



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

TRABAJO DE GRADUACIÓN:

ESTUDIO MOLECULAR DE LA PREVALENCIA PARASITARIA CAUSADA POR LOS
HONGOS *Nosema ceranae* y *Nosema apis* EN ABEJAS DE LA MIEL *Apis mellifera* Y
Meliponinos EN PANAMÁ

MELLANY G. RAMOS CARVAJAL

8-919-1705

Trabajo de graduación presentado como
requisito para optar por el Título de
Licenciatura en Biología con Orientación
en Microbiología y Parasitología

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“ Estudio molecular de la prevalencia parasitaria causada por los hongos *Nosema ceranae* y *Nosema apis* en abejas de la miel *Apis mellifera* y *Meliponinos* en Panamá

Por:

Mellany G, Ramos Carvajal _____

Tesis presentada a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para

optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y

Parasitología

Asesor: Prof. Cecilio Puga _____

Jurado: Dr. Hermógenes Fernández- Marín _____

Jurado: Prof. Fermín Mejía _____

Dedicatorias y Agradecimientos

DEDICATORIA

"Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light" - Albus Dumbledore

Para todas las personas que me alentaron para poder terminar. En especial a mis guías espirituales que estén donde estén se sienten orgullosos de lo que he logrado.

Mellany G. Ramos Carvajal

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi mamá Gisel Carvajal por formarme como toda una profesional, a mi papá Rolando Ramos (Q.E.P.D.) ya que ha sido el principal guía espiritual que he tenido desde que comenzó esta travesía. A mis hijos de 4 patas Tinker Bell, Romano y Harry Potter que siempre han estado en todo momento sin importar absolutamente nada, a mis hermanas Maheli y Madián, y sobrinos Thiago, Danna, Issabella y Gianna. A mi confidente Héctor que ha estado compartiendo conmigo a lo largo de esta travesía.

A mi compañera de carrera y amiga de vida Eyleen que me ha ayudado siempre intelectual y sentimentalmente para seguir mi camino y no rendirme a pesar de todos los obstáculos que se nos han presentado en estos últimos años. A mi compañera Ana del laboratorio de insectos sociales la cual también me apoyó mucho en mi estadía en el laboratorio.

Al creador de este proyecto tan importante para nuestro país al Dr. Hermógenes Fernández-Marín y a la Dra. Yuliana Christopher por apoyarme y ayudarme en todo lo que ahora sé sobre el proyecto abejas, sin ellos dos nada hubiera sido posible, me han brindado mucho de su conocimiento y siempre estaré inmensamente agradecida ya que sé qué han debido tener mucha paciencia conmigo porque soy de esas personas que se ahogan en un vaso lleno de agua.

Al laboratorio de insectos sociales del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT- AIP) que me brindó sus instalaciones para la realización de mi investigación.

A mis profesores asesores Cecilio Puga y Humberto Cornejo de la escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología por ayudarme y aconsejarme en la escritura de mi tesis.

A la Ingeniera Ruth Del Cid del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) y al Sr. Gilberto Bolaños por ayudarme con la colecta de las muestras para mis análisis y así completar mi proyecto.

Gracias al Dr. Luis Mejía por haberme apoyado facilitandome algunos materiales para este proyecto.

Muchas gracias

ÍNDICE

ÍNDICE

Dedicatorias y Agradecimientos	3
RESUMEN	8
Capítulo I	10
Revisión bibliográfica	10
1.1 INTRODUCCIÓN	11
MARCO TEÓRICO	14
1.2 MARCO TEÓRICO	15
1.2.1 La apicultura en Panamá	15
1.2.2 Patógenos de abejas productoras de miel	16
1.2.3 Generalidades de Apis mellifera	17
1.2.4 Generalidades de Meliponinos	18
1.2.5 Nosema spp	18
1.2.6 Ciclo biológico de Nosema spp	18
1.2.8 Generalidades de Nosema ceranae	20
1.2.9 Generalidades de Nosema apis	20
1.2.10 Varroa destructor	21
1.3 OBJETIVOS	22
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	22
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
Capítulo II	23
Metodología	23
2. METODOLOGÍA	24
2.1 Colecta de en apiarios, enjambres y nidos de Apis mellifera y Meliponinos	24
2.2 Extracción y conteo de Varroa destructor	25
2.3 Identificación y conteo de conidias de Nosema spp.	26

2.4 Extracción de ADN	27
2.4.1 E.Z.N.A. Tissue DNA Kit	27
2.4.2 QIAamp R Fast DNA Tissue Kit:	28
2.4.3 Extracción de ADN con Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB):	29
2.5 Cuantificación con el NANODROP	30
2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
2.6.1 Ciclo de termociclador específico para <i>Nosema ceranae</i>	31
2.6.2 Ciclo para <i>Nosema apis</i>	31
2.6.3 Ciclo combinado para <i>Nosema ceranae</i> y <i>Nosema apis</i>	31
2.7 Electroforesis en gel agarosa	32
2.8 Purificación Rápida de PCR (QIA quick PCR purification protocol)	32
2.9 Secuenciación tipo Sanger	33
Capítulo III	34
Resultados y Discusión	34
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1 Colecta de abejas <i>Apis mellifera</i> y Meliponinos en apiarios, enjambres silvestres y nidos en distintos lugares de Panamá.	35
3.2 Diagnóstico y prevalencia parasitaria de <i>Nosema ceranae</i> y <i>Varroa destructor</i> en abejas de la miel <i>Apis mellifera</i> y Meliponinos en Panamá	36
3.4 Análisis de la distribución de los patógenos <i>Nosema ceranae</i> y <i>Nosema apis</i> en colmenas y enjambres de <i>Apis mellifera</i> , y nidos manipulados de Meliponinos en distintas provincias de Panamá	38
Conclusiones	44
Recomendaciones	46
BIBLIOGRAFÍA	48

