organismo (Schiffer et al, 2003; Schürer et al., 2001).

La enzima ATP (CTP):tRNA nucleotidiltransferasa adiciona la secuencia CCA esencial al 3' terminal de los tRNAs. Esta enzima es esencial en aquellos organismos que no tienen codificada la secuencia CCA en los genes de tRNA, incluyendo eucariotes, algunas eubacterias y algunas arqueas (Campos et al., 2005, Arvizu, 2005, Martínez, 2007). En organismos como *E. coli* en donde todos los genes de tRNA tienen codificado el CCA, esta enzima no es esencial, y al parecer sólo se limita a la reparación de los tRNAs, que han sufrido un ataque exonucleolítico (Bacher et al., 1997).

Se han identificado dos endonucleasas que participan en el primer paso del procesamiento: RNasa III, cuyo sustrato es un RNA con una estructura de doble cadena, y la RNasa E, la cual reconoce regiones ricas en AU (Schürer et al., 2001). Mientras que la reacción de arreglo que sigue al corte endonucleolítico puede ser catalizada por una variedad de exonucleasas; 6 enzimas diferentes (RNasa II, BN, PH, D, PNPasa, T) son capaces de catalizar esta reacción tanto in vitro como in vivo, y al igual que en el corte endonucleolítico, ninguna de estas enzimas es específica para la maduración de los tRNAs, por lo que, al menos en *E. coli* parece ser un grupo de endonucleasas y exonucleasas que no son específicas para cierta clase de RNA, pero en cambio reconocen pequeños elementos estructurales que son comunes en diversas clases de moléculas de RNA (Mörl et al., 2001), en el caso de la bacteria *Bacillus subtilis*, las exonucleasas PNPasa y RNasa R son las principales en la degradación de RNA altamente estructurado (Campos y col., 2010).

Por lo tanto, el número de copias de genes de tRNA disperso en el genoma de las bacterias, su posición y función esencial hace posible considerarlos como marcadores moleculares para el diagnóstico bacteriano. De manera particular nuestro interés es estudiar los tRNAs en la bacteria *Paenibacillus larvae* y diseñar estrategias moleculares que permitan su identificación.

### III. JUSTIFICACIÓN

*Paenibacillus larvae* causante de la enfermedad Loque Americana es uno de los principales patógenos de las larvas de abeja melífera, genera no solo la muerte de la descendencia de las abejas sino también la pérdida de sus productos como miel, jalea real, polen, cera, etc. El producto que se obtiene en mayor producción y exportación es la miel, México se encuentra en el quinto lugar en producción con un promedio de 57 mil 200 toneladas al año y en tercer lugar como exportador generando un promedio de 32 mil 354 toneladas de miel en los últimos 5 años (SAGARPA 2015) por otra parte el valor comercial de una abeja reina va de 130-150 pesos cada apicultor puede producir de 1000 a 1500 abejas reinas mensual. En Querétaro los productos obtenidos de las colmenas son: miel 18.10 toneladas, cera 1.68 toneladas, polen 0.50 toneladas, propóleo 0.08 toneladas y 7 261 abejas reina registradas (INEGI. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007).

En los últimos años se ha desarrollado una serie de técnicas y métodos basados en 16s por PCR para el diagnóstico de Loque Americana, sin embargo estos métodos son costosos, laboriosos, no distinguen entre especie y los resultados varían de acuerdo a cada laboratorio. Lo anterior motiva al desarrollo de nuevas estrategias moleculares para la detección de esta bacteria, una de ellas es el uso de los genes de RNA de transferencia (tRNA), los cuales son moléculas esenciales, altamente estables evolutivamente, y algunos genes como el de tRNA<sup>Cys</sup> presentan una copia única en algunos Firmicutes (Campos-Guillén et al., 2010; Kanaya et al., 1999). En la actualidad con la disponibilidad de secuencias de ADN en la base de datos del género *Paenibacillus* y el uso de programas computacionales hace posible un análisis completo sobre la ubicación y distribución de los tRNAs, así como el desarrollo de un método molecular por PCR específico para la detección de *Paenibacillus larvae*.

#### **IV HIPÓTESIS**

El análisis *in silico* de genomas del grupo taxonómico de *Paenibacillus* permite identificar regiones únicas asociadas a genes de RNA de transferencia (tRNA) y utilizarlas en estrategias moleculares para el diagnóstico de Loque Americana (*Paenibacillus larvae*).

#### **V OBJETIVO GENERAL**

Analizar los genes de tRNA en el grupo taxonómico *Paenibacillus* y establecer su aplicación como estrategia molecular para la detección de *Paenibacillus larvae*.

