



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS LA VIDA
Y LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Nosema* sp. MEDIANTE PCR
DÚPLEX EN ABEJAS SIN AGUIJÓN (HYMENOPTERA: MELIPONINI)
DE LAS PROVINCIAS DE ORELLANA Y LOJA – ECUADOR”**

AUTOR: GUAITA GAVILANES, MARÍA GABRIELA

DIRECTOR: Dr. RON ROMÁN, JORGE WASHINGTON Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, *“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE Nosema sp. MEDIANTE PCR DÚPLEX EN ABEJAS SIN AGUIJÓN (HYMENOPTERA: MELIPONINI) DE LAS PROVINCIAS DE ORELLANA Y LOJA – ECUADOR”* fue realizado por la señorita *Guaita Gavilanes, María Gabriela* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 12 de agosto del 2019

Dr. Ron Román, Jorge Washington Ph.D.

C.C: 1709505125



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Guaita Gavilanes, María Gabriela*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación “*Determinación de la presencia y caracterización molecular de Nosema sp. mediante PCR dúplex en abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) de las provincias de Orellana y Loja – Ecuador*” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetado los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 12 de agosto del 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'María Gabriela Guaita Gavilanes', is written over a horizontal dashed line.

María Gabriela Guaita Gavilanes

C.C: 1722381165



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

*Yo, **Guaita Gavilanes, María Gabriela** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación “**Determinación de la presencia y caracterización molecular de Nosema sp. mediante PCR dúplex en abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) de las provincias de Orellana y Loja – Ecuador**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.*

Sangolquí, 12 de agosto del 2019

María Gabriela Guaita Gavilanes

C.C: 1722381165

DEDICATORIA



*“Cordón de seis dobleces,
no se rompe fácilmente”*

AGRADECIMIENTOS

A Oswaldo y Leticia mis padres, quienes me educaron en el seno de un hogar al servicio de Dios, les agradezco por el apoyo en mis locuras y por ser un ejemplo de trabajo, de lucha y de perseverancia. A Eve, Mela y Dome mis hermanas, gracias por soportarme y enseñarme lecciones de vida.

Al Dr. Jorge Ron mi director de tesis, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por la ayuda brindada, por los momentos de enseñanza, de enojo, de alegría (H.C.) y de locura (C.S.).

A la Dra. Sarah Martin mi coodirectora de tesis, gracias por la guía, los consejos, el tiempo y la ayuda, que sin ella este trabajo no habría sido posible.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biotecnología Animal y Laboratorio de Inmunología y Virología, gracias por su ayuda y las risas que compartimos en el pasillo.

A todos mis amigos y amigas en especial a Susy, Luisita, Karly y Jesi les agradezco por viajar junto a mí en este viaje de locura “la vida universitaria”, por su amistad sincera, apoyo incondicional, reprensiones justas, y la compañía en los momentos difíciles personales y académicos.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTADO DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos de la investigación	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO II.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Tribu Meliponini	5
2.1.1 Generalidades	5
2.1.2 Clasificación taxonómica	6
2.1.3 Origen y distribución.....	7
2.1.4 Plagas y enfermedades	9
2.2 Género <i>Nosema</i>	10
2.2.1 Generalidades	10
2.2.2 Clasificación taxonómica	11

2.2.3	<i>Nosema apis</i>	11
2.2.4	<i>Nosema ceranae</i>	12
2.2.5	Ciclo biológico de <i>Nosema</i> spp.	12
2.3	La nosemosis	14
2.3.1	Generalidades	14
2.3.2	Síntomas y efectos.....	14
2.3.3	Transmisión de la enfermedad	16
2.3.4	Control, tratamiento y prevención.....	17
2.3.5	Técnicas de diagnóstico	17
2.3.5.1	Microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (TEM)	18
2.3.5.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
2.4	Factores de riesgo.....	19
2.5	Sistema de hipótesis	20
CAPÍTULO III		21
MATERIALES Y MÉTODOS.....		21
3.1	Fase de campo	21
3.1.1	Zonas de estudio.....	21
3.1.2	Estimación del tamaño muestral	21
3.1.3	Levantamiento de información base	22
3.1.4	Muestreo.....	23
3.2.1.1	Aplicación de encuestas técnico – sociales.....	23
3.2.1.2	Geo- referenciación y registro de nidos	23
3.2.1.3	Colecta de muestras	23
3.3	Fase de laboratorio	24
3.3.1	Extracción de ADN	24
3.3.2	PCR dúplex	25
3.3.3	Análisis filogenético.....	27
3.4	Análisis estadístico.....	28
3.4.1	Estadística descriptiva	28
3.4.2	Estadística analítica	28

3.4.2.1	Prevalencia	28
3.4.2.2	Factores de riesgo	28
CAPÍTULO IV		30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		30
4.1	Distribución de muestras de trabajo	30
4.1.1	Distribución de meliponarios	30
4.1.2	Distribución de nidos	30
4.2	Prevalencia de <i>Nosema</i> spp.	32
4.3	Caracterización de <i>Nosema</i> sp.....	38
4.3.1	Análisis molecular.....	38
4.3.2	Análisis filogenético.....	39
4.4	Determinación de los factores de riesgo	43
CAPÍTULO V		46
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		46
5.1	Conclusiones	46
5.2	Recomendaciones.....	47
CAPÍTULO VI		48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Efectos negativos de la nosemosis en abejas melíferas.</i>	16
Tabla 2 <i>Tamaño muestral óptimo de meliponarios.</i>	22
Tabla 3 <i>Detalle del conjunto de primers.</i>	26
Tabla 4 <i>Condiciones de reacción para la PCR dúplex.</i>	26
Tabla 5 <i>Condiciones de reacción para la PCR simple.</i>	27
Tabla 6 <i>Prevalencia general de Nosema spp. determinada en abejas sin aguijón.</i>	32
Tabla 7 <i>Comparación de prevalencia de Nosema spp. en varios géneros de abejas sin aguijón.</i>	33
Tabla 8 <i>Comparación de la prevalencia de Nosema spp. en abejas melíferas.</i>	35
Tabla 9 <i>Detalle de las secuencias obtenidas del GenBank.</i>	40
Tabla 10 <i>Variables de análisis como posibles factores de riesgo.</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de distribución de las abejas sin aguijón.	8
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Nosema</i> spp.	13
Figura 3. Ubicación geográfica de los nidos positivos en Orellana – Ecuador.....	33
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR convencional.	38
Figura 5. Árbol filogenético de <i>Nosema</i> spp. basado en un fragmento del gen RPB1.	41

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN = Ácido desoxiribonucleico

ARN = Ácido ribonucleico

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

RPB1 = subunidad más grande de la ARN polimerasa II

dNTPs = Desoxiribonucleótidos trifosfato

g = Fuerza centrífuga relativa o fuerza g (RCF)

C+ = Control positivo

C- = Control negativo

M = Marcador molecular

pb = pares de bases

ug = microgramos

mL = mililitros

N. apis = *Nosema apis*

N. ceranae = *Nosema ceranae*

spp. = Especies

sp. = Especie desconocida

SNPs = Polimorfismo de un solo nucleótido

RESUMEN

Especies pertenecientes al género *Nosema* (*Nosema apis* y *Nosema ceranae*) infectan a abejas melíferas, abejorros, y recientemente a abejas sin aguijón; cuyo rol en la polinización de flora silvestre y cultivos de relevancia económica es de gran importancia. Por su consecuencia en las abejas sin aguijón, la presencia de los microsporidios ha llamado la atención tanto a nivel económico como de conservación. Por ello nuestro estudio pretende determinar la presencia y prevalencia, además de la caracterización molecular de *Nosema* sp. en abejas sin aguijón de Ecuador. Desde Agosto 2018 a Marzo 2019, se realizaron salidas de campo (sc) para la recolección de un pool de muestras de abejas sin aguijón adultas por nido (n_i), de meliponarios (M) visitados en distintas comunidades (c) de la provincia de Orellana (Amazonía) (sc = 3, n_i = 34, M = 6, c = 2) y de Loja (Sierra sur) (sc = 2, n_i = 48, M = 20, c = 14). Por primera vez, se detectó *Nosema apis* en abejas sin aguijón de Ecuador con una prevalencia del 4.88% (n_i = 4/82). Los géneros de abejas sin aguijón positivos a *Nosema apis* fueron *Tetragonisca* 25% (n_i = 2/8) y *Scaptotrigona* 25% (n_i = 2/8) de la provincia de Orellana. Con el análisis filogenético basado en la secuencia del gen RPB1 (297 pb) se confirmó la correspondencia de las muestras positivas del estudio con la especie *Nosema apis*. Los factores de riesgo implicados en la presencia de *N. apis* fueron la humedad y los géneros estudiados. Así, este es el primer estudio que indica la presencia *Nosema apis* en abejas sin aguijón de Ecuador y de Sudamérica, alertando no solo de las posibles pérdidas económicas; sino y principalmente, sobre las repercusiones en la conservación de abejas sin aguijón.

PALABRAS CLAVE:

- **ABEJAS SIN AGUIJÓN**
- *Nosema apis*
- **PCR DÚPLEX**
- **GEN RPB1**
- **PREVALENCIA**

ABSTRACT

Species of genus *Nosema* (*N. apis* and *N. ceranae*) infect honey bees, bumblebees, and recently stingless bees; whose role in the pollination of wild flora and crops of economic relevance is of great importance. Because of its consequence in stingless bees, the presence of microsporidia has attracted attention both economically and in conservation. Thus, our study aims to determine the presence and prevalence, in addition to the molecular characterization of *Nosema* sp. in stingless bees from Ecuador. From August 2018 to March 2019, field trips (sc) were made for the collection of a pool of samples of adult stingless bees by nest (n_i), of meliponarios (M) visited in different communities (c) of the province of Orellana (Amazon) (sc = 3, n_i = 34, M = 6, c = 2) and Loja (Southern Sierra) (sc = 2, n_i = 48, M = 20, c = 14). For the first time, *N. apis* was detected in stingless bees from Ecuador with a prevalence of 4.88% (n_i = 4/82). The genus of stingless bees positive to *N. apis* were *Tetragonisca* 25% (n_i = 2/8) and *Scaptotrigone* 25% (n_i = 2/8) from the province of Orellana. With the phylogenetic analysis based on the sequence of the RPB1 gene (297 bp), the correspondence of the positive samples of the study with the *N. apis* species was confirmed. The risk factors involved in the presence of *N. apis* were humidity and the genera studied. Thus, this is the first study that indicates the presence of *N. apis* in stingless bees from Ecuador and South America, not only warning of possible economic losses; but and mainly, on the impact on the conservation of stingless bees.

KEY WORDS:

- **STINGLESS BEE**
- *Nosema apis*
- **DÚPLEX PCR**
- **PREVALENCE**
- **RPB1 GENE**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Las abejas sin aguijón, meliponas o nativas son un grupo de insectos eusociales distribuidos en las zonas tropicales (Schwarz, 1948) y subtropicales del mundo (Heard, 1999; Michener, 2007). En Ecuador, se distribuyen en la región litoral, sur-interandina y amazónica (Ramírez, Ureña, & Camacho, 2012; Ramírez, 2016).

Las abejas nativas cumplen una función de vital importancia, al ser polinizadores generalistas de la flora silvestre en el ecosistema del trópico (Hurtado Burillo, 2015). De igual manera, su rol en la polinización de cultivos es de relevancia económica, como el café (Heard, 1999), el tomate (Del Sarto, Peruquetti, & Campos, 2005; Slaa, Sánchez, Malagodi-Braga, & Hofstede, 2006), y la frutilla (Asiko, 2012; Brosi, 2009; Heard, 1999), representando un total del 60% de los cultivos tropicales. Así, la polinización mediada por estas abejas contribuye anualmente con miles de millones de dólares a la economía mundial (Brosi, 2009); ya que, con una eficiente explotación de recursos florales, y sus altas densidades poblacionales, son los actores principales del ciclo nutritivo en los cultivos (Roubik, 1989).

Sin embargo, se ha indicado un declive global de la población de polinizadores como, las abejas melíferas (Goulson, Nicholls, Botías, & Rotheray, 2015), los abejorros (Potts et al., 2010) y las abejas nativas (González-Varo et al., 2013), a consecuencia de los procesos de degradación

ambiental, que no solo provocan una vulnerabilidad de especies, sino de la biodiversidad en general (Freitas et al., 2009; Potts et al., 2010; Reyes-González et al., 2017).

Unos de estos procesos es la pérdida de bosques (Freitas et al., 2009; Potts et al., 2010); siendo una gran amenaza para las abejas nativas (Brosi, Daily, Shih, Oviedo, & Durán, 2007), pues sus nidos se localizan en cavidades de troncos de árboles y/o a nivel subterráneo (Brosi et al., 2007; Freitas et al., 2009). También, las abejas melíferas disminuyen sus defensas por la exposición a productos químicos y así se facilita el ataque por diferentes parásitos (Pettis, VanEngelsdorp, Johnson, & Dively, 2012; Wu, Smart, Anelli, & Sheppard, 2012). La introducción de especies como la abeja melífera es otra amenaza, por un lado, genera una competencia por los recursos alimenticios (Hurtado Burillo, 2015), y por otro, como se ha venido observando (Colla, Otterstatter, Gegear, & Thomson, 2006; McArt, Koch, Irwin, & Adler, 2014), al interactuar entre especies se pueden obtener resultados perjudiciales, como por ejemplo, durante el uso de recursos florales (forrajeo) presentan un contacto físico unas con otras (Ramalho, 1990), siendo así una fuente de introducción (Porrini et al., 2017), dispersión y transmisión de agentes causales de enfermedades relevantes a nivel económico y de biodiversidad (McArt et al., 2014).

La nosemosis, es un claro ejemplo de estas enfermedades. Es una infección fúngica de las abejas melíferas cuyos agentes causales son los microsporidios del género *Nosema*, siendo *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Charbonneau, Hillier, Rogers, Williams, & Shutler, 2016; Nogueira Neto, 1997). Esta enfermedad produce la degeneración del epitelio intestinal del huésped (Rangel et al., 2016), problemas digestivos graves (Higes, Martín, & Meana, 2006; Pacheco, 2008) e incluso la muerte (Nunes-Silva, Piot, Meeus, Blochtein, & Smagghe, 2016; Rangel et al., 2016; Rasmussen & Cameron, 2007; Ravoet et al., 2014).

.....Estudios evidencian una preocupación a nivel global, con la detección de un incremento de infecciones causadas por *Nosema* spp. en los polinizadores, tales como las abejas melíferas (Charbonneau et al., 2016; Gisder et al., 2010; Gómez-Moracho, 2015; Klee et al., 2007), abejorros nativos (González-Varo et al., 2013; Goulson et al., 2015), y recientemente en avispas y abejas sin aguijón (Porrini et al., 2017). En Ecuador, se ha indicado la presencia de *Nosema* spp. en abejas melíferas (Fuentes Hidalgo, 2017; Ortega –ojeda & Vivas Espinoza, 2015). Y un informe reciente en tres provincias del norte de Ecuador, evidencia por primera vez la presencia de *Nosema ceranae* en las abejas melíferas (Sandoval, 2018).