Resumen

RESUMEN

La nosemosis es una enfermedad de las abejas *Apis mellifera* causada por dos tipos de microsporidios: *Nosema ceranae* y *Nosema apis*. Los cuales pueden causar la mortalidad o morbilidad de las abejas, produciendo un importante impacto económico por la pérdida de las colmenas o por su bajo rendimiento en la producción de la miel. La nosemosis es una enfermedad intestinal causada por estos microsporidios produciendo el debilitamiento de las colmenas, reduciendo así el número de las obreras, poca colecta de polen, néctar, agua, y pérdida de producción de miel. Las abejas productoras de miel *Apis mellifera* y *Meliponinos* se vuelven más susceptibles a los parásitos y posteriormente la enfermedad se manifiesta. La elección de los diagnósticos de laboratorio correctos es importante para determinar la prevalencia de estos parásitos. El objetivo de esta investigación fue coleccionar muestras de abejas productoras de miel *Apis mellifera* en apiarios, enjambres y nidos de *Meliponinos* para determinar la presencia de *Nosema ceranae* y *Nosema apis* en el país, a través de estudios morfológicos de las conidias, y por estudios moleculares mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la confirmación y asimismo determinar la diversidad genética por medio de secuenciación. Estos resultados incluyen datos de muestras de abejas de 40 colmenas y 18 enjambres de *Apis mellifera* y 7 nidos de abejas meliponinas productoras de miel. Nuestros resultados mostraron que 13 positivas molecularmente. Estas muestras positivas pertenecían a colmenas de apiarios y enjambres silvestres de *Apis mellifera*, pero ninguna de nidos *Meliponinos*. Las muestras fueron positivas para *Nosema ceranae* y ninguna para *Nosema apis*. Se concluyó que la identificación mediante microscopía es el método más económico para conocer si una colmena o enjambre están siendo parasitados por *Nosema* y el método molecular mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es el

más confiable para detectar la nosemosis y el más sensitivo para distinguir las dos especies entre *Nosema ceranae* y *Nosema apis*, los cuales son los agentes causales de esta enfermedad.

Capítulo I

Revisión bibliográfica

1.1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad causada por infecciones de *Nosema ceranae* no puede considerarse un problema regional, sino global, como lo indica la alta prevalencia de este parásito en múltiples hospederos en distintos países. Este tipo de nosemosis no sólo afecta a abejas individuales y a las colonias, sino que también tiene efectos significativos en la producción de miel. Además del colapso de las colonias, con el fin de proporcionar a los apicultores estrategias de control adecuadas es fundamental continuar estudiando los potenciales efectos de la infección por *Nosema ceranae* en las colonias de abejas de diferentes regiones geográficas. Actualmente, los datos existentes indican que *Nosema ceranae* " es un patógeno de gran importancia para los apicultores por los efectos perjudiciales sobre las colonias de abejas (Higes y col., 2010). La nosemosis como enfermedad presenta una variedad de manifestaciones influenciada por varios factores, algunos de los cuales se entienden y otros quedan por identificar. De hecho, los signos clínicos producidos por esta enfermedad han recibido poca atención, y la reducción del número de obreras de las colonias y manchas de diarrea en las cajas de las colmenas, son generalmente, considerados como indicadores de la enfermedad para los investigadores y los apicultores.

Se han realizado estudios con distintos enfoques, incluyendo un estudio realizado en Europa que mostró el papel central de la abeja reina en la evolución de la infección por *N. ceranae* en las colonias y el efecto del reemplazo de reinas jóvenes en la disminución de infecciones. Además, sugieren que dicho efecto debería tomarse de referencia para estudios sobre la evolución de la nosemosis en diferentes zonas geográficas donde las reinas son frecuentemente reemplazadas (ya sea de forma natural o por el apicultor). Otros estudios resaltan las posibles repercusiones de diferentes prácticas apícolas, como las medidas

profilácticas y las técnicas de manipulación utilizadas y sus efectos sobre las infecciones causadas por *N. ceranae* en el norte de Europa (Hedtke y col., 2011) y en las áreas mediterráneas (Hatjina y col., 2011). Además, algunos estudios han reportado que las abejas forrajeras tienen más probabilidades de infectarse con *Nosema* que las abejas jóvenes que no forrajeen (L'Arrivée, 1963). Por el contrario, otro estudio en el que se evaluaron varios parámetros no encontró diferencias significativas en la extensión de la infección por *N. ceranae* entre las abejas de colmenas y las abejas forrajeras (Traver y col., 2012), aunque dos de los parámetros evaluados, el número promedio de copias de ADN y el recuento promedio de esporas de *N. ceranae* fue mayor en las abejas forrajeras.