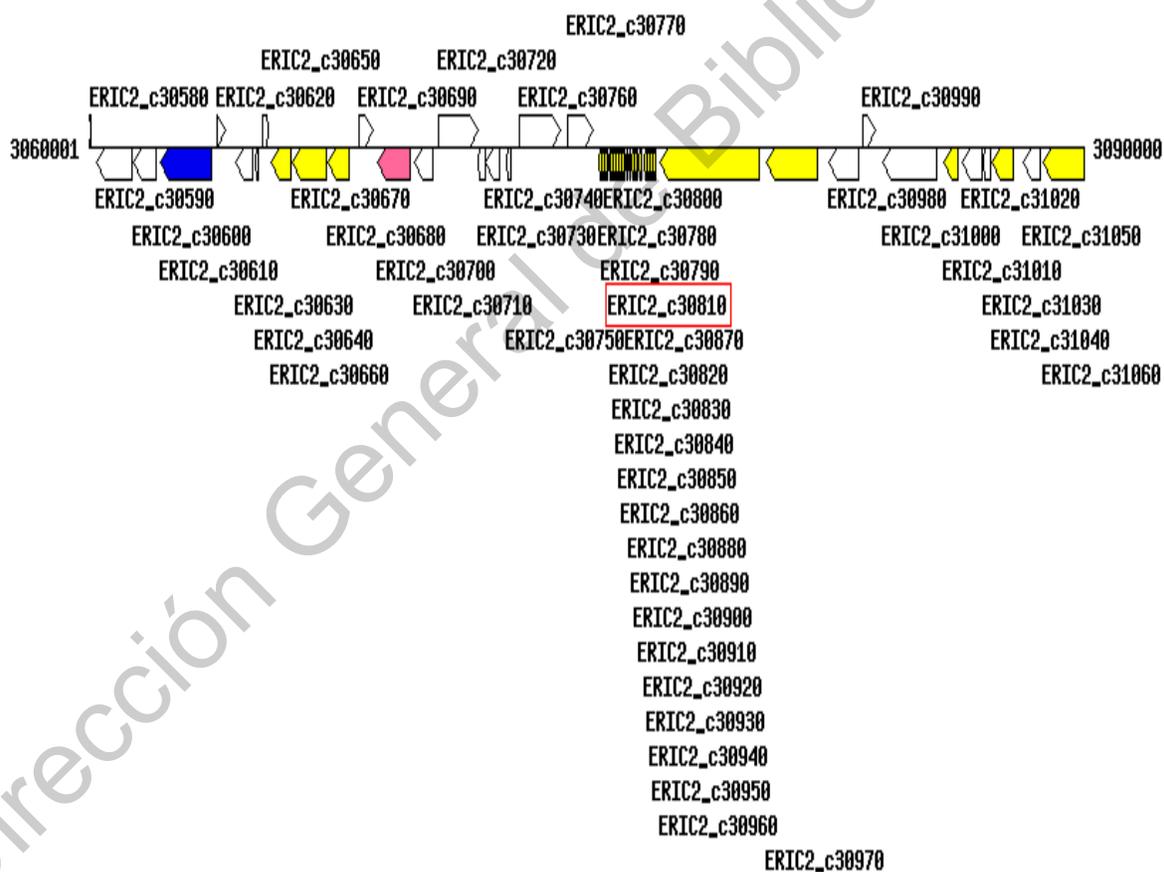
#### **VI OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar un análisis Bioinformático de la distribución y frecuencias de los genes de tRNA del género *Paenibacillus*
- Diseñar una estrategia molecular basada en regiones únicas de tRNA para el diagnóstico de *Paenibacillus larvae*
- Estandarización de la técnica molecular por PCR para la detección de *Paenibacillus larvae*

## VII. METODOLOGÍA

### 7.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Con un total de 196 genomas de *Paenibacillus* disponibles en la base de datos se analizaron las secuencias utilizando el programa tRNAscan-SE para la ubicación, distribución y frecuencia de los genes de tRNA. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de cluster empleando solamente 58 especies del género *Paenibacillus* usando el software R, versión 3.0.2. Para desarrollar una estrategia de PCR basado en genes de tRNA se tomaron en consideración aquellos que presentaron una sola copia por genoma. En el caso del genoma de *Paenibacillus larvae* se ubicaron genes de tRNA de bajo número de copia y se decidió desarrollar un método con el gen del tRNA<sup>Cys</sup>. Encontrándose su ubicación en la región plv:ERIC2\_c30780 - plv:ERIC2\_c30970 (FIGURA II Y TABLA III).



**FIGURA II.** Localización del gen tRNA<sup>Cys</sup> en la región plv:ERIC2\_c30780.

**TABLA II. GENES LOCALIZADOS EN LA REGION PLV:ERIC2**

<b>REGION PLV:ERIC2</b>	<b>GEN</b>
plv:ERIC2_c30770	hydrolase-like protein
plv:ERIC2_c30780	trnL3; tRNA-Leu; K14228 tRNA Leu
plv:ERIC2_c30790	trnR3; tRNA-Arg; K14219 tRNA Arg
plv:ERIC2_c30800	trnL4; tRNA-Leu; K14228 tRNA Leu
plv:ERIC2_c30810	trnC; tRNA-Cys; K14222 tRNA Cys
plv:ERIC2_c30820	trnG1; tRNA-Gly; K14225 tRNA Gly
plv:ERIC2_c30830	trnQ1; tRNA-Gln; K14223 tRNA Gln
plv:ERIC2_c30840	trnH1; tRNA-His; K14226 tRNA His
plv:ERIC2_c30850	trnW; tRNA-Trp; K14235 tRNA Trp
plv:ERIC2_c30860	trnY2; tRNA-Tyr; K14236 tRNA Tyr
plv:ERIC2_c30870	trnT3; tRNA-Thr; K14234 tRNA Thr
plv:ERIC2_c30880	trnF2; tRNA-Phe; K14231 tRNA Phe
plv:ERIC2_c30890	trnD2; tRNA-Asp; K14221 tRNA Asp
plv:ERIC2_c30900	trnM4; tRNA-Met; K14230 tRNA Met
plv:ERIC2_c30910	trnV3; tRNA-Val; K14237 tRNA Val
plv:ERIC2_c30920	trnE2; tRNA-Glu; K14224 tRNA Glu
plv:ERIC2_c30930	trnM5; tRNA-Met; K14230 tRNA Met
plv:ERIC2_c30940	trnS4; tRNA-Ser; K14233 tRNA Ser
plv:ERIC2_c30950	trnN2; tRNA-Asn; K14220 tRNA Asn
plv:ERIC2_c30960	rrlD; 23S ribosomal RNA; K01980 23S ribosomal RNA
plv:ERIC2_c30970	rrsD; 16S ribosomal RNA; K01977 16S ribosomal RNA

**7.2 DETECCIÓN DE *Paenibacillus larvae* POR PCR**

Para conocer la utilidad de la estrategia de PCR desarrollada en este trabajo en la detección de *P. larvae*, se aislaron bacterias esporuladas a partir de muestras de polen comercial proporcionada por una empresa anónima y destinado para alimentación de insectos de interés agrícola. Por razones de limitación de reactivos moleculares, se analizaron aproximadamente 600 colonias bacterianas en total obtenidas de 5 muestras de polen comercial de Europa, 1 muestra de polen comercial de México y 1 muestra de polen comercial de Chile. Para la obtención de las colonias bacterianas, 1 g de polen fue homogenizado en 10 mL de peptona y tratado a 80 °C por 10 minutos para seleccionar bacterias formadoras de esporas. Después, diluciones seriadas fueron inoculadas en medio MYPGP e incubadas a 37 °C durante 24 h. Las colonias bacterianas obtenidas por este procedimiento fueron analizadas por PCR con las condiciones descritas anteriormente. Adicionalmente las colonias bacterianas fueron analizadas por MALDITOF-MS usando MicroFlex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) para confirmar la identificación.