1.2 Justificación del problema

El Ecuador al ser un país mega-diverso, cuenta con una vasta población de polinizadores (conocidos y no) (Reyes Sánchez, 2016), de estos las abejas sin aguijón vienen siendo estudiadas en cuanto a la distribución y diversidad de especies (Coloma, 1986; García-Olivares et al., 2015; Ramirez et al., 2012), así como la caracterización de la miel de abejas sin aguijón y la comercialización de esta (Arana Rodríguez & Beltrán Apolo, 2015; Ramírez, 2016; Vit, Vargas, López, & Valle, 2015). Por el contrario, estudios sobre enfermedades en las abejas sin aguijón son escasos en comparación con los realizados en abejas melíferas, siendo la nosemosis una de las más estudiadas en estas abejas (Alvarez-López, 2016; Fuentes Hidalgo, 2017; Maldonado Yaguana, 2018; Sandoval Morejón, 2018; Vivas Espinosa, 2015). No obstante, en las abejas sin aguijón se desconoce en gran parte y porque no decirlo en su totalidad los resultados negativos provocados por la nosemosis (Agüero et al., 2018; Porrini et al., 2017), perfilándose de este modo como, un modelo clave en el análisis de la dispersión de patógenos entre especies y sus consecuencias (Rose, 1996; É. W. Teixeira et al., 2018).

Además, considerando el gran impacto que tiene la nosemosis en la salud (el estado sanitario) de los miembros de la Familia Apidae, de los que se tiene evidencia concreta (Mantilla Salazar, 2012), surge la necesidad de una detección precisa del agente causal con un diagnóstico de laboratorio eficiente (Joost, 2013; Shimanuki, 1992), siendo los métodos moleculares recomendados por la *World Organisation for Animal Health* (OIE) al ser herramientas específicas, sensibles (OIE, 2013, 2018), modernas y confiables (Ghosh & Weiss, 2009). De este modo, se pretende aportar con información relevante a los meliponicultores y sobre todo a las autoridades de sanidad animal y biodiversidad sobre la problemática sanitaria actual de las abejas sin aguijón del país, y con ello poder establecer medidas de tratamiento, control y prevención, evitando así pérdidas de biodiversidad.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar la presencia y caracterizar molecularmente *Nosema* sp. mediante PCR dúplex en abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) de las provincias de Orellana y Loja – Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de *Nosema* sp. por provincia a nivel de meliponario y nido, a través de la aplicación de una PCR dúplex en abejas sin aguijón de las zonas de estudio.
- Caracterizar *Nosema* sp. por medio de análisis moleculares y bioinformáticos en abejas sin aguijón.
- Determinar los posibles factores de riesgo implicados en la introducción y/o mantenimiento de *Nosema* sp. en las zonas de estudio.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tribu Meliponini

2.1.1 Generalidades

Dentro del grupo de abejas corbiculadas, las abejas sin aguijón, nativas, o meliponas se caracterizan por no tener un aguijón, lo que las diferencia de las abejas melíferas (Hurtado Burillo, 2015). Las abejas sin aguijón son eusociales, es decir poseen un alto nivel de organización exhibiendo una división de trabajo, en el cuidado cooperativo de la cría y la superposición de generaciones (S. . Ramirez et al., 2010). Las colonias están formadas por una única reina madre y una población abundante de obreras (Brosi, 2009).

La arquitectura del nido así como la disposición de las celdas de la cámara de cría difiere entre especies (S. . Ramirez et al., 2010; Roubik, 2006). La ubicación puede ser a nivel subterráneo o en cavidades internas de árboles, o de troncos secos (Arnold, Zepeda, Vásquez, & Aldasoro, 2018; Baquero & Stamatti, 2007; Roubik, 2006). La entrada del nido está fabricada de materiales, como: cerumen (mezcla de cera y resina vegetal) (Arnold et al., 2018), propóleo o geopropóleo (Michener, 2007; Roubik, 2006). Y su forma varía de acuerdo al tamaño de la especie y puede incluso estar influenciada por condiciones climáticas (el nivel de exposición: sol/viento) (Franck, Cameron, Good, Rasplus, & Oldroyd, 2004). Al ingreso del nido se pueden encontrar abejas guardianas encargadas de la vigilancia, que frente a una amenaza reaccionan

diferente, por ejemplo: esconderse en el interior del nido, o reaccionar de manera agresiva (Arnold et al., 2018).

El comportamiento de las abejas sin aguijón varía por ejemplo, especies de *Meliponas* al sentir cerca a una persona, se retiran de la entrada hacia el interior del nido, presentando un comportamiento tímido y no defensivo (Roubik & Peralta, 1983). Sin embargo, especies como *Oxytrigonas* presentan un comportamiento agresivo y defensivo, ellas lanzan secreciones glandulares que contienen ácido fórmico, produciendo quemaduras en la piel (Michener, 2007). También, pueden dirigirse hacia diferentes partes de la cabeza como: el cabello, las orejas, los ojos, o incluso la boca (Roubik, 2006).

La crianza de las abejas sin aguijón se denomina Meliponicultura, la cual ha venido siendo practicada desde épocas pasadas, por indígenas y campesinos, empleando incluso colonias artificiales para facilitar su manejo (Baquero & Stamatti, 2007).

2.1.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica según la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de la tribu de abejas sin aguijón es:

Organismos celulares

Dominio: Eucariota

Reino: Metazoa

Subreino: Eumetazoa

Rama: Bilateria

Infrarreino: Protostomia

Superfilo: Ecdysozoa

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hymenoptera

Suborden: Apocrita

Superfamilia: Apoidea

Familia: Apidae

Subfamilia: Apinae

Tribu: Meliponini

La tribu Meliponini agrupa especies de carácter social perteneciente a la Subfamilia Apinae. Ésta cuenta con 19 tribus, de las cuales cuatro conforman el grupo de abejas corbiculadas, abejas que poseen una corbícula o cesta de polen en la parte anterior de la tibia en la pata trasera (Hurtado Burillo, 2015). Tales tribus son: Bombini (abejorros), Euglossini (abeja de la orquídea), Apini (abeja de miel) y Meliponini (abeja sin aguijón) (Rasmussen & Cameron, 2007).

2.1.3 Origen y distribución

Según datos paleontológicos y biogeográficos, se ha considerado que el origen de las abejas sin aguijón es en el continente africano (Amano, Nemoto, & Heard, 2000). Esta hipótesis tiene un respaldo en que, sus especies primitivas con un sistema de aguijón bien desarrollado viven exclusivamente en África (Wille, 1979). (Wille, 1979).

Las abejas sin aguijón están distribuidas en los continentes de África, Asia, Australia y América (Fig. 1), específicamente en las zonas tropicales y subtropicales (Arnold et al., 2018). En

dirección al sur, su extensión alcanza las regiones templadas (Trópico de Capricornio) y al norte se extienden poco más allá del Trópico de Cáncer (Michener, 2007).

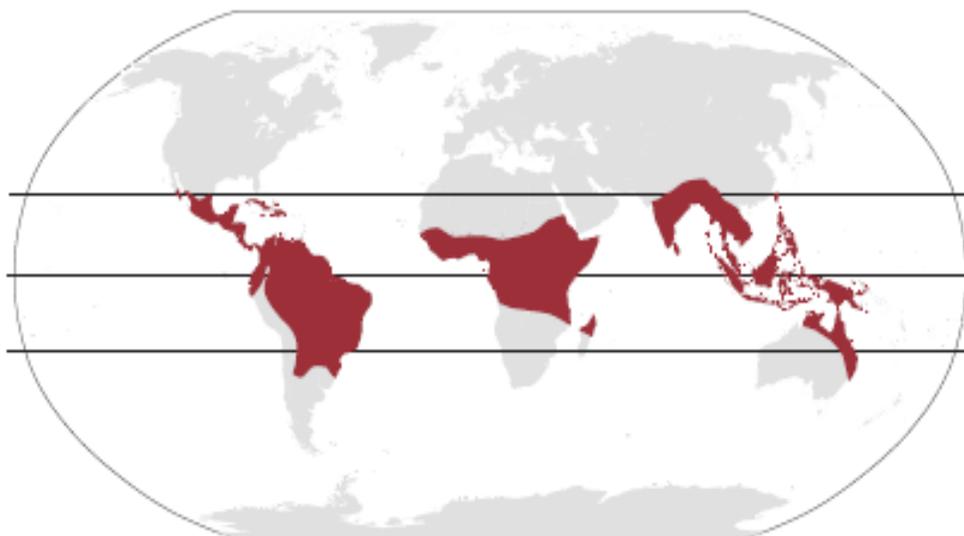


Figura 1. Áreas de distribución de las abejas sin aguijón.
Fuente: (Arnold et al., 2018).

Hasta la fecha se han descrito cerca de 500 especies (Camargo & Pedro, 2013). Solo en América central y del Sur, se conocen más de 400 especies (Amano et al., 2000; Fernández, Zambrano, & Gonzalez, 2010). Donde, la mayoría de abejas habitan en bosques húmedos, concentrando su diversidad en la cuenca del río Amazonas (S. . Ramirez et al., 2010). En Brasil, existe un registro de 244 especies válidas, y cerca de 89 formas no descritas (datos aún no publicados), pertenecientes a 29 géneros (Camargo & Pedro, 2013; Pedro, 2014). En Ecuador, los estudios referentes a la diversidad de abejas sin aguijón son escasos y no se ha podido estimar un valor real de esta población, pero se cree que debe ser elevada por los distintos ecosistemas. Por otro lado, (Coloma, 1986) reportó para el Ecuador 73 especies, (J. A. Ramirez et al., 2012) reportó cerca de 90 especies en el sur del país.

2.1.4 Plagas y enfermedades

Antiguamente, casi nada se sabía sobre las enfermedades que podían afectar a las abejas sin aguijón (Schwarz, 1948). Luego, mencionan que estas abejas son más resistentes a las enfermedades y parásitos que afectan normalmente a las abejas melíferas (Delfinado-Baker, Baker, & Phoon, 1989). Y eventualmente, se comenzaron a describir algunas plagas de insectos y ácaros que atacan a los nidos de las abejas (Baquero & Stamatti, 2007; Nogueira Neto, 1997), por ejemplo:

- A. Fóridos (*Pseudohyocera kerteszi*):** Son moscas de tamaño reducido, que son atraídas por el olor del polen de un nido. Al ingresar, colocan sus huevos en potes de alimento abiertos o celdas de cría (Baquero & Stamatti, 2007). El fórido puede llegar a destruir totalmente la cría de una colonia de abejas provocando la pérdida de esta (Brown, 1993).
- B. Abejas ladronas (*Lestrimelitta* sp.):** Abeja limón, llamada así por el fuerte olor que emanan las obreras al momento de un ataque. Son abejas pequeñas, de color negro brillante, la entrada del nido es tubular en forma de cuernos que cuelgan (Baquero & Stamatti, 2007).
- C. Hormigas:** Es un insecto que puede atacar un nido, provocando el desalojo de una colonia de abejas (Baquero & Stamatti, 2007).
- D. Ácaros:** Los ácaros *Pyemotes* son parásitos de insectos, como las abejas melíferas (Chmielewski, 1991) y de abejas sin aguijón (Nogueira Neto, 1997). Son vivíparos, las hembras se fijan a los hospederos (generalmente larvas o pupas), les inyectan una toxina; como resultado, quedan paralizados y mueren (Macías-Macías & Otero-Colina, 2004). Después de una infestación, se tiene un desastre total; siendo un peligro potencial para insectos que viven en nidos cerrados, como las abejas (Macías-Macías & Otero-Colina, 2004).

Por otro lado, se conoce que patógenos de las abejas melíferas pueden atacar a otros miembros de la familia Apidae, como los abejorros (Plischuk et al., 2009), las avispas y las abejas sin aguijón (Nogueira Neto, 1997; Nunes-Silva et al., 2016; Porrini et al., 2017).

Estudios (Garrido-Bailón et al., 2012; Nogueira Neto, 1997; Porrini et al., 2017) indican que, uno de estos parásitos son los microsporidios del género *Nosema*.

2.2 Género *Nosema*

2.2.1 Generalidades

El género *Nosema* pertenece al grupo de los microsporidios eucariotes unicelulares (Tsai, Lo, Soichi, & Wang, 2003). Los microsporidios son parásitos intracelulares obligados del reino Fungi (Sinpoo, Paxton, Disayathanoowat, Krongdang, & Chantawannakul, 2018; Tsai et al., 2003), formadores de esporas, con una amplia variedad de hospedadores, desde invertebrados (Tsai et al., 2003) hasta vertebrados (Cruz Choappa & Cruz Choappa, 2018; Didier, 2005). Las especies de *Nosema* generalmente infectan a invertebrados, como Amphipoda (Terry et al., 1999), Orthoptera (Terry et al., 1999), Lepidoptera (Tsai et al., 2003) e Hymenoptera (Fries, Feng, da Silva, Slemenda, & Pieniazek, 1996; Higes, García-Palencia, Martín-Hernández, & Meana, 2007; Higes, Martín-Hernández, Botías, et al., 2008; Joost, 2013). Dentro de las características del género *Nosema* están, la carencia de orgánulos como: el aparato de Golgi, los peroxisomas y las mitocondrias (en su lugar; están los mitosomas) (Martín-Hernández et al., 2012; Vávra, 1976), y la presencia de ribosomas (coeficiente de sedimentación 70S) (Weber, Bryan, Schwartz, & Owen, 1994). El genoma de los microsporidios, en cuanto al tamaño es reducido y compacto, posiblemente conservaron genes involucrados en la codificación proteica para la obtención de nutrientes del hospedador y no para la síntesis metabólica (Nakjang et al., 2013).

Por otro lado, las especies del género *Nosema* que producen una gran afectación económica son: *Nosema bombycis* Naegeli (Parasita el gusano de seda (*Bombyx mori* L.) (Gómez-Moracho, 2015)) y *Nosema apis* Zander y *Nosema ceranae* Fries (Parasitan las abejas de la miel (*Apis mellifera* L. y *Apis cerana* Fab.) (Higes, Martín-Hernández, Botías, et al., 2008)).

2.2.2 Clasificación taxonómica

Según la base de datos del NCBI, la clasificación taxonómica de las especies de *Nosema* es:

Organismos celulares

Dominio: Eucariota

Reino: Fungi

Filo: Microsporidia

Suborden: Apansporoblastina

Familia: Nosematidae

Género: *Nosema*

Especie: *Nosema apis*, *Nosema ceranae*

2.2.3 *Nosema apis*

Nosema apis descrita hace más de cien años (Higes et al., 2007), es un parásito específico e histórico de las abejas melíferas (*Apis mellifera*). Su ciclo de vida se completa en 3 a 4 días. Las esporas son cuerpos ovoides de 4 a 6 μm y 2 a 4 μm de largo y ancho respectivamente. En general, no se considera muy virulenta, pero se cree que provoca una pandemia. Disminuye la vida de las obreras y debilita las colonias altamente infectadas, causando un daño económico significativo (Klee et al., 2007).

2.2.4 *Nosema ceranae*

En 1994 en Beijing-China, fue detectado *Nosema ceranae* en una abeja melífera de Asia (*Apis cerana*). Las esporas son levemente más pequeñas que las de *N. apis* siendo cuerpos ovales de 4 a 7 μm y 2 a 7 μm de largo y ancho cuando están vivas. Por morfología, es similar a *N. apis*, sin embargo difieren a nivel genómico y de hospedero. *N. ceranae* puede infectar algunas especies de polinizadores de los géneros *Apis* (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. florea*, *A. kochevnikovi* o *A. dorsata*) y *Bombus* (Gómez-Moracho, 2015). A pesar de las coinfecciones *N. ceranae* se ha convertido en la especie dominante en muchas regiones del mundo, lo que sugiere que puede ser un mejor competidor que *N. apis* (Charbonneau et al., 2016). Y además, se ha demostrado que *N. ceranae* es mucho más virulenta que *N. apis* (Klee et al., 2007).