La implementación de técnicas moleculares en el estudio de la nosemosis ha permitido realizar estudios para evaluar el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción por PCR (RFLP) y detectar el sitio de endonucleasa de restricción único de *N. apis* y de *N. ceranae* presente en el Gen rnta 16S, para diferenciar con éxito entre ambas especies de microsporidios (Gisder y col., 2010). También, se desarrolló un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para optimizar la cuantificación y la detección simultánea de *N. apis* y *N. ceranae*, utilizando abejas individuales o muestras combinadas, lo que permitió la detección de una sola espora de *Nosema* spp. por abeja, demostrando ser una prueba mucho más sensitiva que los procedimientos de microscopía estándar (Bourgeois y col., 2010). Un estudio realizado en Italia implementó la PCR multiplex basado en el gen 16S RNA con cebadores específicos de especie para la detección y diferenciación entre *N. apis* y *N. ceranae*, estableciendo la prevalencia de *N. ceranae* en *A. mellifera*, en poblaciones de abejas melíferas que no presentaban signos clínicos evidentes de enfermedad (Papini y col., 2017). Igualmente, en un estudio realizado en varias regiones de Irán, en el que se realizaron análisis por PCR múltiple

para la detección y diferenciación de la infección por *N. apis* y *N. ceranae* en *A. mellifera* y la determinación de la prevalencia de *Nosema* spp, encontrando sólo la presencia de *N. ceranae* (Khezri y col., 2018). Recientemente, un estudio fue realizado en la República de Panamá sobre la identificación molecular y la incidencia de *N. ceranae* en abejas productoras de miel *A. mellifera*. Los resultados del estudio indicaron la presencia de nosemosis en apiarios ubicados en las provincias de Colón, Chiriquí, Herrera, Panamá, Panamá Oeste, Veraguas y Darién (Matos, 2021). Específicamente, se encontró una prevalencia del 27% para *N. ceranae* también se reveló que existe una relación positiva en las coinfecciones de los parásitos *N. ceranae* y *Varroa destructor*.

Previos estudios resaltan la utilidad de implementar la aplicación de otras herramientas moleculares como la PCR de punto final, la PCR en tiempo real y la secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de virus y caracterización de la respuesta antiviral en abejas melíferas (Remnant y col., 2017). También, se ha estudiado la dinámica de transmisión y vías de infección de enfermedades virales (Bernardi y Venturino, 2016), y sobre el rol que juegan los ácaros *Varroa*, como vectores biológicos o mecánicos de varias enfermedades virales que afectan las abejas melíferas (McMenamin y Genersch, 2015). La alta sensibilidad y versatilidad de las técnicas y los análisis moleculares, apoyados con estudios de microscopía clásica facilitan la comprensión de la dinámica de enfermedades asociadas a las abejas melíferas y los meliponinos, específicamente la nosemosis.

MARCO TEÓRICO

1.2 MARCO TEÓRICO

Las abejas constituyen uno de los grupos de insectos más abundantes y beneficiosos para el hombre, ya que al visitar las flores en busca de néctar y polen intervienen en los procesos de polinización de la mayoría de las plantas junto con otros grupos de insectos, siendo los responsables de aproximadamente un 35% de la producción global de alimentos. También, las abejas realizan la polinización de aproximadamente el 90% de las especies silvestres de plantas lo que representa un efecto importante en el sostenimiento medioambiental. Además, las especies como *Apis mellifera* y las abejas nativas sin aguijón (*Meliponinos*) ofrecen importantes productos tales como la miel y productos beneficiosos como el polen, la cera y el propóleo.

1.2.1 La apicultura en Panamá

La apicultura es una actividad que se realiza en casi todo el mundo y que tiene una gran importancia ecológica y socioeconómica para la humanidad. Dicha actividad es de gran beneficio dado los productos que se pueden obtener, entre los que destacan principalmente la miel, el polen, el propóleo, la jalea real y la cera., asimismo, las abejas ofrecen beneficios ecosistémicos al polinizar una gran variedad de especies de plantas, incluyendo los árboles de los bosques y cultivos agrícolas (Herrera E. y L. Sánchez 2011).

Las abejas africanizadas llegaron a Panamá en la década de los 80's causando graves problemas a los apicultores nacionales que no estaban preparados para manejarlas, ya que tienen un instinto de defensa muy agresivo. Antes del año 1982, Panamá era un país exportador de miel de abeja. Anualmente se producían 200,000 galones de miel y se contaba con más de 25,000 colmenas de abejas a nivel nacional. En el año 1982, el Cuerpo de Paz

preparó una 'Guía práctica sobre cómo manejar abejas africanizadas' recomendando que los apiarios debían estar a 200 metros de las casas, a 200 metros de las calles y a 3 kilómetros de ciudades y pueblos para evitar ataques a personas y animales domésticos. En consecuencia, a causa del poco conocimiento sobre el manejo de estas abejas en 4 años la apicultura nacional se vio gravemente afectada al perder el 80% de su actividad, específicamente una considerable reducción del número de apicultores y de colmenas. Desde el año 1987 la producción miel en Panamá se ha ido recuperando poco a poco, y actualmente se producen 40 mil galones de miel al año producida por aproximadamente 325 apicultores a nivel nacional. Datos compartidos por el Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA). La miel panameña es catalogada de tipo artesanal y de alta calidad, y además cada provincia produce miel con diferentes colores, olores y sabores.

La meliponicultura, actividad que ha ganado auge recientemente en países de la región, no es común en Panamá, pero ha incrementado en los últimos años en provincias como Chiriquí, Herrera, Coclé y Panamá. Su reintroducción no solo supondría una nueva práctica productiva para el país, sino que reforzaría el cuidado de las especies nativas de abeja y aseguraría la protección de un conocimiento tradicional.