La identificación bacteriana fue realizada por el procedimiento operativo estándar. Método extendido de transferencia directa. Técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos al permitir la medición de iones derivados de moléculas, separándolos de las muestras en función de su masa.

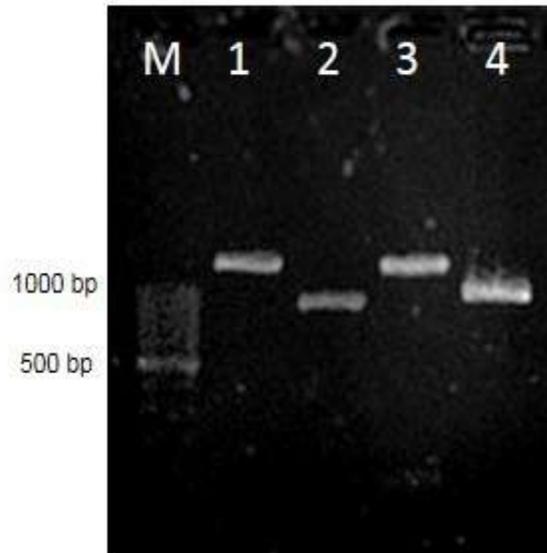
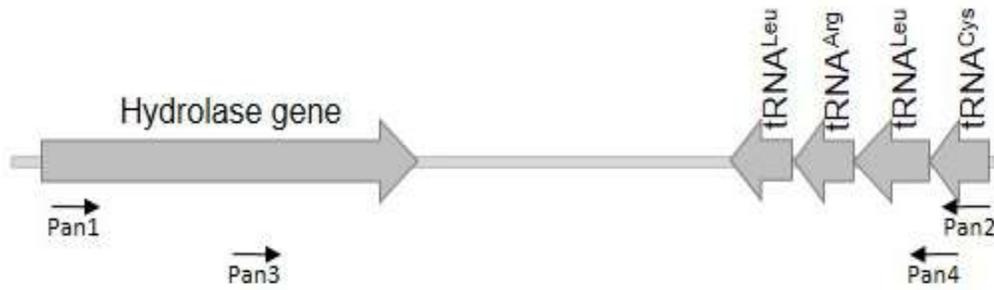
- Cada colonia bacteriana (cultivo puro) se mezcló con una matriz en exceso sobre una tarjeta metálica, de tal forma que ambas cristalicen cuando se evapora el solvente,
- Posteriormente se irradia esta preparación con un láser, en condiciones de alto vacío. La matriz absorbe esta energía y la transfiere a la muestra, provocando su ionización. El área irradiada se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa creando una densa nube de gas entre dos electrodos formando un campo eléctrico que se emplea para acelerar la muestra hasta el detector. Los iones más ligeros experimentan una mayor aceleración, y llegan primero al detector, una vez en este, se genera el perfil o huella química específico de esa muestra.
- Las identificaciones realizadas a nivel de género y especie, en ocasiones subespecie (Fernández et al, 2010)

### 7.3 CULTIVO

Las cepas de *Paenibacillus* se cultivaron en medio MYPGP, consistió en 1,5% de extracto de levadura (Difco Laboratories). 1,0% de caldo Mueller-Hinton (Difco Laboratories), 0,2% de glucosa, 0,3% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% de piruvato sódico y 2,0% de agar (Dingman y Stahly 1983). Todas las demás cepas bacterianas del genero *Bacillus* se cultivaron en Agar Soya Trypticaseína (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE. UU.). Se incubaron a 37°C durante 24Hrs.

#### 7.4 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar le región del tRNA<sup>Cys</sup> a partir del genoma de la cepa de *Paenibacillus larvae* (ATCC 9545). Los cebadores Pan1 y Pan3 se diseñaron a partir de la secuencia del gen de hidrolasa (plv:ERIC2\_c30770), mientras que Pan2 y Pan4 se diseñaron a partir de la secuencia del gen de tRNA<sup>Cys</sup> (plv:ERIC2\_c30810) . La combinación de los cebadores nos permitió amplificar por PCR los siguientes tamaños: Pan1-Pan2, 1268 bp; Pan3-Pan4, 907 bp; Pan1-Pan4, 1218 bp; and Pan2-Pan3, 957 bp (FIGURA III). Para probar la combinación de los cebadores por PCR se hizo lo siguiente: Se suspendió una colonia de *P. larvae* en 50 µl of agua destilada estéril y calentada a 95°C durante 10 minutos, se tomó 1 µl de la suspensión bacteriana y se usó en una mezcla de PCR de 30µl PCR de la marca Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). Como controles negativos de amplificación del PCR se usaron cepas obtenidas en el laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Querétaro (LMUAQ) indicadas en la TABLA IV.



**FIGURA III Diseño de cebadores y productos tRNACys-PCR.** Los cebadores se diseñaron para amplificar la región Hidrolase-tRNACys en *P. larvae* (Figura superior). Figura inferior muestra la amplificación por PCR; Carril 1, combinación Primers Pan1-Pan2 (producto de 1268 bp), carril 2, Pan3-Pan4 (producto de 907 bp), carril 3, Pan1-Pan4 (producto de 1218 bp) y carril 4, Pan2-Pan3 (producto de 957 bp). Carril M contiene un marcador de tamaño de ADN Thermo Scientific de 100 pb .