2.2.5 Ciclo biológico de *Nosema* spp.

El ciclo biológico de los microsporidios es similar en el grupo de abejas (Fig. 2). Como primer paso está la ingesta de esporas, seguido, estas germinan favorecidas por las condiciones físico-químicas del ventrículo luego de 10 minutos de su ingreso, infectando de manera específica las células epiteliales aprovechando su elevada actividad metabólica (Fries et al., 1996; Gómez-Moracho, 2015). Mediante la acumulación de presión en la espora, el filamento polar hueco emerge y penetra en la pared de la célula epitelial, permitiendo que el esporoplasma (con sus dos núcleos) ingrese a la célula para madurar y convertirse en meronte (célula madre). Posterior a la infección (24 horas), los merontes realizan divisiones nucleares y citocinesis para ser merozoitos. Luego, estos con divisiones sucesivas maduran a esporontos (poseen material denso depositado externamente sobre la membrana plasmática) y con una última división se transforman en dos esporoblastos (esporas inmaduras) (Fries, 1993; Gómez-Moracho, 2015).

Finalmente, las esporas salen por medio de las heces de la abeja, generando una nueva fuente de infección por las actividades de limpieza y alimentación de las colonias (Chen et al., 2009).

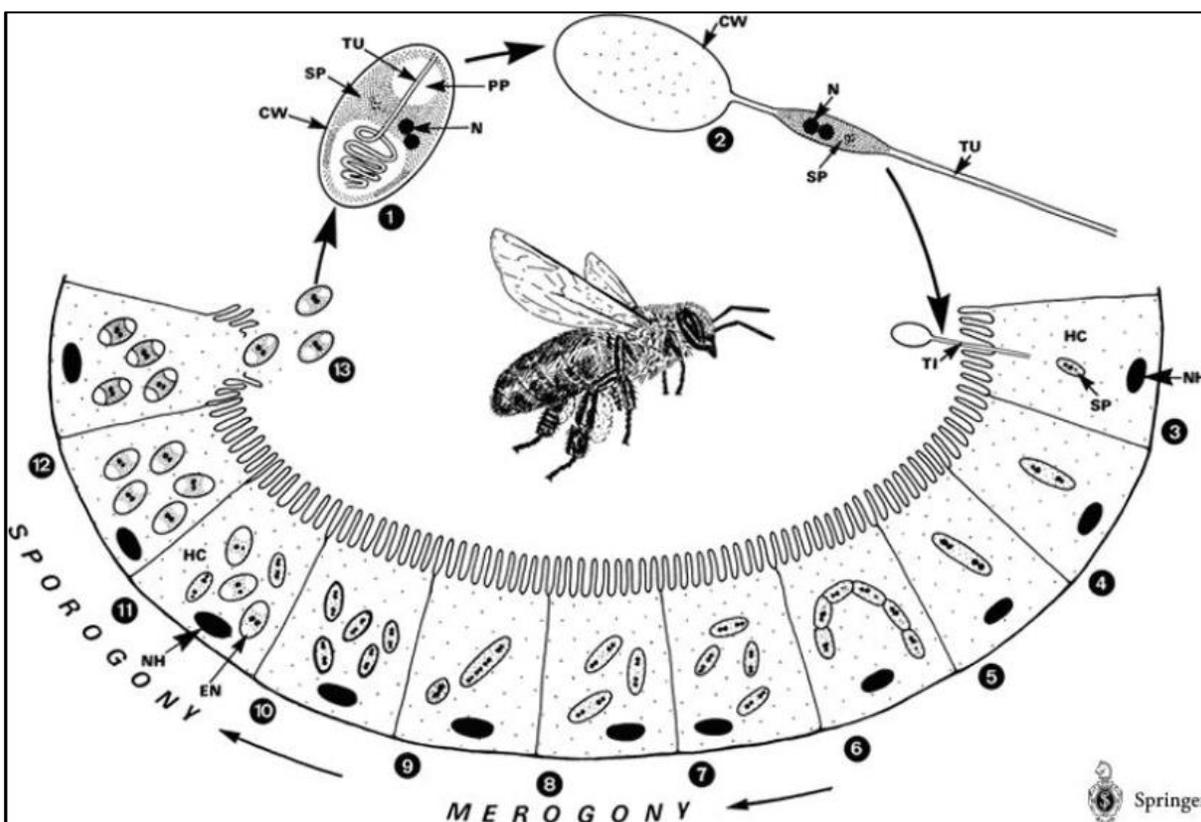


Figura 2. Ciclo biológico de *Nosema* spp.
Fuente: Springer Life Sciences.

El tiempo que toma en completar el ciclo de desarrollo de los microsporidios, desde su ingesta hasta la expulsión es de 48 a 60 horas (Fries, 1993). Se ha demostrado que, dentro de dos semanas posteriores a la infección inicial es posible encontrar dentro del intestino medio entre 30 a 50 millones de esporas.

2.3 La nosemosis

2.3.1 Generalidades

La nosemosis es una grave enfermedad de las abejas melíferas en estado adulto (Rangel et al., 2016). Tradicionalmente, la nosemosis tipo A hace referencia a la infección de *N. apis* en *Apis mellífera*, pero con la aparición de *N. ceranae* en este hospedador se propuso la nosemosis tipo C (Gómez-Moracho, 2015). En la aparición de la enfermedad, el potencial biótico de *N. apis* y *N. ceranae* juega un rol importante. En el caso de nosemosis de tipo A, la proliferación se da en temperaturas moderadas y una susceptibilidad a valores elevados, explicando así su prevalencia en áreas templadas y neotropicales mayor y menor respectivamente (Gómez-Moracho, 2015). Por otro lado, en el caso de la nosemosis de tipo C tiene la capacidad de un desarrollo a distintas temperaturas, logrando de esta manera, una infección en todo el año (Martín-Hernández et al., 2012), provocando una falta de patrón estacional de la enfermedad (Gómez-Moracho, 2015).

2.3.2 Síntomas y efectos

El órgano de mayor afectación es el intestino o ventrículo (Rangel et al., 2016). Un órgano infectado, por lo general cambia de aspecto, ya que es lastimado lo que conlleva a una inflamación, deformaciones, flacidez, pierde su tono muscular, se torna de color blanco-lechoso, a diferencia de un órgano sano, el cual es turgente y de color verde-amarillo (Pacheco, 2008; Ravoet et al., 2014). Con frecuencia, un síntoma detectado son manchas de diarrea de color marrón oscuro con olor desagradable en el interior de la colmena (Cruz Choappa & Cruz Choappa, 2018). También, es frecuente observar abejas sin poder volar, en el suelo y en los alrededores de la colmena encontrar un número excesivamente alto de abejas muertas con gran volumen abdominal (Pacheco, 2008).

Las colonias de abejas melíferas y todos sus miembros se infectan, incluyendo, abejas obreras adultas, zánganos y reinas (Chen et al., 2009). Podemos mencionar algunos impactos negativos en la salud de la abeja como disentería (Pacheco, 2008), vidas acortadas (Suwannapong, Maksong, Seanbualuang, & Benbow, 2010), disminución de la población obrera, exceso de reinas infectadas y disminución del tamaño de la colonia (Goulson et al., 2015; Wu et al., 2012). Sin embargo, hay que diferenciar los efectos negativos que producen en las abejas cada especie de *Nosema*:

- El efecto de *N. apis* es a nivel de tejido/específico, es decir, sólo se reproduce en el intestino medio (células epiteliales), por ende la mayoría de efectos tienen relación con el deterioro y debilidad del estado nutricional (Joost, 2013).
- El efecto de *N. ceranae* involucra una respuesta del sistema inmune de la abeja melífera, puesto que en el estudio realizado por Antenúz et al., (2009), la expresión de varios genes, tales como abaecina, glucosa deshidrogenasa, himenoptaecina (péptido antimicrobiano) y vitelogenina (proteína involucrada en la reproducción y longevidad de las abejas) disminuyó significativamente.

Generalmente, en las abejas melíferas se presentan algunos efectos negativos tanto en la fisiología como en su producción (Pacheco, 2008) (Tabla 1).

Tabla 1*Efectos negativos de la nosemosis en abejas melíferas.*

A nivel de abeja	A nivel de la producción
<ul style="list-style-type: none"> • Alteración del metabolismo Con una disminución del proceso digestivo de proteínas (polen) su reserva energética es baja y reduce la longevidad de la especie. • Atrofia de las glándulas hipofaríngeas. • Anemia • Problemas con la reina Ovarios atrofiados, disminuyendo la cantidad de postura. 	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la población colmenar. • Disminución de la producción de miel. • Mayor consumo de reservas energéticas durante el invierno o periodo de encierro y baja cantidad para el siguiente periodo estacional. • Producción nula de jalea real, como consecuencia no se produce reinas de buena calidad o larvas saludables

2.3.3 Transmisión de la enfermedad

La vía principal de transmisión de la nosemosis, de abeja a abeja es fecal-oral (Rangel et al., 2016), mediante la ingesta de alimentos y agua contaminada con las esporas, de igual manera por las tareas de limpieza o profilaxis (Fries, 1993; Gómez-Moracho, 2015; OIE, 2013). También, la contaminación fecal tanto de la cera como de los panales para el crecimiento de la cría, y de otras superficies de la colmena, llegan a ser un inóculo suficiente para que la enfermedad se transmita a la próxima generación de abejas (OIE, 2013, 2018). Por otro lado, se ha informado de otras fuentes de transmisión de esporas de especies de *Nosema*, como por ejemplo, la detección de esporas de *N. ceranae* en canastas de polen, las cuales mostraron una infectividad luego de una infección artificial de abejas adultas libres de *Nosema* (Higes, Martín-Hernández, Garrido-Bailón, García-Palencia, & Meana, 2008).

Un aspecto importante es la viabilidad de las esporas, en las heces pueden estar viables por un periodo de entre uno a tres años, incluso las esporas pueden permanecer infectivas cerca de cuatro meses al estar inmersas en la miel de producción; no obstante, disminuyen su viabilidad luego de tres días al estar a la temperatura de la colmena; en cambio, en el suelo y sombra pueden permanecer por dos meses y en los cadáveres de abejas infectadas por 20 días (OIE, 2013, 2018).

2.3.4 Control, tratamiento y prevención

El control de la enfermedad debe orientarse a la erradicación del agente causal, *Nosema* spp. y los factores contribuyentes a su desarrollo (Pacheco, 2008). La inactivación de las esporas partiendo del material infectado de la colmena; es decir la superficie y los panales, puede ser mediante temperatura a 65°C por 15 minutos o con químicos como ácido acético (OIE, 2013, 2018). El tratamiento con empleo de químicos es poco recomendable por la prohibición de su uso en varios países, además de la afectación a la salud de las abejas como la fumagilina (Giannini et al., 2015; Pettis et al., 2012; Potts et al., 2010). Actualmente, está en investigación nuevos compuestos de origen vegetal como alternativas de control, Maistrello et al., (2008) mostró en su estudio que abejas alimentadas con timol y resveratrol (fitoalexina de uvas), presentaron tasas de infección significativamente bajas con respecto a colmenas sin tratar.

La prevención de la enfermedad involucra buenas prácticas de manejo, como el recambio anual de reinas y marcos viejos, además de un adecuado manejo higiénico de la colmena (FAO, 2018). También, se recomienda ciertas medidas de manejo como: desinfectar el material usado en cada colmena, limpiar las colmena al final del invierno, realizar exámenes de laboratorio regularmente (Joost, 2013; Pacheco, 2008).

2.3.5 Técnicas de diagnóstico

Con un diagnóstico en campo, únicamente se puede observar cambios de coloración que presenta el tubo digestivo, generándose la necesidad de un diagnóstico mediante técnicas de laboratorio (Joost, 2013). La detección de nosemosis puede ser a través de un análisis

microscópico tradicional (FAO, 2018), microscopía electrónica (Ghosh & Weiss, 2009) o métodos moleculares (Klee et al., 2007; OIE, 2013, 2018).

2.3.5.1 Microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Todos los microsporidios producen una espora resistente al medio ambiente que es capaz de liberar un filamento polar interno enrollado (tubo polar) en la célula hospedadora; este carácter es identificado por medio de TEM como diagnóstico tradicional. Sin embargo, es poco sensible, debido a la pequeña cantidad de tejido que se puede examinar y la falta de señal de amplificación (Ghosh & Weiss, 2009). La microscopía óptica como método de diagnóstico también se ha desarrollado, es más rápido y más sensible que TEM, pero se necesita personal con experiencia para una interpretación exitosa.

2.3.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las esporas de *Nosema* sp. son similares y difícilmente pueden distinguirse por microscopía óptica, por lo que a falta de características morfológicas claras para el reconocimiento de especies, requiere de técnicas que usan marcadores moleculares para facilitar el diagnóstico e identificación de microsporidios de abejas (Ghosh & Weiss, 2009).

La PCR es un ensayo enzimático (Garibyan & Avashia, 2013; Rahman, Uddin, Sultana, Moue, & Setu, 2013), basado en la amplificación de un fragmento o secuencia específica de ADN millones de veces, generando un producto de miles de copias de ADN (Garibyan & Avashia, 2013). En la reacción se emplean componentes como: la ADN polimerasa, un juego de primers (forward-reverse), los nucleótidos, el buffer de reacción, el cloruro de magnesio ($MgCl_2$) o el sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y el agua libre de nucleasas y DNAsas (De Dios, Ibarra, &

Velasquillo, 2013). La enzima clave es la ADN polimerasa, que une los nucleótidos individuales para formar el producto de PCR, estos actúan como bloques de construcción utilizados por la enzima para crear el producto de PCR (Rahman et al., 2013). Los primers son fragmentos cortos de ADN con una secuencia definida complementaria al ADN objetivo que se debe detectar y amplificar (Garibyan & Avashia, 2013). La ventaja de esta técnica es la poca cantidad de ADN que se necesita obteniendo un gran número de copias de fragmento deseado (De Dios et al., 2013). La utilidad de la técnica en diagnóstico, se evidencia por la facilidad de identificación de un organismo patógeno causante de enfermedades con una mayor probabilidad (Garibyan & Avashia, 2013; Ishmael & Stellato, 2008). La técnica de PCR proporciona un diagnóstico muy sensible para detectar la infección por microsporidios porque permite la detección del parásito a niveles muy bajos de infección y puede revelar todas las etapas de su ciclo de vida.

Existen variantes de la PCR convencional, siendo la PCR múltiplex quien brinda una mejora significativa a la técnica convencional. En el desarrollo de la variante de PCR, se realiza una incorporación múltiple y simultánea de pares de primers (Martín-Hernández et al., 2012).

2.4 Factores de riesgo

En epidemiología, riesgo hace referencia a la probabilidad de ocurrencia de una patología en una población determinada (De Almeida, Castiel, & Ayres, 2009). El término de riesgo, a su vez implica que la presencia de un factor o característica puede incrementar la probabilidad de adversas consecuencias (Pita-Fernández, Vila, Carpenente-Montero, & Montero, 1997).