1.2.2 Patógenos de abejas productoras de miel

Las abejas son insectos sociales, lo cual las convierte en un blanco llamativo para los patógenos, tales como las bacterias, los hongos y los virus. Así, los efectos de las infecciones por estos patógenos han sido reportada como una posible causa asociada con la pérdida masiva de las colmenas a nivel mundial (Chen y Siede,2007)

1.2.3 Generalidades de *Apis mellifera*

Apis mellifera es una especie de abeja que pertenece al orden Hymenoptera, compuesta de cuatro alas membranosas, recibe científicamente el nombre de (*Apis mellifera*, Apidae) (Vergara,1980).

Clasificación taxonómica de las abejas *Apis mellifera*

Reino: Animal; Phylum: Arthropoda; Subphylum: Uniramia

Clase: Insecta; Subclase: Pterygota; División: Endopterygota; Orden: Hymenoptera;

Suborden: Apócrita Superfamilia: Apoidea; Familia: Apidae; Subfamilia: Apinae;

Género: *Apis*; Especie: *A. mellifera* (Morales, 1996).

Las abejas *Apis mellifera* poseen en la parte interior de la cabeza dos glándulas salivales y las glándulas lactíferas, conocidas en conjunto por formar el sistema glandular, cuyas secreciones le permiten formar el quilo, un alimento digerible y asimilable proporcionado a la abeja reina desde e su estado larvario y toda su vida, el cual también es consumido por las larvas de zánganos y de las obreras durante los 3 primeros días de su vida. Dicho alimento conocido como quilo es la jalea o manjar real. Además, poseen las glándulas cereras, localizadas en la parte inferior del abdomen y contienen una sustancia que convierte la miel en cera. En general, el sistema digestivo de la abeja comienza por la boca, continúa con el esófago que es un tubo largo continuando hasta el buche que es el recipiente donde la abeja guarda la miel, continúa el estómago caracterizado por tener pelos en su parte inferior y terminal que le sirven a la abeja para cernir el polen., seguido del intestino delgado y el grueso. Luego se encuentran los llamados tubos de Malpighi en 13 pares cuya función principal es facilitar y ayudar a disolver el alimento (Molina y Pardo, 1979).

1.2.4 Generalidades de *Meliponinos*

Las abejas sin aguijón también llamadas meliponinos se agrupan en la tribu Meliponini, de la familia Apidae (Roig-Alsina y Michener, 1993) a la cual pertenecen otras tribus estrechamente relacionadas como son la Tribu Apini (abejas melíferas), la Tribu Bombini (abejorros) y la Tribu Euglossini (abejas de las orquídeas). Los meliponinos se pueden distinguir del resto de las abejas de esta subfamilia debido a la marcada reducción de la venación de las alas anteriores, la falta de aguijón, por tener uñas simples y presentar una línea de pelos gruesos a modo de peine en el margen distal de las tibias posteriores (Wille, 1961).

1.2.5 *Nosema* spp

Los microsporidios son hongos unicelulares y parásitos intracelulares capaces de formar esporas (Franzen y Muller, 1999). Entre sus características principales podemos mencionar que carecen de mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi y peroxisomas, contienen uno o dos núcleos y un filamento polar en espiral localizado en el interior de las células, cuyo número y la disposición de las vueltas varían entre género y especies. (Romero, 2007).

Nosema es un género de microsporidios causante de la enfermedad conocida como nosemosis, enfermedad que afecta las funciones digestivas de las abejas produciendo desnutrición, envejecimiento y reducción de la longevidad (Fries y col.,1996).

1.2.6 Ciclo biológico de *Nosema* spp

Las abejas ingieren los microsporidios de *Nosema* spp en forma de esporas maduras a través de la comida o agua contaminada. Luego, estas esporas ingresan al sistema digestivo y se mueven al intestino medio donde se dan las condiciones favorables para su germinación.

Seguidamente, las esporas germinadas liberan su filamento polar insertándose en las células epiteliales y trasladan su espeso plasma hacia el interior de las células. (Chen y col.,2007). Luego, dentro de las células hospederas se reproduce el material genético y se sintetizan todos los componentes estructurales de las esporas utilizando la maquinaria bioquímica de las células hospederas (Romero,2007). Posteriormente, se ensamblan las esporas y estas realizan una lysis celular liberando todo su contenido (Higest y col., 2010a).

Se ha demostrado que *Nosema ceranae* se desarrolla dentro de las células del ventrículo de *Apis mellifera* de una manera similar a *Nosema apis* (Fries y col., 1996). En menos de tres días tras la infección, se pueden observar tanto esporas maduras como vacías dentro de la célula hospedadora (Higes y col., 2007), lo cual indica que la germinación de *Nosema ceranae* dentro de *Apis mellifera* es también intracelular y las nuevas esporas infectivas resultantes de un ciclo biológico en una célula huésped son capaces de transmitirse horizontalmente a una célula sana adyacente. Este hecho no parece producirse dentro del hospedador original, *Apis cerana* en el que se observan células infectadas aisladas rodeadas de células sanas, lo que supone una colonización del ventrículo más lenta y, por tanto, un daño más progresivo (Fries y col., 1996).