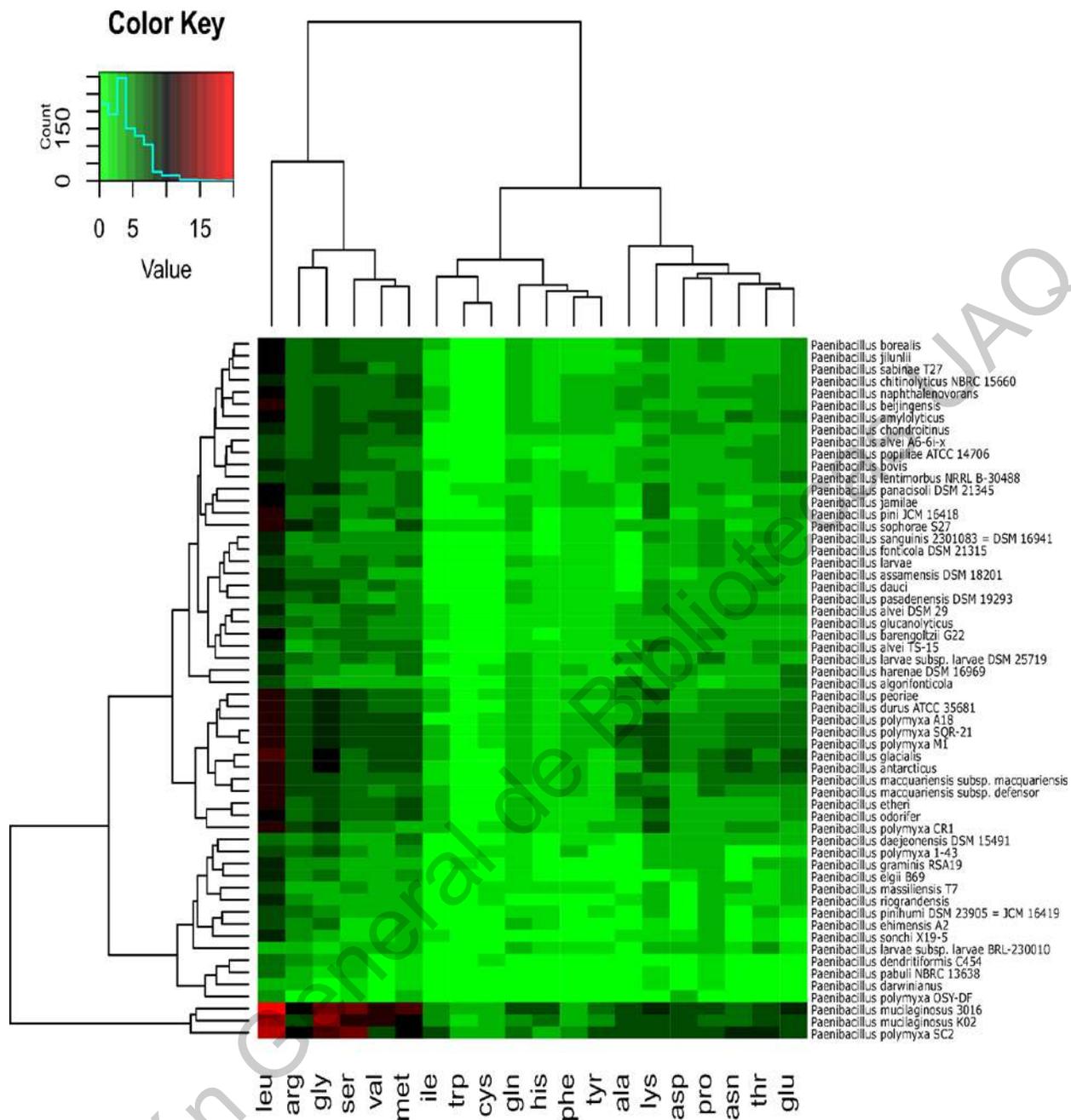
**TABLA IV. Cepas bacterianas y cebadores usados en este estudio.**

Cepas	Obtención	Cepas	Obtención
	ATCC		
<i>Paenibacillus larvae</i>	9545	<i>Staphylococcus cohnii</i>	LMUAQ
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	LMUAQ	<i>Staphylococcus xylosus</i>	LMUAQ
<i>Paenibacillus odorifer</i>	LMUAQ	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	LMUAQ
<i>Paenibacillus peoriae</i>	LMUAQ	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	LMUAQ
<i>Escherichia coli</i>	LMUAQ	<i>Micrococcus luteus</i>	LMUAQ
<i>Pseudomonas sp.</i>	LMUAQ	<i>Kocuria sp.</i>	LMUAQ
<i>Salmonella gaminata</i>	LMUAQ	<i>Sanguibacter marinus</i>	LMUAQ
<i>Psycrobacter faecalis</i>	LMUAQ	<i>Kytococcus sedentarius</i>	LMUAQ
<i>Bacillus koreensis</i>	LMUAQ	<i>Citricoccus sp.</i>	LMUAQ
<i>Bacillus pumilus</i>	LMUAQ	<i>Planomicrobium chinense</i>	LMUAQ
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	LMUAQ	<i>Microbacterium oleivorans</i>	LMUAQ
<i>Bacillus thuringensis</i>	LMUAQ	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	LMUAQ
<i>Bacillus subtilis</i>	LMUAQ	<i>Corynebacterium xerosis</i>	LMUAQ
<i>Bacillus altitudinis</i>	LMUAQ	<i>Agrococcus lahaulensis</i>	LMUAQ
<i>Staphylococcus aureus</i>	LMUAQ	<i>Planococcus plakortidis</i>	LMUAQ
Cebadores	Target	Secuencia	
Pan1	Hidrolase	AAGAAATGTACATAATTGATGAGGG	
Pan2	5' Cys	GGCGCCATAGCCAAGTGGTAAGGC	
Pan3	Hidrolase	TTTATTCTGACGAATACAAGACCGG	
Pan4	3' Cys	GTTCGAATCTGGGTGGCGCCTCCA	