Un factor de riesgo es cualquier variable, característica o circunstancia asociada al incremento de la probabilidad de padecer, desarrollar o estar expuesto a una enfermedad determinada (De Almeida et al., 2009; Pita-Fernández et al., 1997). Estos factores de riesgo pueden ser de carácter

biológico, ambiental, de comportamiento, socio-cultural, económico, entre otros. Pueden incluso aumentar el efecto aislado de cada uno de ellos produciendo un fenómeno de interacción (Pita-Fernández et al., 1997).

2.5 Sistema de hipótesis

H₀: No existe la presencia de *Nosema* sp. infectando abejas nativas en las provincias de Orellana y Loja – Ecuador.

H₁: Existe la presencia de *Nosema* sp. infectando abejas nativas en las provincias de Orellana y Loja – Ecuador.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Fase de campo

3.1.1 Zonas de estudio

La presente investigación formó parte del proyecto de sinergia “**Mejoramiento de la meliponicultura en Ecuador, a través de investigación científica aplicada, transferencia de tecnología y capacitación**”, el cual abarcó dos provincias del Ecuador, Orellana (región amazónica) y Loja (región sur interandina); las mismas que fueron contempladas como zonas de estudio en la investigación.

En el periodo de Agosto 2018 a Marzo 2019, se realizaron cinco salidas de campo a distintas comunidades ([Anexo N° 1](#)), en la provincia de **Orellana** (3 salidas, 2 comunidades) y **Loja** (2 salidas, 14 comunidades).

3.1.2 Estimación del tamaño muestral

En el desarrollo del estudio, para estimar un óptimo tamaño muestral (**n**) y que los resultados sean significativos, se consideraron algunos prerrequisitos básicos para el cálculo:

- I. **1- α** , es el nivel de confianza de la prueba y **Z** su coeficiente. La elección es arbitraria, pero generalmente el criterio más corriente es: 1- α del 95% y $Z = 1,96$.

II. **d**, es el nivel de sensibilidad en el estudio. La precisión absoluta es del 95% y un error máximo admitido de $d = 0,05$ (5%).

III. **p**, es la proporción o frecuencia esperada. En este caso es $p = 0.2$ (20%).

EC. 1, 2:

$$\mathbf{n} = \frac{Z^2 * p * (1 - p)}{d^2} \qquad \mathbf{n_o} = \frac{N * n}{N + n}$$

Aplicando los valores antes descritos en la EC. 1, se obtuvo un total de 246 meliponarios. Sin embargo, al conocer el número total estimado de meliponarios (**N**) reportados por el técnico del proyecto y un informe de capacitaciones impartidas a productores por la Dirección Provincial Agropecuaria de Loja, se calculó el número estimado de muestras reales (**n_o**) por provincia con la EC.2, obteniendo un total de **63 meliponarios** (Tabla 2).

Tabla 2

Tamaño muestral óptimo de meliponarios.

Provincia	Número total (N)	Número corregido (n_o)
Orellana	10	9
Loja	70	54
Total	80	63

En cada **meliponario (M)**, la selección de o los **nidos centinela (n_i)** (unidad epidemiológica) fue realizada por un muestreo simple al azar, procurando colectar por lo menos muestras de un nido de cada especie de abejas sin aguijón presente, y de cada nido únicamente abejas adultas.

3.1.3 Levantamiento de información base

El proyecto de sinergia contó con un técnico de Campo, quien realizó el contacto con los meliponicultores y/o representantes de asociaciones o grupos de meliponicultura para la

planificación de reuniones de trabajo. En estas reuniones, se dio a conocer el objetivo de la investigación, una breve introducción al tema y el alcance del proyecto.

Así también, se levantó la información base sobre la ubicación de meliponarios de cuyos productores presentaron interés en formar parte del proyecto. De esta manera, con la información recolectada se elaboró un cronograma de trabajo, indicando la fecha de visita a cada meliponicultor.

3.1.4 Muestreo

3.2.1.1 Aplicación de encuestas técnico – sociales

Durante la visita al meliponicultor, se aplicó una encuesta técnico - social ([Anexo N° 2](#)), con el fin de obtener una basta información para el muestreo, y además conocer sobre el estado sanitario de las abejas sin aguijón y la presencia de posibles factores de riesgo relacionados a enfermedades.

3.2.1.2 Geo- referenciación y registro de nidos

Al tener seleccionado el o los nidos a muestrear después de haber realizado la encuesta, se procedió a su geo-referenciación con ayuda del equipo Sistema de Posicionamiento Geográfico (GPS). También, se aplicó un registro ([Anexo N° 2](#)), en donde se tomaron datos de las características del nido.

3.2.1.3 Colecta de muestras

En la toma de muestras, con ayuda de una red entomológica se realizó la captura de un pool de abejas sin aguijón (número aproximado de entre 4 y 30 individuos) por nido y se colocó las

abejas en tubos cónicos de plástico de 15 mL que contenían etanol al 70%, para conservar las muestras y su uso posterior en análisis moleculares. Después, se rotularon los tubos con el código: **H1N1EM** (H: Hacienda, N: Nido, EM: Ensayo molecular) y **lugar y fecha de recolección**. Finalmente, se colocaron las muestras dentro de una hielera refrigerada hasta su transporte al laboratorio, lugar en donde, se tomaron y almacenaron todas las muestras a 4° C hasta su análisis.

3.3 Fase de laboratorio

3.3.1 Extracción de ADN

Se utilizó el kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* con su protocolo descrito en el inserto. Se adicionó 600 µl de *Nuclei Lysis Solution* fría a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contenía de 8 a 10 abdómenes de abejas (en algunos casos se tomó menos de 8 abejas). Se trituraron los abdómenes con la ayuda de un palillo estéril e incubaron a 65° C durante 30 minutos. Luego, se añadió 17.5 µl de proteinasa K de 20 mg/mL e incubó a 55° C por 3 horas con una inversión cada 30 minutos. Seguido, se añadió 3 µl de *RNase* mezclando por inversión varias veces y se incubó durante 15 minutos a 37° C. El lisado se enfrió 5 minutos antes de incubarlo a -20° C toda la noche. Después, al lisado a temperatura ambiente se agregó 200 µl de *Protein Precipitation Solution*, se agitó vigorosamente por vortex durante 20 segundos, se enfrió en hielo por 5 minutos y se centrifugó durante 4 minutos a 16.000 g. Cuidadosamente, el sobrenadante (contiene el ADN) se retiró y transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contenía 600 µl de etanol absoluto (grado molecular). Se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras blancas de ADN formen una masa visible y se centrifugó durante 1 minuto a 16.000 g. Se descartó con cuidado el sobrenadante, se agregó 600 µl de etanol al 70%, se invirtió

suavemente el tubo varias veces para lavar el ADN y se centrifugó durante 1 minuto a 16.000 g. Se aspiró el etanol y se invirtió el tubo en papel absorbente limpio para dejar secar al aire el pellet por 15 minutos. Finalmente, a la muestra de ADN se agregó entre 30 a 100 μ l de *DNA Rehydration Solution*, se incubó durante toda la noche a 4° C y se almacenó a –20° C hasta su uso posterior. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

Luego, por medio de espectrofotometría con ayuda del equipo *NanoDrop Genova Nan – Jenway (Thermo SCIENTIFIC)*, se midió la concentración en μ g/mL de las muestras de ADN obtenidas, así también la calidad y la pureza de estas mediante la relación de absorbancias 260nm/280nm, cuyo valor óptimo se encuentra entre 1.6 – 2 indicando una calidad aceptable para ADN (Buckingham, 2012). Además, la integridad del ADN se observó a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TBE 1X durante 1h a 120V, y su revelado por medio del Fotodocumentador *Bio Rad ChemiDoc™ XRS*.

3.3.2 PCR dúplex

Para detectar la presencia de *Nosema* sp., se utilizaron los pares de primers indicados en la Tabla 3, en conjunto con el protocolo de PCR dúplex desarrollado por Sandoval Morejón (2018) para amplificar dos regiones del gen de la subunidad mayor de ARN polimerasa II (RPB1), una por especie de *Nosema*, y se emplearon controles positivos para *N. apis* y *N. ceranae* procedentes del trabajo de investigación mencionado.

Cada reacción fue llevada a un volumen final de 25 μ L, con el agua del tipo *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* y la Taq polimerasa (Marca abm), se llevó a cabo el ensamblaje de la PCR dúplex con las condiciones de reacción detalladas en la Tabla 4.

Tabla 3*Detalle del conjunto de primers.*

Nombre del primer	Secuencia (5'->3')	Especie a identificar	Tamaño del fragmento
NosaRNAPol-F2 NosaRNAPol-R2	AGCAAGAGACGTTTCTGGTACCTCA CCTTCACGACCACCCATGGCA	<i>Nosema apis</i>	297 pb
NoscRNAPol-F2 NoscRNAPol-R2	TGGGTTCCCTAAACCTGGTGGTTT TCACATGACCTGGTGCTCCTTCT	<i>Nosema ceranae</i>	662 pb

Tabla 4*Condiciones de reacción para la PCR dúplex.*

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (µL)
H ₂ O	µL	-	-	13.00
Buffer	X	10.00	1.00	2.50
NosaRNAPol-F2	µM	10	0.50	1.25
NosaRNAPol-R2	µM	10	0.50	1.25
NoscRNAPol-F2	µM	10	0.40	1.00
NoscRNAPol-R2	µM	10	0.40	1.00
MgSO ₄	mM	25	1.75	0.25
DNTPs	µM	40.00	0.80	0.50
Taq	U/µL	5.00	1.250	0.25
ADN	ngr	100	100	4
Volumen Total				25.00

Después, la reacción se realizó en un Termociclador, cuyas condiciones de amplificación fueron 1 min de desnaturalización inicial a 95° C, 40 ciclos de: desnaturalización (1 min a 94° C), *annealing* (1 min a 67° C), y extensión (1 min a 72° C), y extensión final 10 min a 72° C. El producto de PCR se observó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X durante una 1h a 120V y el revelado fue mediante un Fotodocumentador *Bio Rad ChemiDoc*[™] *XRS*. En la confirmación de positivos detectados mediante una PCR dúplex, se realizó una PCR simple (convencional) empleando un solo par de primers, con modificaciones en las condiciones de reacción (Tabla 5) y únicamente el cambio de número de ciclos a 35, en las condiciones de amplificación de la PCR.

Tabla 5*Condiciones de reacción para la PCR simple.*

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)
H₂O	μL	-	-	14.88
Buffer	X	10.00	1.00	2.50
NosXRNAPol-F2	μM	10	0.50	1.25
NosXRNAPol-R2	μM	10	0.50	1.25
MgSO₄	mM	25	2	0.50
DNTPs	μM	40.00	0.80	0.50
Taq	U/μL	5.00	0.625	0.13
ADN	ngr	100	100	4
Volumen Total				25.00

3.3.3 Análisis filogenético

Previamente, los productos de PCR obtenidos se purificaron con el Kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, siguiendo las recomendaciones del inserto. Luego, se enviaron las cuatro muestras para su secuenciación en dirección forward y reverse a la empresa Macrogen, en Corea.

De los resultados obtenidos, los cromatogramas (forward y reverse) de cada secuencia (M12, M16, M54, M55), inicialmente fueron depurados en el programa MEGA versión 6.0 y se realizó el ensamblaje en Ugene versión 1.22.0, obteniendo una secuencia consenso (*contig*) de cada muestra. Cada secuencia consenso obtenida se comparó con secuencias depositadas en la base de datos GenBank empleando el programa online *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), y se descargaron las secuencias más representativas. Seguido, se alinearon y cortaron las 19 secuencias en MEGA versión 6.0, para obtener un alineamiento múltiple de 297 pb. De esta manera, con las secuencias de la región del gen RPB1 se construyó un árbol filogenético utilizando en método de evolución de *Maximun Likelihood* (ML) con el modelo *Kimura 2*

parámetros y un soporte de 1.000 repeticiones (*bootstrap*). Las especies *Trachipleistophora hominis* y *Vittaforma corneae* fueron los grupos externos (*outgroup*).

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Estadística descriptiva

Con la información recolectada tanto en las encuestas técnico-sociales como en los registros se elaboró una base de datos, y empleando el software de acceso libre Epi Info se analizó la distribución de la muestra de: meliponarios en función de la provincia y cantón, y nidos en función del meliponario. Para observar la presencia o no de sesgos que podrían afectar el resultado del estudio.

3.4.2 Estadística analítica

3.4.2.1 Prevalencia

Con los resultados de la prueba de PCR dúplex, se obtuvo la prevalencia puntual (expresado como porcentaje de muestras positivas sobre el total de muestras analizadas con un nivel de confianza del 95%) de *Nosema* sp. en abejas sin aguijón por provincia a nivel de meliponario y nido.

3.4.2.2 Factores de riesgo

La información tanto de las encuestas técnico-sociales como de los registros, proporcionaron los factores de riesgo que pueden influir en la presencia o no de *Nosema* sp. en las abejas sin aguijón. Las variables se agruparon de acuerdo a su correspondencia en: elementos climáticos (temperatura, humedad), factores geográficos (altitud), características de las abejas (género),

procedencia del nido (original, colecta, multiplicación), tipo de nido (natural, caja), ubicación del nido (cerca de casa, bosques, cultivos, fuentes de agua, animales), presencia de abejas melíferas (10m, 100m, 1000m), prácticas de manejo (producción de derivados, uso de material de extracción de derivados, conocimiento de nosemosis). Todas estas variables fueron tomadas como variables independientes y la variable dependiente fue la presencia de *Nosema* spp. El análisis de los datos (tanto las variables así como sus interacciones) se realizaron mediante un GLM (*General linear model* - univariable) con el software IBM SPSS. Se aceptaron como factores de riesgo las variables cuyo p-valor era < 0.05 ; el cual indica una asociación de las variables con una diferencia significativa.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Distribución de muestras de trabajo

4.1.1 Distribución de meliponarios

De un total de $M = 90$ existentes en los cantones de estudio, se muestreo un 28.89% ($M = 26/90$). Los meliponarios visitados en el cantón Fco. de Orellana fue el 60% ($M = 6/10$) de la población total existente, en el cantón Pindal la muestra representó el mayor porcentaje de todos los cantones de Loja (45%, $M = 9/20$). En el cantón Celica se obtuvo un 25% ($M = 5/20$), y en el cantón Puyango se obtuvo un 15% ($M = 6/40$) ([Anexo N° 3](#)). Las muestras de Fco. de Orellana, Pindal y Celica se consideraron significativas al ser mayor al 25% de la población total. Sin embargo, en el caso de Puyango, la muestra no fue representativa debido a la poca apertura de los productores para su participación en el estudio. Dentro de la muestra de trabajo ($M = 26$), no se observó sesgos en su distribución, pues el cantón Pindal obtuvo el máximo porcentaje de muestreo 34.62% ([Anexo N° 3](#)). De igual manera, este resultado se debió a la elevada participación de los productores en el estudio.