1.2.7 Historia del estudio molecular de *Nosema ceranae*

Nosema ceranae comenzó a estudiarse hace apenas 10 años y los estudios genéticos junto con la microscopía electrónica han sido las técnicas más utilizadas para analizar esta especie. Sin embargo, hasta el 2013 prácticamente todos los estudios genéticos que se llevaron a cabo se apoyaban en el estudio mediante PCR y la secuenciación de los genes ribosómicos. En particular de la subunidad pequeña del ADNr (SSU), esta zona del ADN ha sido utilizada

prácticamente en todos los trabajos sobre esta especie, desde su primera caracterización (Fries y col., 1996), pasando por su primera detección en Europa (Higes y col., 2005) hasta su dispersión a nivel mundial. Desde entonces cada vez más estudios se han basado en estos fragmentos para diagnósticos rápidos mediante PCR dúplex, cuantificación de cargas parasitarias mediante qPCR en colonias infectadas por *Nosema ceranae* y *Nosema apis* (Bourgeois y col., 2010), construcción de árboles filogenéticos y búsqueda de evidencias de reproducción sexual.

1.2.8 Generalidades de *Nosema ceranae*

Nosema ceranae es un microsporidio de transmisión horizontal (Higes y col., 2009) descrito por Fries y colaboradores en 1996 como parásito de la abeja oriental *Apis cerana*, y que ha ganado mucha importancia en investigación en la última década por su salto a un nuevo hospedador, *Apis mellifera* (Higes y col., 2005) y posteriormente a diferentes especies de abejorros. La descripción morfológica de las esporas de *Nosema ceranae* indica que son ovaladas de unos 3,3-5,5 x 2,3-3 μm , con un filamento polar de entre 18 y 23 vueltas que se enrolla alrededor de dos núcleos (Fries y col., 1996, 2006; Higes y col., 2007, 2008b; Chen y col., 2009a), característica que la hace fácilmente distinguible al microscopio electrónico de *Nosema apis*, el otro microsporidio parásito con el que coexiste (Martín-Hernández y col., 2012). Además, las esporas de *N. ceranae* tienen como característica particular, mayor resistencia al calor y a la desecación, en comparación a las otras especies del género *Nosema*.

1.2.9 Generalidades de *Nosema apis*

Nosema apis es un microsporidio que afecta a las células epiteliales del ventrículo de las abejas adultas; forma esporas que pueden sobrevivir durante un año en temperaturas de

congelación. Las características morfológicas de *N. apis* es un corpúsculo ovalado de 2 - 4 μm de ancho X de 4 - 6 μm de largo. La enfermedad clínica se caracteriza por la debilidad y la muerte prematura de las abejas, ya que en el intestino de un himenóptero pueden habitar hasta 50 millones de esporas de *Nosema*. La nosemosis causada por *N. apis* es un problema serio en los lugares donde las temperaturas bajas impiden a las abejas salir de la colmena para eliminar sus desechos (Fries et al., 2013).

1.2.10 *Varroa destructor*

Varroa destructor es una especie de ácaro considerado entre los patógenos de más relevancia en la apicultura, ya que las colmenas no tratadas contra este ácaro mueren. El ciclo de vida de *Varroa destructor* posee una fase forética (parásito adulto sobre las abejas adultas) y una fase reproductiva dentro de las celdas de las larvas, éstas pueden ser de obreras o de zánganos. El ciclo parasitario inicia cuando el ácaro se introduce en una celdilla unas horas antes de ser operculada (Zamora y Van Veen, 2007). Los daños causados por este parásito sobre las abejas ocurren al alimentarse directamente de la hemolinfa, mermando su desarrollo, su tiempo de vida y su capacidad productiva, también afectan indirectamente al funcionar como vector para los virus (Santillán-Galicia y col., 2014).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

1.3.1.1 Determinar la prevalencia de los parásitos de *Nosema ceranae* y *Varroa destructor* en abejas de la miel *Apis mellifera* y *Meliponinos* en Panamá

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.3.2. Colectar abejas *Apis mellifera* y *Meliponinos* en apiarios, enjambres silvestres y nidos en diferentes provincias de Panamá

1.3.2.2 Identificar los patógenos *Nosema ceranae* y *Nosema apis* en colmenas y enjambres de *Apis mellifera*, y nidos manipulados de *Meliponinos* mediante microscopía y pruebas moleculares

1.3.2.2 Analizar la distribución de los patógenos *Nosema ceranae* y *Nosema apis* en colmenas y enjambres de *Apis mellifera*, y nidos manipulados de *Meliponinos* en las diferentes provincias de Panamá

Capítulo II

Metodología

2. METODOLOGÍA

2.1 Colecta de en apiarios, enjambres y nidos de *Apis mellifera* y *Meliponinos*

Se colectaron muestras de ejemplares de *Apis mellifera* y *meliponinos* de distintos apiarios, enjambres y nidos manejados en diferentes lugares del país incluyendo 49 muestras en la provincia de Veraguas, 2 en Panamá Oeste, 9 muestras en la provincia de Herrera, 1 muestra de la provincia de Colón y 2 muestras de la Provincia de Chiriquí.

Las fechas en que se realizaron las colectas fueron escogidas considerando la época de cosecha de miel que realizaron los apicultores, las primeras colectas fueron realizadas a inicio del 2021 y las segundas colectas se realizaron a inicios y mediados del 2022.

Para las colectas de muestras de abejas de *Apis mellifera* de enjambres silvestres y colmenas en apiarios se utilizó la vestimenta adecuada que incluye el uso del traje de apicultura con velo, guantes y el ahumador cumpliendo con las medidas de seguridad y bioseguridad. Sin embargo, para la colecta de abejas de los nidos de *Meliponinos* se utilizó una vestimenta que cubriera los brazos y la cabeza, ya que al ser abejas sin aguijón son menos agresivas. Para ambas colectas se utilizaron tubos falcon de 50mL con alcohol al 70% y pinzas de punta fina para facilitar la manipulación y colecta de las abejas.