## VIII RESULTADOS

### 8.1 OBTENCIÓN DE NÚMERO DE COPIAS DE GENES DE tRNA EN EL GÉNERO *Paenibacillus*

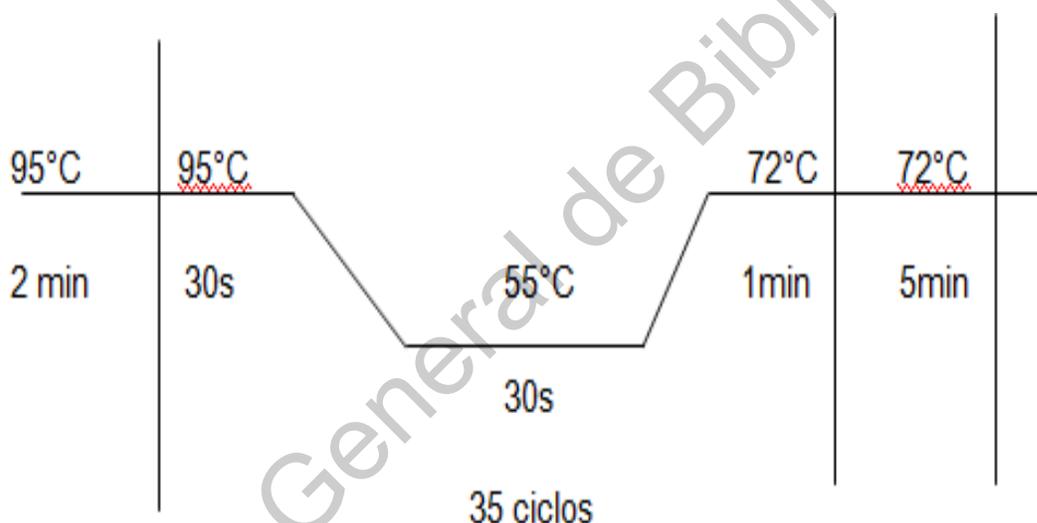
En este trabajo desarrollamos una estrategia molecular basada en la técnica de PCR utilizando los genes de tRNA que presentaron una copia única para el genoma de *Paenibacillus larvae* basándose en la organización de los genes de tRNA. Para lograrlo se predijeron los recuentos de genes de tRNA utilizando tRNAscan-SE. Los resultados muestran en general que en los genomas analizados del género *Paenibacillus*, algunos isoaceptores de tRNA mostraron números de copia relativamente bajos de 1 a 2 copias (tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Ile</sup> y tRNA<sup>Trp</sup>) en todos los genomas analizados (Figura IV, representado por color verde y gris). En otros mostraron números de copia relativamente altos (tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> y tRNA<sup>Val</sup>). En algunos, hubo tRNAs de decodificación de tripletes para un determinado aminoácido en *P. larvae* con un solo gen, por ejemplo; tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Ile</sup> y tRNA<sup>Trp</sup>. Decidimos usar el gen trnC (tRNA<sup>Cys</sup>) con el propósito de un método de diagnóstico para la enfermedad de la Loque Americana (*P. larvae*). En *P. larvae*, el gen para tRNA<sup>Cys</sup> se encuentra dentro de un operón que consiste en 18 genes de tRNA, 23S rDNA y 16S rDNA genes (región del genoma plv: ERIC2\_c30780 - plv: ERIC2\_c30970). Para el desarrollo de nuestra estrategia de PCR usamos el gen similar a la hidrolasa localizado río abajo del gen de tRNA<sup>Cys</sup> (región del genoma plv: ERIC2\_c30770). Después del alineamiento de las secuencias seleccionadas (del gen tipo hidrolasa a tRNA<sup>Cys</sup>), se encontró que las secuencias de ADN son específicas para *P. larvae* y se usaron para el diseño de cebadores específicos.



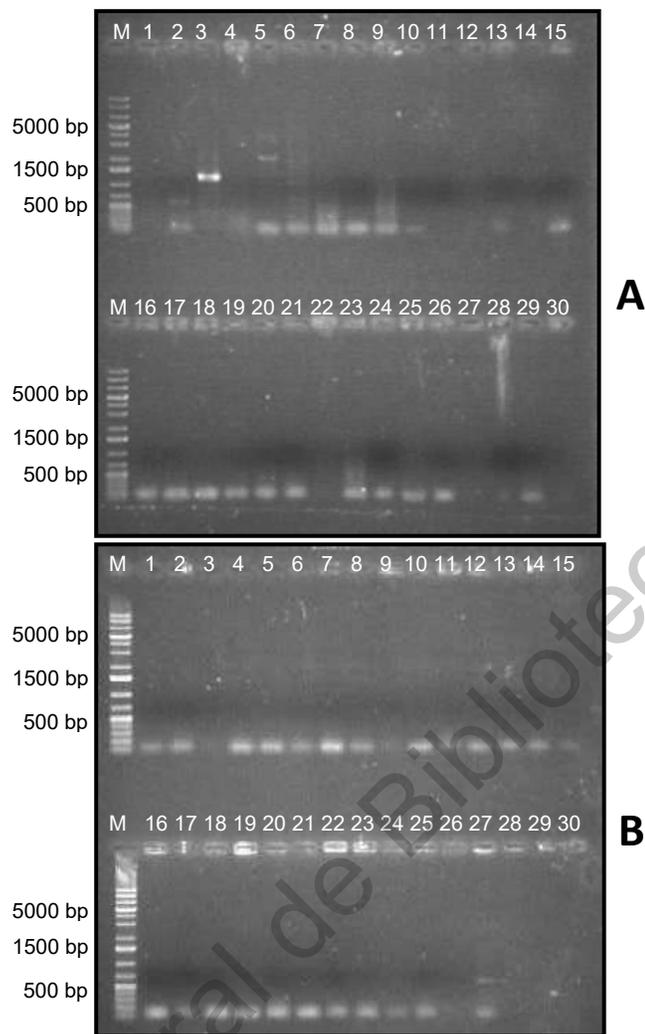
**FIGURA IV. Distribución y número de copias de genes de tRNA en genomas de *Paenibacillus* sp.** Los genes de tRNA se mapearon y extrajeron utilizando el programa tRNAscan-SE (Lowe y Eddy, 1997). De los genes predichos, se obtuvieron los recuentos de tRNA por isoaceptores y se realizaron análisis de conglomerados utilizando el paquete de software R, versión 3.0.2. El color verde significa bajo número de copias y rojo como alto número de copias de los genes de tRNA indicado en la parte inferior de la figura.