4.1.2 Distribución de nidos

Se muestreo un 24.26% ($n_i = 82/338$) de la población total existente de nidos en los meliponarios visitados. Se recolectó un 72.34 % ($n_i = 34/47$) en Fco. de Orellana, un 16.78 % ($n_i = 24/143$) en Pindal, un 13.64 % ($n_i = 12/88$) en Celica, y un 20% ($n_i = 12/60$) en Puyango

(Anexo N° 3). En la distribución de nidos por cantones, se observó el mayor porcentaje (41.46%) de nidos recolectados en Fco. de Orellana, seguido de los cantones de Loja. De igual manera, este resultado fue como consecuencia de la gran apertura y participación de los productores en el estudio. En el cantón Fco. de Orellana, se debe indicar que el número de nidos muestreados en los meliponarios M1, M2, M3, M4 fue elevado incluso llegando a un 100% en el meliponario M3, gracias a la apertura de los productores. En los meliponarios M5 y M6 existieron muy pocos nidos, de los cuales se muestro un 50% ($n_i = 1/2$), a pesar de ello estos meliponarios presentaron un sesgo (2.94%) en la distribución de la muestra (Anexo N° 3). En Loja se observó un bajo número de nidos muestreados ($n_i = 1$ a 2) tomando en cuenta el tamaño de los meliponarios: M6, M12, M13, M14, M20. Lamentablemente, la colaboración de los productores y no el esfuerzo del muestreo; es lo que refleja el tamaño de la muestra de los tres cantones de la provincia de Loja. Por ejemplo, la gran apertura de los productores de los meliponarios M1, M2 y M3 presentó los porcentajes más altos de nidos recolectados 12.50%, 12.50% y 8.33% respectivamente (Anexo N° 3).

Como información adicional, por parte del trabajo de investigación “Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) en las provincias de Orellana, Sucumbíos y Loja, Ecuador” realizado por (Prado et al., 2018), se conoció los géneros muestreados de abejas sin aguijón. Determinando un total de cinco géneros: *Tetragonisca* ($n_i = 8$), *Scaptotrigona* ($n_i = 8$), *Melipona* ($n_i = 12$), *Nannotrigona* ($n_i = 5$), *Cephalotrigona* ($n_i = 1$), y 43 géneros no identificados ($n_i = 48$). El presente estudio no pudo lograr un tamaño ideal, puesto que la participación de los meliponicultores fue la principal influencia para no llegar a un óptimo nivel de significancia de datos. Sin embargo, los resultados aquí expuestos pueden ser tomados como base para siguientes investigaciones.

4.2 Prevalencia de *Nosema* spp.

En el presente estudio, mediante el análisis de los resultados obtenidos por PCR dúplex, se reveló de manera general la presencia de *N. apis* por primera vez en abejas sin aguijón, en un 4.88% ($n_i = 4/82$) de nidos distribuidos en un 7.69% ($M = 2/26$) de meliponarios (Tabla 6). En cambio, no se detectó la presencia de *N. ceranae* en los meliponarios muestreados.

Tabla 6
Prevalencia general de *Nosema* spp. determinada en abejas sin aguijón.

Provincia	<i>Nosema</i> spp.	Nidos		Meliponarios	
		Frecuencia	Porcentaje (%)	Frecuencia	Porcentaje (%)
Orellana	<i>N. apis</i>	4/34	11.72	2/6	33.33
	<i>N. ceranae</i>	0/34	0	0/6	0
Loja	<i>N. apis</i>	0/48	0	0/20	0
	<i>N. ceranae</i>	0/48	0	0/20	0
Total	<i>N. apis</i>	4/82	4.88	2/26	7.69
	<i>N. ceranae</i>	0/82	0	0/26	0

Las muestras positivas correspondieron a dos de los cinco géneros conocidos de abejas sin aguijón (Tribu Meliponini), siendo estos, *Tetragonisca* ($n_i = 2/8$) y *Scaptotrigona* ($n_i = 2/8$). En cambio, no se detectó *Nosema* spp. en los géneros *Melipona* ($n_i = 12$), *Nannotrigona* ($n_i = 5$), *Cephalotrigona* ($n_i = 1$), y géneros no identificados/desconocidos ($n_i = 48$) (Tabla 7).

Tabla 7

Comparación de prevalencia de Nosema spp. en varios géneros de abejas sin aguijón.

Géneros	País / Especie					
	Ecuador		Argentina		Brasil	
	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>
<i>Tetragonisca</i>	2/8 (25) *	0/8 (0) *	0/6 (0) ***	6/6 (100) ***	0/39 (0) ** 0/1 (0) ***	0/39 (0) ** 0/1 (0) ***
<i>Scaptotrigona</i>	2/8 (25) *	0/8 (0) *	0/2 (0) ***	2/2 (100) ***		
<i>Melipona</i>	0/12 (0) *	0/12 (0) *			0/49 (0) ** 0/5 (0) ***	0/49 (0) ** 5/5 (100) ***
<i>Nannotrigona</i>	0/5 (0) *	0/5 (0) *				
<i>Cephalotrigona</i>	0/1 (0) *	0/1 (0) *				
<i>Sp sin identificar (19)</i>	0/24 (0) *	0/24 (0) *				
<i>Sp por identificar (24)</i>	0/24 (0) *	0/24 (0) *				

Simbología: *Presente estudio, modificado de ** (Nunes-Silva et al., 2016), *** (Porrini et al., 2017).

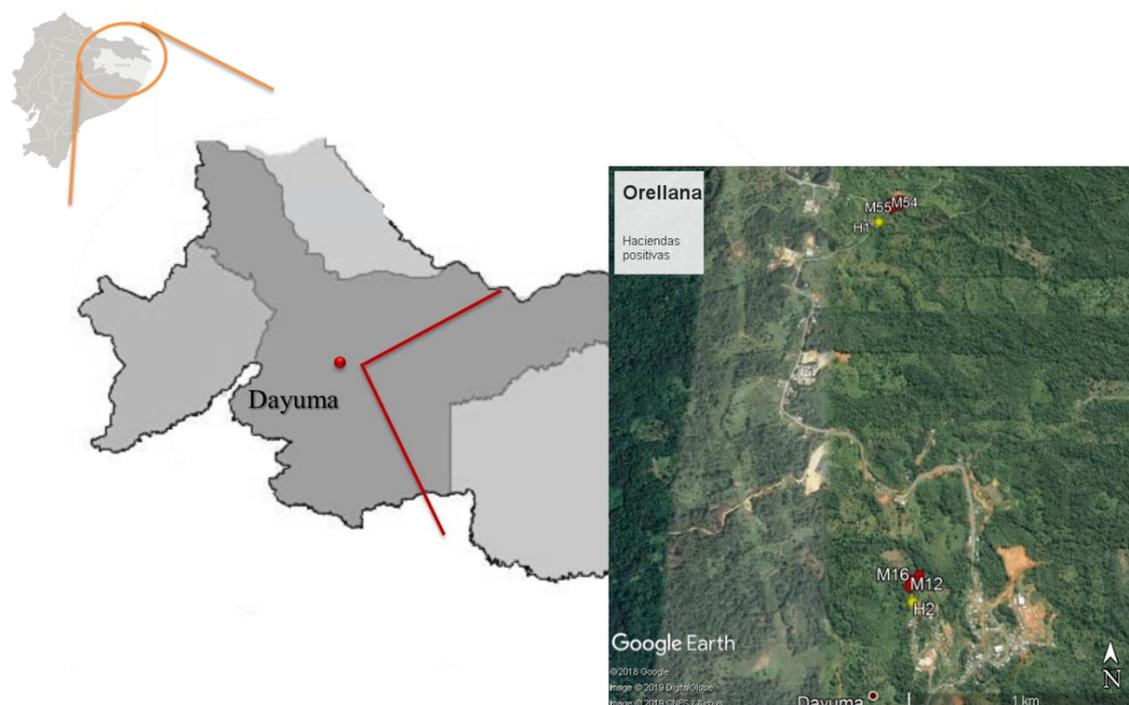


Figura 3. Ubicación geográfica de los nidos positivos en Orellana – Ecuador.

Además, los cuatro nidos positivos estuvieron localizados únicamente en la comunidad de Dayuma, provincia de Orellana (amazonia ecuatoriana) (Fig. 3) (Anexo N° 4). *N. apis* se presentó con una prevalencia de 11.72% ($n_i = 4/34$) en nidos y un 33.33% ($M = 2/6$) en meliponarios (Tabla 6).

A nivel de Sudamérica, se conocía de la presencia única de *N. ceranae* en abejas sin aguijón de Argentina y Brasil en un 92.86% ($n_i = M = 13/14$) (Porrini et al., 2017). Los géneros positivos fueron *Tetragonisca* y *Scaptotrigona* de origen argentino y *Melipona* de origen brasileño (Tabla 7). En el presente estudio, el género *Melipona* de Ecuador no evidenció la presencia de *Nosema* spp. No obstante, nuestros resultados contribuyen con información sobre la especie (*N. apis*) que puede también estar presente en los géneros *Tetragonisca* y *Scaptotrigona* de abejas sin aguijón.

Con respecto a los géneros *Nannotrigona* y *Cephalotrigona*, no existen estudios previos en América Latina (Nunes-Silva et al., 2016; Porrini et al., 2017), siendo este el primer estudio que analiza los dos géneros de abejas sin aguijón para el diagnóstico de *Nosema* spp. Sin embargo, no se observó la presencia de este patógeno. En definitiva, siendo escasas las investigaciones de *Nosema* en abejas sin aguijón (Nunes-Silva et al., 2016; Porrini et al., 2017), nuestro estudio es pionero en Ecuador y el tercero en América del Sur de tal índole, analizando incluso una mayor cantidad de especies en más de cinco géneros conocidos y diecinueve no identificados.

Ahora, en Argentina y Brasil la prevalencia del microsporidio *Nosema* spp. se encuentra liderada por *N. ceranae* con elevados valores, tanto en abejas melíferas (Tabla 8) como en abejas sin aguijón (Tabla 6).

Tabla 8

Comparación de la prevalencia de Nosema spp. en abejas melíferas.

País	Prevalencia (%)		Referencias
	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>	
Ecuador	55.17	48.28	(Sandoval Morejón, 2018)
Argentina	49	< 1	(Medici, Sarlo, Porrini, Braunstein, & Eguaras, 2012)
Brasil	98.82	< 1	(Message, Teixeira, & De Jong, 2012; E. W. Teixeira et al., 2013)

En las abejas sin aguijón estas elevadas prevalencias pudieron ser consecuencia del gran porcentaje de abejas melíferas positivas a *N. ceranae* distribuidas en los dos países (Tabla 7), pues se conoce que los parásitos de abejas melíferas, como *Nosema*, pueden expandirse a otros polinizadores (Graystock, Goulson, & Hughes, 2015). En América del Sur, *N. ceranae* se ha observado en especies como: abejorros silvestres de Argentina (*Bombus atratus*, *Bombus bellicosus*, y *Bombus morio*) (Plischuk et al., 2009), de Uruguay (*Bombus atratus* y *Bombus bellicosus*) (Arbulo et al., 2015), y de Colombia (*Bombus atratus*) (Gamboa et al., 2015), y además en avispa argentina (*Polybia scutellaris*) (Porrini et al., 2017).

En Ecuador, un estudio previo realizado por Sandoval Morejón (2018) en abejas melíferas, indicó un porcentaje similar de prevalencias entre *N. apis* y *N. ceranae* (Tabla. 8). No obstante, las abejas sin aguijón no presentaron el mismo patrón epidemiológico que las abejas melíferas, ya que *N. ceranae* no fue encontrado mientras que si se observó *N. apis*, pero con una baja prevalencia. Probablemente, la alta prevalencia y distribución de abejas melíferas positivas a *N. apis* en el territorio nacional, pudo favorecer la aparición de este microsporidio en las abejas sin aguijón. A nivel nacional, existe un mayor número de registros de abejas melíferas positivas a *N. apis* ubicadas en distintas de provincias (AGROCALIDAD, 2016; Amoguimba-Molina, 2016;

Méndez Vinueza, 2016; Sandoval Morejón, 2018). Esto concuerda con el incremento actual de la prevalencia de *N. apis* en abejas melíferas del país, del 9% a nivel nacional (Agrocalidad, 2016) al 48.28% (Sandoval Morejón, 2018), esto a pesar de ser un estudio realizado únicamente en tres provincias. A diferencia de *N. apis*, *N. ceranae* se ha encontrado únicamente en tres provincias de la sierra ecuatoriana (Carchi, Imbabura, Pichincha) (Sandoval Morejón, 2018). Sin embargo, en las provincias de Orellana y Loja se desconoce la prevalencia actual de *Nosema* spp. en abejas melíferas (Agrocalidad, 2016; Amoguimba-Molina, 2016; Méndez Vinueza, 2016; Sandoval Morejón, 2018). Por ello al no contar con esta información, no es posible afirmar/sugerir que la presencia de *N. apis* en abejas sin aguijón se deba a la baja prevalencia de *N. apis* en abejas melíferas o a la poca distribución de abejas melíferas en las provincias de estudio (número de apicultores).

Ahora, para entender como parásitos de abejas melíferas pueden ser transmitidos a otros huéspedes de la Familia Apidae, se plantean que las formas de interacción entre polinizadores (Colla et al., 2006; McArt et al., 2014), y su incremento por la superposición de áreas de distribución no antes visto (Agüero et al., 2018). Además de la prevalencia distribuida de *Nosema* spp. en América del sur desde hace varias décadas (Maggi et al., 2016), podrían ser la clave de ésta alarmante situación en los miembros de la Familia Apidae (Agüero et al., 2018; Porrini et al., 2017). Las interacciones por el contacto entre individuos sanos y enfermos genera una contaminación cruzada (Porrini et al., 2017) intra e interespecífica (Graystock, Blane, McFrederick, Goulson, & Hughes, 2016). Como lo demuestran Graystock et al, (2015), en donde los parásitos de abejorros domesticados: *A. bombi*, *C. bombi*, y *N. bombi*, y de abejas melíferas domesticadas: *N. apis* y *N. ceranae* se dispersaron efectivamente en flores visitadas por ellos, y a

su vez en abejorros silvestres previamente sanos, al visitar las mismas flores (Agüero et al., 2018; Colla et al., 2006; McArt et al., 2014). Otro ejemplo de formas de interacción es a través del hurto tanto de nidos como de recursos, tales como: néctar o polen (Agüero et al., 2018). Este hecho puede incrementar la probabilidad de contaminación cruzada por el antecedente de la presencia en el polen de patógenos totalmente infectivos, como *Nosema* (Higes, Martín-Hernández, Garrido-Bailón, et al., 2008). De este modo, la polinización junto a las flores como vectores compartidos (Graystock et al., 2015), pueden incrementar la transmisión de patógenos entre distintos huéspedes, como *Nosema* (Agüero et al., 2018; Higes, Martín-Hernández, Garrido-Bailón, et al., 2008; McArt et al., 2014). Además, la probabilidad de la transmisión de patógenos de un huésped a otro puede estar influenciada tanto por el huésped, como por el mismo patógeno (Graystock et al., 2013), sin embargo, Perlman & Jaenike (2003) demostraron que la filogenia del nuevo huésped es un determinante clave en el éxito de la infección, incluso más allá de compartir una misma área geográfica. Al conocer de la filogenia tradicional que comparten las tribus del grupo de abejas corbiculadas (Ascher, Danforth, & Ji, 2001; Rasmussen & Cameron, 2007), y en particular, la relación estrecha entre Apini y Meliponini probablemente, el rango de hospedadores de Apini pueda abarcar a Meliponini, generándose así el cambio de huésped (Brothers, 1999; Nunes-Silva et al., 2016).