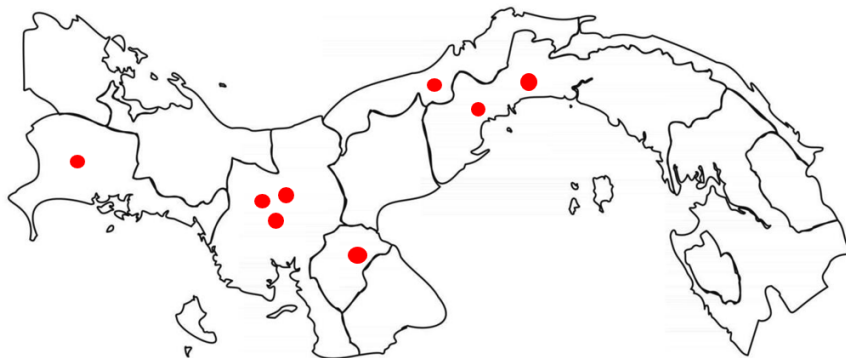


Figura 1. Mapa de Panamá mostrando con puntos rojos los sitios de muestreo en cinco provincias incluidas en este estudio.



Figura 2. Muestreo de nidos manipulados de *meliponinos* en la provincia de Herrera.

A) Piquera de un nido manejado de *meliponinos*. B) Extracción de meliponinos directo de la piquera. C) Imagen de una abeja *Melipona fenax*, tomada con estereoscopio. D) Imagen de abeja *Apis mellifera*, tomada con estereoscopio.

2.2 Extracción y conteo de *Varroa destructor*

Para la extracción del ácaro *Varroa destructor* se realizaron análisis de 65 tubos falcon que contenían las muestras de abejas con alcohol al 70%, los mismos fueron debidamente rotulados con el nombre del apiario o del enjambre. Luego, cada uno de los tubos fue agitado vigorosamente para facilitar que los ácaros se desprendieran de las abejas, luego se vertió el

contenido de cada tubo en un plato petri y fueron agitados nuevamente y utilizando pinzas de puntas finas (BIOQUIP) fueron observados bajo el estereoscopio. Se procedió a realizar el conteo de los ácaros con la ayuda de un contador manual y los ácaros encontrados se colocaron en un tubo eppendorf de 0.5mL que contenían alcohol al 70% y almacenados a temperatura ambiente.

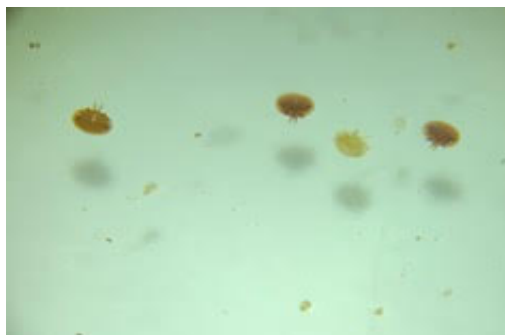


Figura 3. Imagen del ácaro *Varroa destructor* siendo observado con la ayuda de un estereoscopio.

2.3 Identificación y conteo de conidias de *Nosema spp.*

Para la identificación y conteo de *Nosema spp.* se procedió a extraer el intestino delgado de 20 abejas por colmena con la ayuda de una pinza con punta fina (BIOQUIP) y cada intestino se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL que contenía 1000 μ L de agua destilada. Luego, se procedió a macerar vigorosamente con pistilos estériles para evitar la presencia de grumos en el macerado. Seguidamente, se agregaron 49 mL de agua destilada estéril a tubos falcon de 50 mL y se agregó 1 mL del macerado de intestino. Dichos tubos fueron mezclados vigorosamente en el vortex y se extrajo 10 μ L que fueron colocados en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de conidias de *Nosema* existentes en la dilución. Se realizó la observación en el microscopio óptico (Leica DM300) utilizando los objetivos 4x para la

exploración y para la visualización de las conidias se utilizó el objetivo 40x. Finalmente, se realizaron los conteos (Cantwell,1970) de cada muestra para ser guardados en la base de datos.

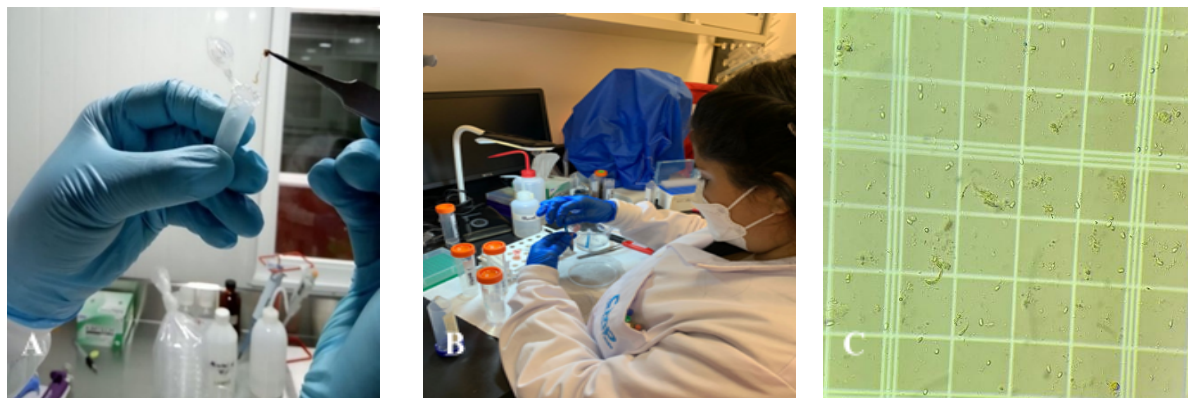


Figura 4 Procesamiento de abejas: A) Extracción de intestino delgado de 20 abejas. B) Macerado del intestino delgado con un pistilo en un tubo eppendorf de 1.5mL. C) Observación bajo el microscopio óptico (Leica DM300) de conidias de *Nosema ceranae* en cámara neubauer.