## 8.2 ESTANDARIZACIÓN DEL PCR PARA AMPLIFICAR LA REGIÓN *hydrolasa-tRNA<sup>Cys</sup>* USANDO LA CEPA DE REFERENCIA *Paenibacillus larvae*.

Los análisis de PCR revelaron la presencia de bandas específicas en la cepa de *Paenibacillus larvae* (FIGURA III, carriles 1, 2, 3 y 4) de acuerdo con los tamaños previstos, obteniéndose que las condiciones para una amplificación de buena calidad fueron: desnaturalización (2 min, 95 ° C), 35 ciclos a 95 ° C durante 30 s, hibridación 55 ° C durante 30s y 72 ° C durante 1 min, elongación final a 72 ° C durante 5 min (FIGURA V). Para demostrar la especificidad del PCR, se emplearon bacterias Gram negativas y Gram positivas (TABLA IV), utilizando las condiciones de PCR analizadas para *P. larvae*. Los cebadores de PCR (Pan1 y Pan2) se utilizaron en treinta cepas y se observó especificidad solo para *P. larvae* (FIGURA VI, PANEL A, CARRIL 3). Ninguna otra cepa bacteriana generó un amplicón similar con las combinaciones de cebadores probadas en las condiciones de PCR especificadas.



**FIGURA V .PCR. Las condiciones de PCR:** desnaturalización (2 min, 95 ° C), 35 ciclos a 95 ° C durante 30 s, hibridación 55 ° C durante 30s y 72 ° C durante 1 min, paso de elongación a 72 ° C durante 5 min. **(FIGURA VI)** Se sometieron a electroforesis 5 µl de amplicón en agarosa al 1,0% (Sigma) y se visualizaron en un transiluminador UV.



**FIGURA VI ELECTROFORESIS DE tRNA<sup>Cys</sup>-PCR en diversas cepas bacterianas.** Panel A en el orden 1 al 30: *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus odorifer*, *Paenibacillus larvae* (ATCC 9545), *Paenibacillus peoriae*, *Escherichia coli* XL1-blue, *Pseudomonas* sp., *Salmonella gaminata*, *Psychrobacter faecalis*, *Bacillus koreensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus altitudinis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus*, *Arthrobacter phenanthrenivorans*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria* sp., *Sanguibacter marinus*, *Kytococcus sedentarius*, *Citricoccus* sp., *Planomicrobium chinense*, *Microbacterium oleivorans*, *Arthrobacter gandavensis*, *Corynebacterium xerosis*, *Agrococcus lahaulensis* and *Planococcus plakortidis*. El Panel B representa una amplificación de PCR negativa de algunas colonias obtenidas de polen comercial cultivadas en agar MYPG. Del 1 al 10 polen de Holanda, 11 al 20 polen de Mexico, y 21 a 30 polen de Chile. . M marcador Thermo Scientific 1 Kb Plus DNA .

### 8.3 DETECCIÓN DE *Paenibacillus larvae* EN COLONIAS OBTENIDAS DE POLEN COMERCIAL

Con el fin de examinar la presencia de *P. larvae* en polen comercial obtenido de diferentes localidades (Holanda, México y Chile), recuperamos las colonias bacterianas obtenidas en medio de agar MYPGP y para hacer eficiente las reacciones de PCR, se agruparon 10 colonias por muestra de PCR. De esta manera logramos analizar un total de 600 colonias. Los resultados de amplificación fueron negativos para todas las colonias y una electroforesis representativa de esos resultados se muestra en la FIGURA VI, panel B., en donde los carriles 1 a 10 son de Holanda, los carriles 11 a 20 de México y los carriles 21 a 30 de Chile. Para validar estos resultados negativos, las colonias bacterianas con fenotipo similar se identificaron mediante MALDITOF-MS (TABLA II). El análisis taxonómico en muestras de Holanda indicó que el género *Bacillus*, representado por diez especies, fue el más común, seguido por *Paenibacillus* con cinco especies, mientras que en muestras de México el género *Bacillus* estuvo representado por 8 especies y *Paenibacillus* con una especie. Muestras de Chile fueron representadas con 8 especies para el género *Bacillus*. El resultado obtenido significó que *P. larvae* podría estar ausente en estas muestras o la recuperación de colonias bacterianas fue limitada.

**TABLA 2. IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS BACTERIANAS OBTENIDAS DE POLEN COMERCIAL POR MEDIO DE MALDITOF-MS**

Europa	Mexico	Chile
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus altitudinis</i>
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>
<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus mojavensis</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>	<i>Bacillus endophyticus</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	
<i>Bacillus altitudinis</i>		
<i>Paenibacillus cookii</i>		
<i>Paenibacillus odorifer</i>		
<i>Paenibacillus peoriae</i>		
<i>Paenibacillus polymyxa</i>		
<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i>		

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## IX DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La propagación global de *P. larvae* entre los colmenares de los países productores de abejas se relaciona a menudo con la importación de reinas, colonias o miel o polen contaminados y causa pérdidas económicas considerables en la industria de la apicultura (Bisson et al. 2016; Graystock et al. 2013). En consecuencia, la detección de *P. larvae* juega un papel importante en el control eficiente de la diseminación del patógeno durante la producción comercial de productos de la colmena y en muchos países han implementado la detección obligatoria de enfermedades para los materiales importados. Sin embargo, las medidas de control para este patógeno de abeja no se implementan en todos los países. En México, por ejemplo, los requisitos reglamentarios en general no están definidos o no incluyen instrucciones detalladas para su aplicación. Si bien se informó de la presencia de *P. larvae* en México desde 1994 y algunos casos reconocidos oficialmente han sido detectados o aislados en México (Djordjevic et al. 1994), no hay datos disponibles que cuantifiquen la detección de la enfermedad de *P. larvae*.