Por último, a pesar de que datos de un número mayor de provincias son claramente necesarios para obtener conclusiones firmes, nuestros resultados sugieren que el microsporidio *Nosema apis*, siendo parásito de abejas melíferas puede aparecer en abejas sin aguijón de la amazonia ecuatoriana.

4.3 Caracterización de *Nosema* sp.

4.3.1 Análisis molecular

Las muestras sospechosas por PCR dúplex fueron confirmadas a través de un ensayo de PCR convencional, en donde el tamaño del fragmento amplificado correspondiente a *N. apis* estaba cercano a 300pb (\approx 297pb) (Fig. 4), tal como se describe en varios estudios en donde emplearon el mismo par de primers (Gisder & Genersch, 2013; Graystock, Goulson, & Hughes, 2014; Graystock, Yates, Darvill, Goulson, & Hughes, 2013; Meixner et al., 2014; Sandoval Morejón, 2018). De este modo, se confirmó por PCR la presencia de *N. apis* en las muestras M12, M16, M54 y M55 de abejas sin aguijón de la provincia de Orellana.

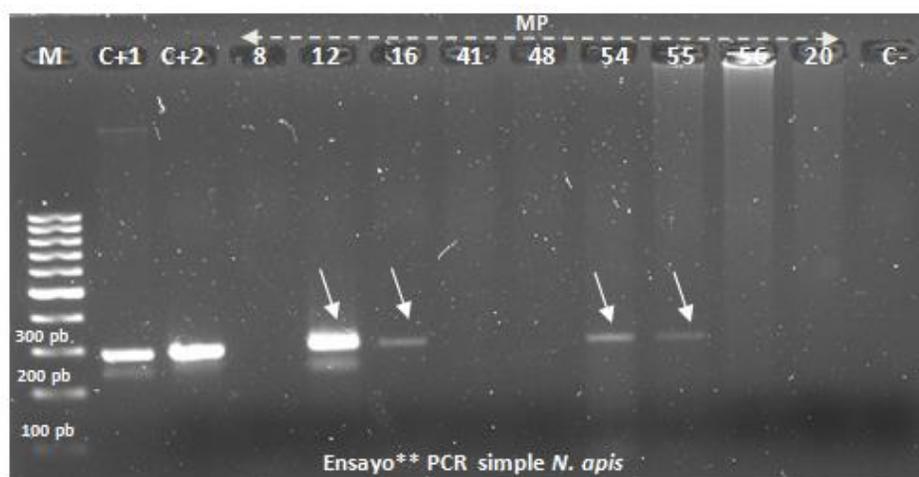


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR convencional.

M: Marcador molecular de 100pb; **C+1 y C+2:** control positivo (*N. apis*);
MP: Muestras de ADN de nidos de abejas sin aguijón; **C-:** Control negativo (H₂O).

4.3.2 Análisis filogenético

Estudios moleculares de *N. apis* y *N. ceranae* se han centrado en la aparición de tales microsporidios en miembros de la Tribu Apini (abejas de miel o abejas con aguijón) (Chaimanee, Warrit, & Chantawannakul, 2010; Chen et al., 2009; Huang et al., 2008). De igual manera, en miembros de la Tribu Bombini (abejorros) (Arbulo et al., 2015; Graystock et al., 2013; Hicks, Pilgrim, Perry, & Marshall, 2018; Li et al., 2012; Plischuk et al., 2009). Sin embargo, en miembros de la Tribu Meliponini (abejas sin aguijón) son escasos los estudios y en especial a nivel de Sudamérica (Nunes-Silva et al., 2016; Porrini et al., 2017).

Por consiguiente, el presente estudio forma parte del escaso grupo de investigaciones moleculares sudamericanas de especies de *Nosema* en abejas sin aguijón, y es el primero en analizar filogenéticamente *Nosema* sp. encontradas en abejas sin aguijón de la provincia de Orellana (amazonia ecuatoriana).

Los resultados de la secuenciación de las muestras M12, M16, M54 y M55 nos permitieron obtener un *contig* de cada una. Estos al ser comparados con secuencias de la base de datos GenBank, produjeron coincidencias que confirmaron su correspondencia al género *Nosema* con más del 72% de identidad y su correspondencia a la especie *Nosema apis* (DQ996230.1) con un 99.66% de identidad y 100% de *Query cover* en todos los casos (Tabla. 9).

Tabla 9*Detalle de las secuencias obtenidas del GenBank.*

Numero de accesoión (GenBank)	Especie	Origen	Porcentaje de identidad (%)
DQ996230.1	<i>N. apis</i>	Inglaterra	99.66
XM_024474576.1	<i>N. ceranae</i>	Canadá	79.18
HQ457438.1	<i>N. disstriae</i>	Canadá	78.72
HQ215550.1	<i>N. antheraeae</i>	China	77.66
HQ457437.1	<i>N. sp.</i>	Canadá	77.66
DQ666959.1	<i>N. spodopterae</i>	Taiwán	77.10
HQ457435.1	<i>N. fumiferanae</i>	Canadá	76.95
JX213752.1	<i>N. bombycis</i>	Inglaterra	76.77
JX213749.1	<i>N. lymantriae</i>	Inglaterra	76.77
DQ996234.1	<i>N. trichoplusia</i>	Inglaterra	76.77
DQ666960.1	<i>N. bombycis</i>	Taiwán	75.86
DQ996232.1	<i>N. empoascae</i>	Inglaterra	72.64

En el alineamiento múltiple se observó una región altamente conservada (296 pb) de los *contig* (M12, M16, M54, M55) con las secuencias de *N. apis* de Inglaterra (DQ996230.1) y de Ecuador (Sandoval Morejón, 2018). No obstante, se encontró una pequeña diferencia entre los *contig* del estudio y las dos secuencias del GenBank de *N. apis* de abejas melíferas (hospedero original), en un solo nucleótido (C y T, posición 97) ([Anexo N° 5](#)). Resultados similares se encontraron en las secuencias de ADNr de *N. ceranae*, Chaimanee et al., (2010) compararon aislados de este microsporidio de diferentes hospederos *A. cerana* (hospedero original), y *A. florea* y *A. dorsata* (nuevos hospederos), encontrando pequeñas diferencias en la secuencia amplificada. Por otro lado, Huang et al., (2008) corroboran que se da una pequeña variación de un aislado de *Nosema* spp. en diferentes hospederos.

Dentro de las secuencias obtenidas del GenBank para el gen RPB1, se encontraron secuencias pertenecientes a *Nosema* spp. con hospederos del Orden Hymenoptera (abejas melíferas) en un 16.67% (2/12 secuencias), y del Orden Lepidóptera (polillas) en un 83.33% (10/12 secuencias) ([Anexo N° 5](#)). Además ninguna secuencia de la base de datos perteneció a Sudamérica. La única

secuencia disponible para Sudamérica fue obtenida del trabajo de titulación desarrollado por Sandoval Morejón (2018), con la cual se comparó la secuencia de *N. apis* para Ecuador.

El análisis filogenético de la región del gen RPB1 (Fig. 5), confirmó la correspondencia aún más de las muestras del estudio (M12, M16, M54, M55) al género *Nosema* obtenido por *BLAST*, y dentro de este género con la especie *N. apis*. Presenta una relación más cercana con *N. apis* de abejas melíferas de Ecuador e Inglaterra (ubicados en el mismo clado, y *bootstrap* del 99%), seguido de *N. ceranae* de Canadá.

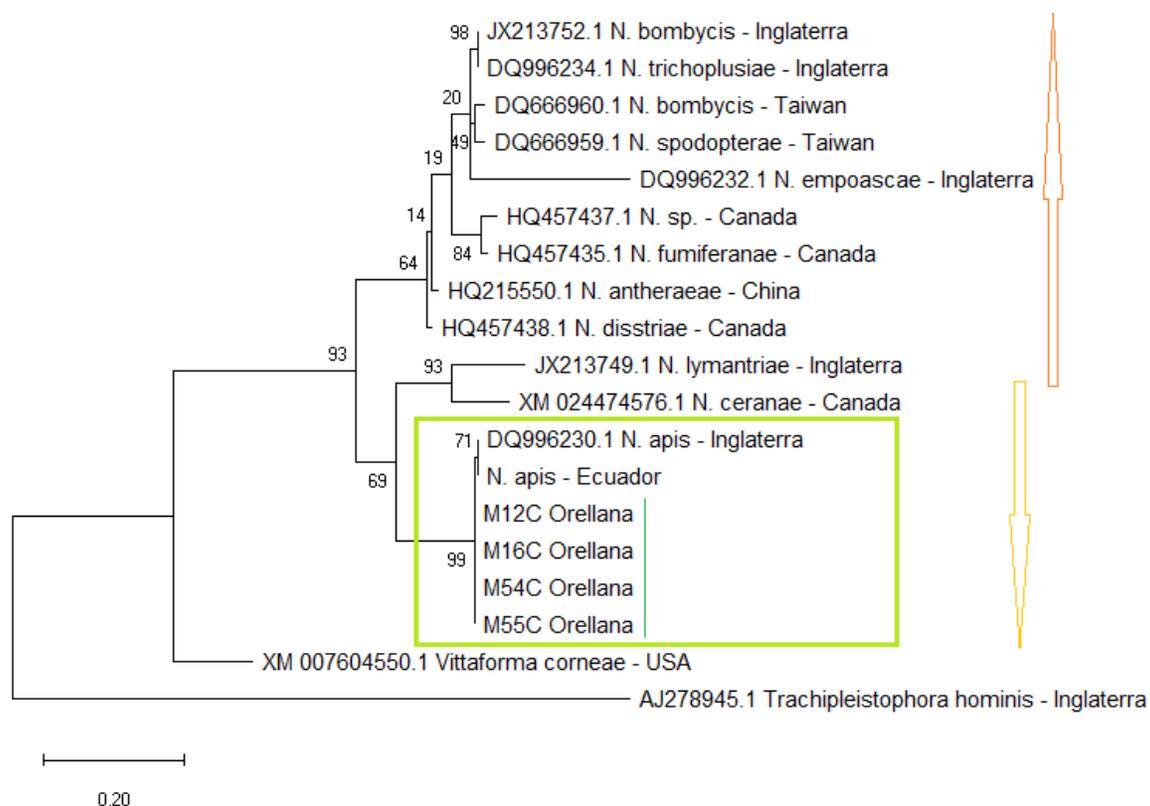


Figura 5. Árbol filogenético de *Nosema* spp. basado en un fragmento del gen RPB1. Fue construido mediante un análisis de Máxima verosimilitud. El outgroup es *Trachipleistophora hominis*. Los valores de *bootstrap* se ubican en las ramas del árbol.

Estudios filogenéticos del Phylum Microsporidia se han basado en un conjunto de genes del ADN ribosomal (ADNr), empleando secuencias de las subunidades pequeñas (SSU) (Baker, Vossbrinck, Maddox, & Undeen, 1994; Sokolova et al., 2003; Zhu, Wittner, Tanowitz, Cali, & Weiss, 1994), grandes (LSU) (Zhu et al., 1994), y espacios transcritos internos (ITS) (Gresoviac et al., 2000; Matheny, Liu, Ammirati, & Hall, 2002; Müller et al., 2000), distinguiendo varios grupos de este phylum, entre ellos el grupo de *Vairimorpha* y *Nosema* (Baker et al., 1994). Como producto de estas de investigaciones, se ha observado un sin número de secuencias de *Nosema* en la base de datos GenBank pertenecientes a tales genes. Sin embargo, no siempre han dado una buena resolución a nivel de especie (Cheney, Lafranchi - Tristem, & Canning, 2000). Presentándose la necesidad de genes alternativos para obtener filogenias con mejores resultados, como por ejemplo, los genes codificantes de proteínas como: quitina sintasa (Mehmann, Brunner, & Braus, 1994), β -tubulina (Thon & Royse, 1999), ATP6 (subunidad de la ATPasa mitocondrial) (Kretzer & Bruns, 1999), y RPB1 (subunidad más grande de la ARN polimerasa II) (Hirt et al., 1999), todos han mostrado ser una buena fuente de información en filogenia de distintos hongos. En los microsporidios así como en los organismos eucariotas, los genes de ADNr se presentan como multigénicos (varias copias) (Tay, O'Mahony, & Paxton, 2005), ya que necesitan cubrir la elevada demanda de transcripción de ARNr para la síntesis de ribosomas (BioTed, 2000). De igual manera, los genes de tubulina de los microsporidios han presentado dos copias (Phillipe & Adoutte, 1998). Los genes multigénicos hacen que sea difícil la clasificación a nivel de especie puesto que, al existir diferencias en pocos nucleótidos, no se puede conocer si es a causa de una variación de la cepa/aislado o una variación en las diferentes copias del mismo gen (Cheney, Lafranchi - Tristem, Canning, Bourges, & Canning, 2001). El gen de RPB1 tiene una sola copia en el genoma de una variedad de organismos entre ellos los microsporidios (Hirt et al., 1999), ya

que es un gen *housekeeping* (de mantenimiento) (Schröder et al., 2013), y se evita de esta manera al ser empleado en análisis filogenéticos problemas de copias parálogas (Sidow & Thomas, 1994). Por ello, en este estudio se empleó la secuencia de una región del gen RPB1 para evitar posibles problemas en la dilucidación de la relación filogenética de *Nosema* sp. en dos diferentes hospederos, las abejas melíferas (hospederos originales) y las abejas sin aguijón (nuevo hospedero, encontrado en el presente estudio).

4.4 Determinación de los factores de riesgo

En el presente estudio, se analizaron 10 variables (Tabla 10) como posibles factores de riesgo implicados en la introducción y mantenimiento de *Nosema* sp. en las abejas sin aguijón de la provincia de Orellana y Loja.

De los elementos climáticos y factores geográficos analizados, se determinó que solo la humedad es un factor de riesgo para la presencia de *Nosema* spp. en abejas sin aguijón ($F = 6.478$, $p = 0.013$) (Tabla 10). En el presente estudio se trabajó en dos zonas de diferentes regiones del país. La provincia de Orellana (región amazónica) esta caracterizada por un clima tropical-húmedo, precipitaciones todo el año, una temperatura promedio de 27 °C y humedad relativa del 90% (Varela, 2019). En cambio, en los cantones de estudio de la provincia de Loja (región sur-interandina) se tiene un clima templado, semi-húmedo, una temperatura promedio de 25 °C y humedad relativa del 70% (Varela, 2019). Es clara la ligera variación de temperatura y más de humedad en las dos zonas de estudio, y al ser un posible factor de riesgo la humedad, en la provincia de Orellana se establecería un ambiente propicio para el desarrollo de *Nosema* spp. Los factores ambientales como la temperatura y humedad, demostrado por Ozgor & Keskin (2015),

tienen un efecto directo sobre la presencia y el nivel de infección de *Nosema* spp. en abejas melíferas de diferentes zonas de Turquía.. Además estos resultados concuerdan (Fenoy, Rueda, Higes, Martín-Hernández, & del Aguila, 2009), puesto que *N. ceranae* tiene una mejor adaptación a temperaturas elevadas (climas cálidos a calurosos), a diferencia de *N. apis*, que si está adaptado a temperaturas moderadas (climas cálidos a templados). Incluso, se ha encontrado que las esporas de *N. apis* son más resistentes a bajas temperaturas (Fenoy et al., 2009).