2.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se probaron distintos protocolos de extracción, entre los cuales utilizamos kits comerciales: E.Z.N.A. Tissue DNA, QIAamp[®] Fast DNA Tissue Kit y Bromuro de hexadeciltrimetilamonio CTAB

2.4.1 E.Z.N.A. Tissue DNA Kit

Se macero el tejido y se transfirió a un tubo de microcentrífuga (Thermo |EC) de 1.5 mL, luego se añadió 200µL de TL buffer, 25 µL de proteinasa K y se agitaron con vortex (MARCA). Luego se incubaron a 55°C utilizando un baño seco con agitador (Labnet International, Inc) durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugaron a máxima velocidad por 5

min, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5mL, al cual se añadió 220 μ L de BL buffer. Luego se mezcló empleando el vortex, se realizó una incubación a 70°C por 10min. Luego de la incubación, se añadieron 220 μ L de etanol, y se insertó una mini columna de ADN HiBind en un tubo de 2mL. Seguidamente, se añadió la muestra dentro de la mini columna junto con el precipitado formado, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto en la microcentrífuga (Labnet International, Inc). A continuación, se añadieron 500 μ L de BL buffer diluido con isopropanol, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min y se descartó el filtrado. La mini columna se insertó en un nuevo tubo de 2 mL y se agregaron 700 μ L de ADN Wash buffer diluido con etanol para centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos. Se repitió el paso anterior, se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos para eliminar los restos de etanol presentes en la muestra. Finalmente,, la mini columna se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 100-200 μ L de buffer de elución, se calentó a 70°C durante 2 min, se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto y luego se almacenaron los tubos a -20°C.

2.4.2 QIAamp^R Fast DNA Tissue Kit:

Se realizó la extracción de ADN empleando el QIAamp^R Fast DNA Tissue Kit, primeramente, se pesaron cada una de las muestras utilizando una balanza analítica (Explorer OHAUS), luego se transfirieron a los tubos a los cuales se les añadió los siguientes tampones y enzimas: 200 μ L de AVE, 40 μ L de VXL, 1 μ L de Dx reagent, 20 μ L de proteinasa K y 4 μ L de Rnase A. Luego, cada uno de los tubos se agitaron vigorosamente utilizando el vortex por 5 min, se incubaron en el baño seco (Labnet International, Inc) a 55°C durante 1 hora a 1000 rpm. Luego se añadieron 265 μ L de Buffer MVL, se agitaron con vortex para homogenizar completamente las muestras. Seguidamente, el homogeneizado obtenido se transfirió a una

mini columna, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto, se cambió el tubo colector y se añadió 500 µL de buffer AUW1 para centrifugar a 14000rpm durante 1 min, luego se repitió el proceso solo que se agregó el buffer AW2. Finalmente, se colocó la mini columna en un tubo nuevo y se centrifugó durante 2 minutos, se eliminó el eludido y se añadieron 30 µL de agua grado molecular (Fisher Scientific), se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

2.4.3 Extracción de ADN con Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB):

Se siguió un protocolo de extracción a base de CTAB (Doyle & Doyle 1990), con modificaciones. Se tomaron tubos eppendorf de 1.5 mL con los macerados de los intestinos delgados de las abejas de cada muestra y se centrifugaron durante 5 minutos a 14,000 rpm. Luego, se descartó el sobrenadante y luego se añadieron 500 µL de buffer de lysis Bromuro de hexadeciltrimetilamonio CTAB (Teknova), se mezclaron vigorosamente con la ayuda de un vórtex, se incubaron a 55C° en un baño seco durante 1 hora con agitación de 4500rpm. Posteriormente, se añadieron 300 µL de fenol cloroformo (SIGMA), se centrifugaron por 14,000 rpm a 5 minutos, se tomaron 250 µL de sobrenadante y se transfirieron a tubos nuevos que contenían 250 µL de isopropanol (Thermo Scientific), se incubaron a - 20 °C durante 30 minutos, se centrifugaron a 14,000rpm por 7 minutos. Luego, se descartó el isopropanol, se agregaron 800 µL de etanol frío, se centrifugaron durante 1 min a 14000rpm. Finalmente, se descartó el etanol, se retiró el exceso con una micropipeta y se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 minutos, y se resuspendieron los pellets con 30 µL de agua de grado molecular (MARCA).

2.5 Cuantificación con el NANODROP

Se utilizó el NANODROP 2000 (Thermo Scientific) para la cuantificación de ADN de las muestras obtenidas y así determinar la concentración y la calidad del ADN extraído de cada una de las muestras.