Aunque se han utilizado diversos métodos de esterilización para eliminar los microorganismos presentes en el polen, algunas bacterias sobreviven a estos tratamientos debido a su capacidad para formar esporas. Además, varios enfoques han utilizado la radiación gamma como un método de control para la erradicación de *P. larvae* formadora de esporas. Por lo tanto, sigue existiendo preocupación acerca de si el polen de abeja comercial actualmente puede transportar bacterias patógenas como *P. larvae*, a pesar de la implementación de métodos de esterilización.

Con el fin de identificar *P. larvae* en muestras de polen y como una herramienta para controlar la propagación del patógeno, desarrollamos el enfoque tRNA<sup>Cys</sup>-PCR, basado en la amplificación del locus tRNA<sup>Cys</sup>. Este es un método de diagnóstico rápido y confiable pero robusto. Los resultados presentados indican que el consenso tRNA<sup>Cys</sup>, con un gen de copia única en el genoma de *P. larvae*, es un excelente marcador molecular asociado con un gen de hidrolasa y podría usarse como diagnóstico molecular. Esta propiedad hace que el método sea adecuado para la identificación de *P. larvae* y podría ser un enfoque rápido y directo que complemente a los que ya existen. Además, tRNA<sup>Cys</sup>-PCR es técnicamente menos exigente y consume más tiempo que la secuenciación de ADN cuando se usa 16S rRNA-PCR. tRNA<sup>Cys</sup>-PCR podría ser el método de elección cuando se deben analizar grandes cantidades de muestras comerciales de polen de abeja o como primer paso para identificar especies relacionadas a *P. larvae* basadas en secuencias genómicas.

Usando este enfoque, se demostró que *P. larvae* estaba ausente de las bacterias formadoras de esporas obtenidas de muestras comerciales de polen de abeja. Este resultado se verificó mediante un análisis MALDITOF-MS que también identificó una serie de especies bacterianas que estaban presentes como contaminantes microbianos de las muestras de polen. Debido a las restricciones regulatorias, no pudimos analizar muestras de polen de abejas con síntomas de AFB en este estudio. No obstante, creemos que nuestro método será extremadamente útil para evaluar el potencial de transmisión de AFB a través de la contaminación por *P. larvae* en muestras de polen.

El diagnóstico para la detección de Loque Americana se basa principalmente en cultivos, aislamientos y técnicas moleculares sin embargo estas requieren de mucho tiempo para su especificidad y reproductibilidad. Con la aplicación de análisis computacionales y la amplia disponibilidad de secuencias de ADN en el amplio y diverso grupo taxonómico del género *Paenibacillus*, nos permitió establecer un esquema simple y universal nos ayudó a examinar la localización de genes de RNA de transferencia (tRNA) en los genomas, una de las moléculas más conservadas en traducción y sus aplicaciones como un método de diagnóstico en la enfermedad de Loque Americana (*Paenibacillus larvae*). La especificidad de los cebadores utilizados para la identificación de *Paenibacillus larvae* no creó reacción cruzada con otras bacterias similares por lo que demostramos que este método molecular PCR- tRNA<sup>Cys</sup> es una herramienta útil para su diagnóstico reduciendo el tiempo y costo ofreciendo un diagnóstico oportuno.

## X BIBLIOGRAFÍA

**Alippi**, A. M., López, A. C., and Aguilar, O. M. (2002). Differentiation of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*.

**Alippi**, A. M., Lopez, A. C., & Aguilar, O. M. (2004). A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Letters in applied microbiology*.

**Ansari, M. J.**, Al-Ghamdia, A., Usmanib, S., Al-Wailic, N., & Nurua, A. 2015. In vitro evaluation of the effects of some plant essential oils on *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 49-55.

**Ash C**, Priest F.G., Collins M.D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64, 253-260.

**Bacher**, N. R., Zihua, Z. and Deutscher, M. P. (1997). Functional Overlap of tRNA Nucleotidyltransferase, Poly(A) Polymerase I, and Polynucleotide Phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 26: 33255-33259.

**Bárbara M.S.**, Machado C.S., Sodré G.D.S., Dias L.G., Estevinho L.M., De Carvalho C.A.L. 2015. Microbiological assessment, nutritional characterization and phenolic compounds of bee pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. *Molecules*, 20, 12525-12544.

**Bisson LF** et al. (2016) The Two Faces of *Lactobacillus kunkeei*: Wine Spoilage Agent and Bee Probiotic Catalyst: Discovery into Practice

**Campos**, J., Bralley, P., Jones, G., Bechhofer, D., and Olmedo, G. (2005). Addition of Poly(A) and Heteropolymeric 3' Ends in *Bacillus subtilis* Wild-Type and Polynucleotide Phosphorylase-Deficient Strains. *Journal of Bacteriology*. 187:4698-4706.

**Campos-Guillen**, J., Arvizu-Gomez, J. L., Jones, G. H., & Olmedo-Alvarez, G. (2010). Characterization of tRNACys processing in a conditional *Bacillus subtilis* CCase mutant reveals the participation of RNase R in its quality control. *Microbiology*, 156(7), 2102-2111.

**Chen, M.**, and A. Mikecz (2000). Specific inhibition of rRNA transcription and dynamic relocation of fibrillar protein induced by mercury. *Exp. Cell Res.* 259:225-238.

**Chopra, S.**, & Reader, J. (2014). tRNAs as antibiotic targets. *International journal of molecular sciences*.

**Dineen, S. M.**, Aranda IV, R., Anders, D. L., & Robertson, J.M. 2010. An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 1886-1896.