Por otro lado, se determinó que los géneros ($F = 4.078$, $p = 0.002$) (Tabla 10) son un factor de riesgo. Entre ellos, los géneros *Scaptotrigona* y *Tetragonisca* fueron susceptibles a *Nosema apis*. En cuanto a las demás variables, estas no representaron un factor de riesgo ($p > 0.05$).

Tabla 10
Variables de análisis como posibles factores de riesgo.

Variable	Nivel	Frecuencia		F (p-valor)
		Total	Positivos	
Temperatura (°C)	17 - 19	5	0	0.000 (1.000)
	19 - 21	0	0	
	21 - 23	31	0	
	23 - 25	0	0	
	25 - 27	46	4	
Humedad (%)	50 -60	24	0	6.478 (0.013)
	60 - 70	24	0	
	70 - 80	21	4	
	80 - 90	13	0	
	90 -100	5	0	
Elevación (msnm)	250 - 350	34	4	0.000 (1.000)
	350 - 450	0	0	
	450 -550	0	0	
	550 - 650	0	0	
	650 - 750	5	0	
	750 - 850	20	0	
	850 - 950	27	0	
Género	<i>Tetragonisca</i>	8	2	4.078 (0.002)
	<i>Scaptotrigona</i>	8	2	
	<i>Melipona</i>	12	0	
	<i>Nannotrigona</i>	5	0	
	<i>Cephalotrigona</i>	1	0	
	N/I	48	0	
Procedencia del nido	Original	16	1	0.407 (0.667)
	Colecta	56	2	

	Multiplicación	10	1	
Tipo nido	Natural	38	0	3.707 (0.058)
	Caja	44	4	
Ubicación del nido	Casa	29	1	0.050 (0.823)
	Bosque	36	3	1.262 (0.266)
	Cultivos	5	0	0.961 (0.331)
	Fuentes de agua	29	3	0.000 (1.000)
	Animales	48	2	0.144 (0.706)
Presencia de abejas melíferas (m)	10	11	1	
	100	5	0	0.231 (0.874)
	1000	47	2	
Producción/Recolección de derivados del nido	Si	64	4	1.171 (0.283)
	No	18	0	
Uso de material para extracción de derivados	Si, mismo material	20	2	
	Si, diferente material	1	0	0.295 (0.747)
	No	5	0	
Conocimiento de nosemosis	Si	1	0	0.080 (0.779)
	No	25	4	
Simbología: N/I = no identificado, F = Test F de Fisher, p = significancia. El nivel de confianza es 95%				

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Por primera vez, se detectó la presencia del microsporidio *N. apis* en las abejas sin aguijón de los géneros *Tetragonisca* y *Scaptotrigona* del Ecuador. Este resultado apoya la problemática actual de la aparición de *Nosema* spp. en polinizadores silvestres de América del Sur y recalca la importancia de ampliar a otros géneros como *Bombus* en Ecuador.

Nosema apis se presentó con un 11.72% en nidos y un 33.33% en meliponarios de Dayuma, provincia de Orellana. Por otro lado la provincia de Loja tuvo una prevalencia del 0% tanto en nidos como en meliponarios. *N. ceranae* estuvo ausente en todas las muestras de abejas sin aguijón.

El análisis filogenético basado en la secuencia del gen RPB1 (297 pb) confirmó la correspondencia de las muestras positivas del estudio con *Nosema apis* de abejas melíferas, al ubicar todas las secuencias en un mismo clado (*bootstrap* 99%).

Los posibles factores de riesgo para la aparición de *N. apis* en abejas sin aguijón fueron la humedad y los géneros estudiados.

5.2 Recomendaciones

Se sugiere complementar el estudio epidemiológico de *Nosema* spp. con el análisis de un número mayor de muestras, procedentes de otros cantones de la provincia de Loja, y de provincias aledañas como Guayas y El Oro. Además, se recomienda recolectar las muestras en diferentes épocas del año para dilucidar la posible influencia de las condiciones climáticas en la aparición de *Nosema* spp. en abejas sin aguijón.

Se recomienda realizar un estudio epidemiológico de *Nosema* spp. en abejas melíferas de las provincias de Orellana y Loja, con la finalidad de comprender la epidemiología de *Nosema* spp. en abejas sin aguijón por la relación ecológica que existe entre ambos grupos.

Para el contraste de los resultados filogenéticos realizados con el gen RPB1 se recomienda emplear un gen distinto al del estudio, de esta manera se podría comprobar la correspondencia de las muestras con un mayor número de secuencias de la base de datos GenBank.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrocalidad. (2016). *Programa Nacional Sanitario Apícola: Resolución 0106*. Retrieved from <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/resolucion-0106-programa-nacional-sanitario-apicola.pdf>
- Agüero, J. I., Rollin, O., Torretta, J. P., Aizen, M. A., Requier, F., & Garibaldi, L. A. (2018). Impactos de la abeja melífera sobre plantas y abejas silvestres en hábitats naturales. *Revista Ecosistemas*, 27(2), 60–69. <https://doi.org/10.7818/RE.2014.27-2.00>
- Alvarez-López, A. E. (2016). *Diagnóstico y prevalencia de ectoparásitos en apiarios de Apis Mellífera en la región sur del Ecuador* (Quito: Universidad Central del Ecuador). Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6945>
- Amano, K., Nemoto, T., & Heard, T. A. (2000). What are Stingless Bees, and Why and How to Use Them as Crop Pollinators? a Review. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 34(3), 183–190.
- Amoguimba-Molina, E. (2016). *Determinación de la prevalencia y georreferenciación de varroosis y nosemosis en colmenares de Apis mellifera en tres provincias del Ecuador en el año 2015. (Chimborazo, Tungurahua y Bolívar)* (Quito: Universidad Central del Ecuador). Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11773>
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11(9), 2284–2290.

- Arana Rodríguez, L., & Beltrán Apolo, R. (2015). *Estudio de factibilidad financiero para incrementar la producción de miel de abeja melipona en los cantones Portovelo, Zaruma y propuesta de comercialización en la ciudad de Guayaquil* (Guayaquil: Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9966>
- Arbulo, N., Antúnez, K., Salvarrey, S., Santos, E., Branchiccela, B., Martín-Hernández, R., ... Invernizzi, C. (2015). High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, *130*, 165–168. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.07.018>
- Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez, M., & Aldasoro, M. (2018). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México: con catálogo de especies* (Biodiversi). Mexico.
- Ascher, J. S., Danforth, B. N., & Ji, S. (2001). Phylogenetic Utility of the Major Opsin in Bees (Hymenoptera: Apoidea): A Reassessment. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *19*(1), 76–93. <https://doi.org/10.1006/MPEV.2001.0911>
- Asiko, G. A. (2012). *Pollination of Strawberry in Kenya, by Stingless Bees (Hymenoptera:Meliponini) and Honey Bee (Hymenoptera:Apini) for Improved Fruit Quality*. University of Nairobi.
- Baker, M. D., Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., & Undeen, A. H. (1994). Phylogenetic Relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* Species (Microspora) Based on Ribosomal RNA Sequence Data. *Journal of Invertebrate Pathology*, *64*(2), 100–106. <https://doi.org/10.1006/JIPA.1994.1077>
- Baquero, L., & Stamatti, G. (2007). Cría y Manejo de Abejas sin aguijón. In *Fundación Pro Yungas. Ediciones del Subtrópico*.
- BioTed. (2000). *PCR gen 18S ARNr humano*. Retrieved from

<https://www.bioted.es/protocolos/PCR-GEN-18S-ARNr-HUMANO.pdf>

- Brosi, B. J. (2009). The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. *Forest Ecology and Management*, 258(9), 1830–1837.
- Brosi, B. J., Daily, G. C., Shih, T. M., Oviedo, F., & Durán, G. (2007). The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. *Journal of Applied Ecology*, 45(3), 773–783.
- Brothers, D. J. (1999). Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta*, 28(1–2), 233–250.
<https://doi.org/10.1046/j.1463-6409.1999.00003.x>
- Brown, B. (1993). Convergent adaptations in phoridae (Diptera) living in the nests of social insects: a review of the new world aenigmatiinae. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 125(S165), 115–137. <https://doi.org/10.4039/entm125165115-1>
- Buckingham, L. (2012). *Molecular diagnostics: fundamentals, methods, and clinical applications* (2nd ed.; 2012 F.A. Davis Company, Ed.). Philadelphia, PA: F.A. Davis Co.
- Camargo, J. M. F., & Pedro, S. R. M. (2013). *Meliponini Lepeletier, 1836*. Retrieved from Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version website: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>
- Chaimanee, V., Warrit, N., & Chantawannakul, P. (2010). Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 207–210.
<https://doi.org/10.1016/J.JIP.2010.06.005>
- Charbonneau, L. R., Hillier, N. K., Rogers, R. E. L., Williams, G. R., & Shutler, D. (2016). Effects of *Nosema apis*, *N. ceranae*, and coinfections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory. *Scientific Reports*, 6(1), 22626. <https://doi.org/10.1038/srep22626>

- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., & Pettis, J. S. (2009). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 142–147. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x>
- Cheney, S. A., Lafranchi - Tristem, N. J., & Canning, E. U. (2000). Phylogenetic Relationships of Pleistophora-like Microsporidia Based on Small Subunit Ribosomal DNA Sequences and Implications for the Source of *Trachipleistophora hominis* Infections. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(3), 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00048.x>
- Cheney, S. A., Lafranchi - Tristem, N. J., Canning, E. U., Bourges, D., & Canning, E. U. (2001). Relationships of Microsporidian Genera, with Emphasis on the Polysporous Genera, Revealed by Sequences of the Largest Subunit of RNA Polymerase II (RPB1). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(1), 111–117. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00422.x>
- Chmielewski, W. (1991). Mites (Acarida) of honey bee (*Apis mellifera* L.) in Poland. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 37(1), 91–94.
- Colla, S. R., Otterstatter, M. C., Gegear, R. J., & Thomson, J. D. (2006). Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological Conservation*, 129(4), 461–467. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2005.11.013>
- Coloma, L. A. (1986). *Contribución para el conocimiento de las abejas sin aguijón (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera) de Ecuador*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

- Cruz Choappa, R., & Cruz Choappa, R. (2018). El phylum Microsporidia. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1), 73–74. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100073>
- De Almeida, N., Castiel, L. D., & Ayres, J. R. (2009). Riesgo: concepto básico de la epidemiología. *Salud Colectiva*, 5(3), 323–344.
- De Dios, T., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2, 70–78.
- Del Sarto, M. C. L., Peruquetti, R. C., & Campos, L. A. O. (2005). Evaluation of the Neotropical Stingless Bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as Pollinator of Greenhouse Tomatoes. *Journal of Economic Entomology*, 98(2), 260–266. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.2.260>
- Delfinado-Baker, M., Baker, E. W., & Phoon, A. C. G. (1989). Mites (Acari) associated with bees (Apidae) in Asia, with description of a new species. *American Bee Journal*, 129(9), 609–613.
- Didier, E. S. (2005). Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*, 94(1), 61–76. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2005.01.010>
- FAO. (2018). *Main bee diseases: Good beekeeping practices*. Roma, Italy: TECA.
- Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R., & del Aguila, C. (2009). High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6886–6889. <https://doi.org/10.1128/AEM.01025-09>
- Fernández, D., Zambrano, G., & Gonzalez, V. (2010). Comportamiento de nidificación, notas taxonómicas y distribución potencial de *Paratrigona eutaeniata* (Hymenoptera: Apidae,

- Meliponini) Nesting behavior, taxonomic notes and potential distribution of *Paratrigona eutaeniata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Revista Colombiana de Entomología*, 36(2), 325–332.
- Franck, P., Cameron, E., Good, G., Rasplus, J.-Y., & Oldroyd, B. P. (2004). Nest architecture and genetic differentiation in a species complex of Australian stingless bees. *Molecular Ecology*, 13(8), 2317–2331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02236.x>
- Freitas, B. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Medina, L. M., Kleinert, A. de M. P., Galetto, L., Nates-Parra, G., & Quezada-Euán, J. J. G. (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40(3), 332–346. <https://doi.org/10.1051/apido/2009012>
- Fries, I. (1993). *Nosema Apis* —A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World*, 74(1), 5–19.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniazek, N. J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32(3), 356–365. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80059-9](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80059-9)
- Fuentes Hidalgo, L. A. (2017). *Estudio epidemiológico de Nosema sp. en apiarios de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha - Ecuador, mediante microscopía de fluorescencia* (Quito: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE - IASA). Retrieved from <http://www.dspace.repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/14509>
- Gamboa, V., Ravoet, J., Brunain, M., Smagghe, G., Meeus, I., Figueroa, J., ... de Graaf, D. C. (2015). Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. *Journal of Invertebrate Pathology*, 129, 36–39. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.05.013>

- García-Olivares, V., Zaragoza-Trello, C., Ramirez, J., Guerrero-Peñaranda, A., & Ruiz, C. (2015). Caracterización rápida de la biodiversidad usando morfometría geométrica: Caso de estudio con abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) del sur de Ecuador. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 7(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v7i1.226>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Garrido-Bailón, E., Botías, C., Martín-Hernández, R., Martín-Salvador, A., Meana, A., & Higes, M. (2012). Prevalencia de los principales agentes patógenos de *Apis Mellifera Iberiensis* en la cabaña apícola española. *Anales de La Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 25, 109-130 (2012), 25, 109–130.
- Ghosh, K., & Weiss, L. (2009). Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 13. <https://doi.org/10.1155/2009/926521>
- Giannini, T. C., Boff, S., Cordeiro, G. D., Cartolano, E. A., Veiga, A. K., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Saraiva, A. M. (2015). Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, 46(2), 209–223. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
- Gisder, S., & Genersch, E. (2013). Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1), 1–6.
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M.-C., Linde, A., & Genersch, E. (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 3032–3038. <https://doi.org/10.1128/AEM.03097-09>

- Gómez-Moracho, T. (2015). *Análisis de los patrones de diversidad genética de Nosema ceranae, un patógeno emergente de Apis mellifera*. Universidad de Santiago de Compostela.
- González-Varo, J. P., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Potts, S. G., Schweiger, O., Smith, H. G., ... Vilà, M. (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(9), 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.008>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Graystock, P., Blane, E. J., McFrederick, Q. S., Goulson, D., & Hughes, W. O. H. (2016). Do managed bees drive parasite spread and emergence in wild bees? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 64–75. <https://doi.org/10.1016/J.IJPPAW.2015.10.001>
- Graystock, P., Goulson, D., & Hughes, W. O. H. (2014). The relationship between managed bees and the prevalence of parasites in bumblebees. *PeerJ*, 2, 14. <https://doi.org/10.7717/peerj.522>
- Graystock, P., Goulson, D., & Hughes, W. O. H. (2015). Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1813), 20151371. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1371>
- 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(2), 114–119. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2013.06.005>

- Gresoviac, S. J., Khattra, J. S., Nadler, S. A., Kent, M. L., Devlin, R. H., Vivares, C. P., ... Hedrick, R. P. (2000). Comparison of Small Subunit Ribosomal RNA Gene and Internal Transcribed Spacer Sequences Among Isolates of the Intranuclear Microsporidian *Nucleospora salmonis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(4), 379–387. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00064.x>
- Heard, T. A. (1999). The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 183–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.183>
- Hicks, B. J., Pilgrim, B. L., Perry, E., & Marshall, H. D. (2018). Observations of native bumble bees inside of commercial colonies of *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) and the potential for pathogen spillover. *The Canadian Entomologist*, 150(4), 520–531. <https://doi.org/10.4039/tce.2018.28>
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 211–217. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2006.11.001>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., ... Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2659–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P., & Meana, A. (2008). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(1), 76–78.
- Higes, M., Martín, R., & Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(2), 93–95.

- Hirt, R. P., Logsdon, J. M., Healy, B., Dorey, M. W., Doolittle, W. F., Embley, T. M., & Embley, T. M. (1999). Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(2), 580–585. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.580>
- Huang, W.-F., Bocquet, M., Lee, K.-C., Sung, I.-H., Jiang, J.-H., Chen, Y.-W., & Wang, C.-H. (2008). The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology*, *97*(1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2007.07.001>
- Hurtado Burillo, M. (2015). Caracterización molecular y morfométrica del género *Scaptotrigona* (Apidae: Meliponini) en Mesoamérica. Universidad de Murcia.
- Ishmael, F. T., & Stellato, C. (2008). Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *101*(4), 437–443. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60323-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60323-7)
- Joost, S. S. (2013). *Identificación de especies de Nosema spp. en colonias de Apis mellifera en cuatro zonas geográficas de Chile, mediante técnica de reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)*. Universidad Austral de Chile.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., ... Paxton, R. J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *96*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2007.02.014>
- Kretzer, A. M., & Bruns, T. D. (1999). Use of *atp6* in Fungal Phylogenetics: An Example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *13*(3), 483–492. <https://doi.org/10.1006/MPEV.1999.0680>

- Li, J., Chen, W., Wu, J., Peng, W., An, J., Schmid-Hempel, P., & Schmid-Hempel, R. (2012). Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China. *International Journal for Parasitology*, *42*(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2011.10.005>
- Macías-Macías, J. O., & Otero-Colina, G. (2004). Infestation of *Pyemotes tritici* (Acari: Pyemotidae) on *Melipona colimana* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae): A Case study. *Agrociencia*, *38*(5).
- Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., ... Eguaras, M. (2016). Honeybee health in South America. *Apidologie*, *47*(6), 835–854. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0445-7>
- Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G., Caldon, M., ... Granato, A. (2008). Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, *39*(4), 436–445. <https://doi.org/10.1051/apido:2008022>
- Maldonado Yaguana, G. A. (2018). *Estandarización de una PCR múltiple para la identificación de tres patógenos en abejas del Ecuador* (Quito: Universidad de las Américas). Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/8734>
- Mantilla Salazar, J. (2012). Caracterización de enfermedades apícolas (loque americana, loque europea, nosemosis y varroasis) en el Perú: Informe final. In *Servicio Nacional de Sanidad Agraria*. Perú: Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., & Higes, M. (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology*, *14*(8), 2127–2138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x>
- Matheny, P. B., Liu, Y. J., Ammirati, J. F., & Hall, B. D. (2002). Using RPB1 sequences to

- improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales). *American Journal of Botany*, 89(4), 688–698. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.4.688>
- McArt, S. H., Koch, H., Irwin, R. E., & Adler, L. S. (2014). Arranging the bouquet of disease: floral traits and the transmission of plant and animal pathogens. *Ecology Letters*, 17(5), 624–636. <https://doi.org/10.1111/ele.12257>
- Medici, S. K., Sarlo, E. G., Porrini, M. P., Braunstein, M., & Eguaras, M. J. (2012). Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitology Research*, 110(2), 859–864. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2566-2>
- Mehmann, B., Brunner, I., & Braus, G. H. (1994). Nucleotide sequence variation of chitin synthase genes among ectomycorrhizal fungi and its potential use in taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(9), 3105–3111. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7944356>
- Meixner, M. D., Francis, R. M., Gajda, A., Kryger, P., Andonov, S., Uzunov, A., ... Wilde, J. (2014). Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. *Journal of Apicultural Research*, 53(2), 215–229. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.04>
- Méndez Vinuesa, L. E. (2016). *Determinación de la prevalencia y georreferenciación de varroosis y nosemosis en colmenares de Apis mellifera en tres provincias del Ecuador en el año 2015. (Manabí, Santa Elena y Los Ríos)* (Quito: Universidad del Ecuador). Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11621>
- Message, D., Teixeira, E. W., & De Jong, D. (2012). Situação da sanidade das abelhas no Brasil. In Orgs. V.L. Imperatriz-Fonseca; D.A.L. Canhos; D.A. Alves; A.M. Saraiva - São Paulo.

- (Ed.), *Polinizadores no Brasil: Contribuição e Perspectivas para a Biodiversidade* (p. 488). São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World* (2nd ed., Vol. 19). Kansas: The Johns Hopkins University Press.
- Müller, A., Trammer, T., Chioralia, G., Seitz, H. M., Diehl, V., & Franzen, C. (2000). Ribosomal RNA of *Nosema algerae* and phylogenetic relationship to other microsporidia. *Parasitology Research*, 86(1), 18–23. <https://doi.org/10.1007/PL00008501>
- Nakjang, S., Williams, T. A., Heinz, E., Watson, A. K., Foster, P. G., Sendra, K. M., ... Embley, T. M. (2013). Reduction and Expansion in Microsporidian Genome Evolution: New Insights from Comparative Genomics. *Genome Biology and Evolution*, 5(12), 2285–2303.
- Nogueira Neto, P. (1997). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Republica Federativa do Brasil: Edição Nogueirapis.
- Nunes-Silva, P., Piot, N., Meeus, I., Blochtein, B., & Smagghe, G. (2016). Absence of Leishmaniinae and Nosematidae in stingless bees. *Scientific Reports*, 6(1), 32547. <https://doi.org/10.1038/srep32547>
- OIE. (2013). Nosemosis de las abejas melíferas. In *Manual terrestre de la OIE* (p. 7:14).
- OIE. (2018). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2018: Acceso en línea. Retrieved December 28, 2018, from OIE - World Organisation for Animal Health website: <http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>
- Ozgor, E., & Keskin, N. (2015). Determination and Comparison of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in Terms of Geographic and Climatic Factors Next generation of colorimetric biosensors for diagnostic purposes View project. *Journal of Biological Chemistry*, 43(1), 9–

15. <https://doi.org/10.15671/HJBC.20154311200>

Pacheco, L. (2008). *Niveles de infección de Nosema apis Zander (Microspora: Nosematidae) en abejas adultas (Apis mellifera L.) y su relación con características del apicultor*. Universidad Austral de Chile.

Pedro, S. R. M. (2014). The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61(4), 348–354. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>

Perlman, S. J., & Jaenike, J. (2003). Infection success in novel hosts: an experimental and phylogenetic study of Drosophila-parasitic nematodes. *Evolution*, 57(3), 544–557. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01546.x>

Pettis, J. S., VanEngelsdorp, D., Johnson, J., & Dively, G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. *Natur Wissenschaften*, 99(2), 153–158. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0881-1>

Phillipe, H., & Adoutte, A. (1998). The molecular phylogeny of eukaryota: solid facts and uncertainties. *Parasitology International*, 47, 54. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(98\)80093-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(98)80093-7)

Pita-Fernández, S., Vila, A., Carpenente-Montero, J., & Montero, C. (1997). Determinación de factores de riesgo. *Cadena Atención Primaria En Red*, 4, 6. Retrieved from https://www.fisterra.com/mbe/investiga/3f_de_riesgo/3f_de_riesgo2.pdf

Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., ... 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. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00018.x>

- Porrini, M. P., Porrini, L. P., Garrido, P. M., de Melo e Silva Neto, C., Porrini, D. P., Muller, F., ... Eguaras, M. J. (2017). *Nosema ceranae* in South American Native Stingless Bees and Social Wasp. *Microbial Ecology*, 74(4), 761–764. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0975-1>
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2010.01.007>
- Prado, A., García, C., Araujo, P., Hernández, A., Ron-Román, J., Saegerman, C., ... Gabriel, C.-B. (2018). *Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) en las provincias de Orellana, Sucumbíos y Loja, – Ecuador*. Quito, Ecuador.
- Rahman, M., Uddin, M., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36.
- Ramalho, M. (1990). Foraging by Stingless Bees of the Genus, *Scaptotrigona* (Apidae, Meliponinae). *Journal of Apicultural Research*, 29(2), 61–67.
- Ramirez, J. A., Ureña, J. V., & Camacho, A. (2012). Las abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) de la región sur del Ecuador. *Cedamaz*, 81–92.
- Ramirez, S. ., Nieh, J. ., Quental, T. B., Roubik, D. W., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Pierce, N. E. (2010). A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(2), 519–525. <https://doi.org/10.1016/J.Ympev.2010.04.026>
- Ramírez, V. J. S. (2016). *Producción y comercialización de miel de abejas meliponas en la ciudad de Quito* (Quito: Universidad De Las Américas). Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5958>

- Rangel, J., Baum, K., Rubink, W. L., Coulson, R. N., Johnston, J. S., & Traver, B. E. (2016). Prevalence of *Nosema* species in a feral honey bee population: a 20-year survey. *Apidologie*, 47(4), 561–571. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0401-y>
- Rasmussen, C., & Cameron, S. A. (2007). A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32(1), 26–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.00362.x>
- Ravoet, J., De Smet, L., Meeus, I., Smagghe, G., Wenseleers, T., & de Graaf, D. C. (2014). Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 122, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.08.007>
- Reyes-González, A., Ayala, R., Camou-Guerrero, A., Reyes-González, A., Ayala, R., & Camou-Guerrero, A. (2017). Nuevo registro de abeja sin aguijón del género *Plebeia* (Apidae: Meliponini), en el alto Balsas del estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88(2), 464–466. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.03.018>
- Reyes Sánchez, L. A. (2016). *Identificación y evaluación de insectos polinizadores del café en tres fincas orgánicas, en el cantón Espíndola-provincia de Loja* (Universidad Nacional de Loja). Retrieved from <http://dspace.unl.edu.ec/handle/123456789/15424>
- Rose, E. A. F. (1996). *Vectoring of Botrytis cinerea (Persoon: Freis) to kiwifruit (Actinidia deliciosa) flowers by honey bees (Apis mellifera Linnaeus)*. Lincoln University.
- Roubik, D. W. (1989). Community ecology. In *Ecology and natural history of tropical bees* (pp. 313–389). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511574641.004>
- Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37(2), 124–143.
- Roubik, D. W., & Peralta, F. J. (1983). Thermodynamics in nests of two *Melipona* species in

Brasil. *Acta Amazonica*, 13(2), 453–466.

Sandoval Morejón, E. D. (2018). *Optimización de un protocolo de pcr múltiple y convencional para el diagnóstico y caracterización molecular de Nosema apis y Nosema ceranae en apiarios de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha - Ecuador*. ESPE.

Schröder, S., Herker, E., Itzen, F., He, D., Thomas, S., Gilchrist, D. A., ... Ott, M. (2013). Acetylation of RNA Polymerase II Regulates Growth-Factor-Induced Gene Transcription in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 52(3), 314–324.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.10.009>

Schwarz, H. F. (1948). Stingless Bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. *Lestrimelitta* and the Following Subgenera of *Trigona*, *Paratrigona*, *Swarziana*, *Parapartamona*, *Cephalotrigona*, *Oxytrigona*, *Scaura*, and *Mourella*. *Abejas Jicotes (Meliponidae) Del Hemisferio Occidental*. . *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 90, 1–536.

Shimanuki, H. (1992). Diseases of pests of honey bees. In D. A. Knox, B. Furgala, D. M. Caron, & J. L. Williams (Eds.), *The Hive and the Honey Bee* (pp. 118–128). Retrieved from <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT81750530/PDF#page=124>

Sidow, A., & Thomas, W. K. (1994). A molecular evolutionary framework for eukaryotic model organisms. *Current Biology*, 4(7), 596–603. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00131-7)

Sinpoo, C., Paxton, R. J., Disayathanoowat, T., Krongdang, S., & Chantawannakul, P. (2018). Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *Journal of Insect Physiology*, 105, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2017.12.010>

Slaa, E. J., Sánchez, L. A., Malagodi-Braga, K. S., & Hofstede, F. E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37(2), 293–315.

<https://doi.org/10.1051/apido:2006022>

Sokolova, Y. ., Dolgikh, V. ., Morzhina, E. ., Nasonova, E. ., Issi, I. ., Terry, R. ., ... Vossbrinck, C. . (2003). Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* Gen. Nov., Comb. Nov. (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(3), 159–172. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2003.10.004>

Suwannapong, G., Maksong, S., Seanbualuang, P., & Benbow, M. E. (2010). Experimental infection of red dwarf honeybee, *Apis florea*, with *Nosema ceranae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(4), 361–364. <https://doi.org/10.1016/J.ASPEN.2010.07.003>

Tay, W. T., O'Mahony, E., & Paxton, R. (2005). Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(6), 505–513. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00057.x>

Teixeira, É. W., Guimarães-Cestaro, L., Alves, M. L., Message, D., Martins, M. F., Fernández, C., & Serrão, J. E. (2018). Spores of *Paenibacillus* larvae, *Ascospaera apis*, *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in bee products supervised by the Brazilian Federal Inspection Service. *Revista Brasileira de Entomologia*, 62(3), 188–194.

Teixeira, E. W., Santos, L. G. dos, Sattler, A., Message, D., Alves, M. L. T. M. F., Martins, M. F., ... Francoy, T. M. (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3), 250–254. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2013.09.002>

Terry, R. S., Smith, J. E., Bouchon, D., Rigaud, T., Duncanson, P., Sharpe, R. G., & Dunn, A. M.

- (1999). Ultrastructural Characterisation and Molecular Taxonomic Identification of *Nosema granulosis* n. sp., a Transovarially Transmitted Feminising (TTF) Microsporidium. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(5), 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb06066.x>
- Thon, M. R., & Royse, D. J. (1999). Partial beta-Tubulin Gene Sequences for Evolutionary Studies in the Basidiomycotina. *Mycologia*, 91(3), 468. <https://doi.org/10.2307/3761347>
- Tsai, S.-J., Lo, C.-F., Soichi, Y., & Wang, C.-H. (2003). The characterization of microsporidian isolates (*Nosematidae*: *Nosema*) from five important lepidopteran pests in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00035-1)
- Varela, A. L. (2019). Anfibios del Ecuador. Retrieved May 31, 2019, from <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/GeografiaClima/>
- Vávra, J. (1976). Development of the Microsporidia. In *Biology of the Microsporidia* (pp. 87–109). https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3114-8_3
- Vit, P., Vargas, O., López, T., & Valle, F. (2015). Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6), 502. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2015.04.079>
- Vivas Espinosa, J. L. (2015). *Prevalencia de nosema (Nosema spp.) en colmenares de la región norte y centro norte del Ecuador*. (Quito: Universidad Central del Ecuador). Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7811>
- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., & Owen, R. L. (1994). Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 426–461. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.426>
- Wille, A. (1979). Phylogeny and relationships among the genera and subgenera of the stingless

bees (Meliponinae) of the world. *Revista de Biología Tropical Internacional* , 27(2), 241–277.

Wu, J. Y., Smart, M. D., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(3), 326–329. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.005>

Zhu, X., Wittner, M., Tanowitz, H., Cali, A., & Weiss, L. (1994). Ribosomal RNA Sequences of *Enterocytozoon bieneusi*, *Septata intestinalis* and *Ameson michaelis*: Phylogenetic Construction and Structural Correspondence. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41(3), 204–209. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb01498.x>