**Dobbelaere, W.**, De Graaf, D. C., Peeters, J. E., & Jacobs, F. J. 2001. Development of a fast and reliable method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 32(4), 363-370.

**Djukic, M.**, Brzuszkiewicz, E., Fünfhaus, A., Voss, J., Gollnow, K., Poppinga and Daniel, R. (2014). How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS One*.

**Djordjevic S**, Ho-Shon M, Hornitzky M (1994) DNA restriction endonuclease profiles and typing of geographically diverse isolates of *Bacillus larvae* *Journal of Apicultural Research* 33:95-103 doi:10.1080/00218839.1994.11100856

**De Graaf, D. C.**, Alippi, A. M., Brown, M., Evans, J. D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., & Tomkies, V. (2006). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in applied microbiology*.

**Dubrovsky, E.D.**; Dubrovskaya, V.A.; Levinger, L.; Schiffer, S.; & Marchfelder, A. (2004) *Drosophila* Rnase Z processes mitochondrial and nuclear pre-tRNA 3' ends in vivo. *Nucleic Acids Research*. 32(1), 255-262.

**Ebeling, J.**, Knispel, H., Hertlein, G., Fünfhaus, A., & Genersch, E. (2016). Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied microbiology and biotechnology*.

**Fernández E. E.** 2008. Microbiología e Inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. 915 p.

**Forsgren E**, Olofsson TC, Váasquez A, Fries I (2010) Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae *Apidologie* 41:99-108 doi:10.1051/apido/2009065

**Fünfhaus**, A., Göbel, J., Ebeling, J., Knispel, H., Garcia-Gonzalez, E., & Genersch, E. (2018). Swarming motility and biofilm formation of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific reports*, 8(1), 8840.

**Genersch**, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus* larvae. *Journal of invertebrate pathology*.

**Genersch E**. 2009. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate*, 103, 10-19.

**Genersch E.**, Forsgren E., Pentikainen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. 2006. Reclassification of *Paenibacillus* larvae subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus* larvae subsp. larvae as *Paenibacillus* larvae without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 56, 501-511.

**Good**, A. P., Gauthier, M. P. L., Vannette, R. L., & Fukami, T. (2014). Honey bees avoid nectar colonized by three bacterial species, but not by a yeast species, isolated from the bee gut. *PLoS One*, 9(1), e86494.

**Grady**, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z. C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial cell factories*, 15(1), 203.

**Graystock P.**, Yates K., Darvill B., Goulson D., Hughes W.O.H. 2013. Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114, 114-119.

**Haydak**, M.H. 1958. Pollen - pollen substitutes - beebread. *American Bee Journal*, 98, 145–146.

**Heyndrickx M.**, Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., Logan N.A., Ali N., Berkeley R.C. 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984). Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) larvae (White

**INEGI** 2007. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal.

**Levinger, L.;** Oestreich, I.; Florentz, C.; & Mörl, M. (2004) A Pathogenesis-associated Mutation in Human Mitochondrial tRNA Leu(UUR) Leads to Reduced 3'-End Processing and CCA Addition. *J.Mol.Biol.*, 337,535-544.

**Mac Faddin.** 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana, tercera edición.

**Medina F. C. A.** 2014. Principales enfermedades que afectan a las abejas melíferas (*Apis mellifera*). Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Zacatecas "Francisco García Salinas". 27 p.

**Método para la identificación de MALDI TOF-MS Biotyper®.** Disponible en: endotoxin and microbial detection ([www.criver.com/accugenix](http://www.criver.com/accugenix)).

**Morrissey, B. J.,** Helgason, T., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Genersch, E., & Budge, G. E. (2015). Biogeography of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environmental microbiology*.

**Schäfer, M. O.,** Genersch, E., Fünfhaus, A., Poppinga, L., Formella, N., Bettin, B., & Karger, A. 2014. Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI TOF mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, 170(3), 291-297.

**Shepherd, J., & Ibba, M.** (2015). Bacterial transfer RNAs. *FEMS microbiology reviews*

**Schild, H. A.,** Fuchs, S. W., Bode, H. B., & Grünwald, B. (2014). Low-molecular-weight metabolites secreted by *Paenibacillus* larvae as potential virulence factors of american foulbrood. *Applied and environmental microbiology*.

**SAGARPA** 2015. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

**OIE** organización Internacional de la Salud Animal. Código Sanitario para los Animales. 2008

**Poppinga, L.,** and Genersch, E. (2015). Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus* larvae kills honey bee larvae. *Current Opinion in Insect Science*.

**Poppinga**, L., Janesch, B., Fünfhaus, A., Sekot, G., Garcia-Gonzalez, E., Hertlein, G., & Genersch, E. (2012). Identification and functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. *PLoS Pathog.*

**Reuven**, N., Zhou, Z. and Deutscher, M. (1997). Functional Overlap of tRNA Nucleotidyltransferase, Poly (A) Polymerase I, and Polynucleotide Phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 33255-33259.

**Riessberger-Galle**, U., Von Der Ohe, W., & Crailsheim, K. (2001). Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae* larvae, the causative agent of the American foulbrood. *Journal of invertebrate pathology*.

**Torres-Ruiz**, A., Jones, R. W., & Barajas, R. A. (2013). Present and Potential use of Bees as Managed Pollinators in Mexico<sup>1</sup>. *Southwestern Entomologist*, 38(1), 133-148.

**Yost**, D. G., Tsourkas, P., & Amy, P. S. (2016). Experimental bacteriophage treatment of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood Disease. *Bacteriophage*, 6(1), e1122698.

Veening, J. W., Smits, W. K., Hamoen, L. W., & Kuipers, O. P. 2006. Single cell analysis of gene expression patterns of competence development and initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* grown on chemically defined media. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 531-541.

**Wang**, L., Jin, Y., Zhao, L., Pang, X., & Zhang, X. (2009). ERIC-PCR-based strain-specific detection of phenol-degrading bacteria in activated sludge of wastewater treatment systems. *Letters in applied microbiology*.