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la detección de *Nosema ceranae* mediante PCR utilizando los primers específicos;

Nosema ceranae; (5'- CCCGGTCATTCTCAAACAAAAA3') y

(5'-CGGCGATGTGATATGAAAAT-3')

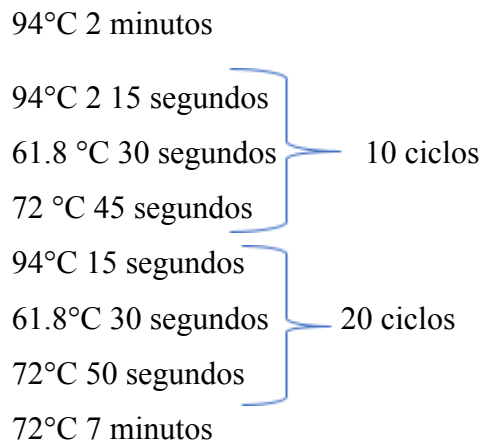
Nosema apis (5'-GGGGGGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG3') y

(5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTIONTGTGTA3').

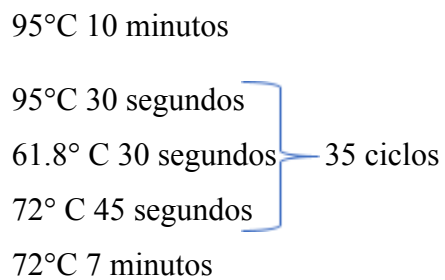
La receta utilizada en la PCR para la detección de *Nosema ceranae* y *Nosema apis* fue la siguiente: 29 μL de H_2O , 4.5 μL de Buffer de PCR, 1.5 μL de MgCl_2 , 0.5 μL de dntps, 0.2 μL de enzima Taq polimerasa, 2.5 μL de coral load Buffer, 0.4 μL de Primer Forward y 0.4 μL de Primer Reverse para obtener un volumen total de 39.5 μL por reacción de PCR..

Luego se colocaron las muestras en el termociclador (BIO ROAD T100TM Thermal Cycler), previamente ajustado con las siguientes condiciones de amplificación:

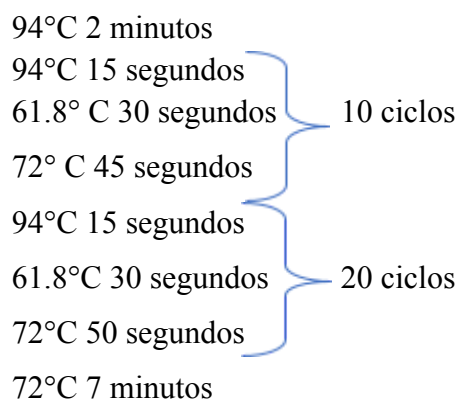
2.6.1 Ciclo de termociclador específico para *Nosema ceranae*



2.6.2 Ciclo para *Nosema apis*



2.6.3 Ciclo combinado para *Nosema ceranae* y *Nosema apis*



2.7 Electroforesis en gel agarosa

Para la electroforesis se preparó la solución tampón TAE 1x(Tris-Acetate-EDTA) y la preparó la cámara de electroforesis, (Thermo Scientific). El gel de agarosa al 1.0% (LONZA) se preparó al pesar en una balanza analítica 0.6g de agarosa mezclado con 60 mL de TAE 1x luego se vierte en una botella autoclavable con un agitador magnético y se lleva punto de ebullición. Luego, se tiñó el gel con 4 μ L de SYBR Safe Gel Stain (Invitrogen), se vertió el gel líquido en la bandeja con las peinetas hasta que solidificó, luego se retiraron las peinetas cuidadosamente, verificando que no se rompieran los pocillos. Posteriormente, para cargar las muestras se llenó la cámara electroforética con TAE 1x y se tomaron 5 μ L de cada amplicón y se mezclaron con 2 μ L de Gel pilot Loading Dye, también se colocó el marcador de peso molecular de 100 pb (invitrogen). La electroforesis se corrió a 92 voltios por un tiempo de 30 min y se visualizaron las bandas en el transiluminador (BIO-RAD) El tamaño del producto de PCR (amplicon) para *N. ceranae* era de 218-219 pares de bases (pb).

2.8 Purificación Rápida de PCR (QIA quick PCR purification protocol)

Las muestras que resultaron positivas se purificaron previamente antes de secuenciar . Primero, se midió el volumen de cada muestra de PCR amplificado, una vez obtenido este volumen se multiplicó por 5, el resultado de esta multiplicación es el volumen por agregar de buffer PB a cada muestra. Luego se transfirió a una spm en un tubo de 2mL y se centrifugó por 1 minuto a 13,000rpm, se descartó el sobrenadante, devolviendo la columna nuevamente al tubo. Se añadieron 750 μ L de buffer PE y se centrifugó por 1 minuto a 13,000rpm. Se descartó el eludido, luego se colocaron las mini columnas en nuevos tubos eppendorf de 1.5mL, se añadieron 30 μ L de agua molecular y se centrifugaron durante 1 minuto por

13,000rpm. Como último paso se volvió a cuantificar la concentración y calidad del ADN en el NanoDrop.

2.9 Secuenciación tipo Sanger

Luego de realizar la purificación de los amplicones, el volumen total de cada uno se divide entre el total de cada muestra y se rotuló cada uno como forward y reverse, y se agregó 5 µL de cada primer. Posteriormente fueron enviados a la empresa Macrogen Inc. Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron los softwares GENEIOUS y Fig Tree la información disponible en la base de datos del Centro Nacional para la información de la biotecnología (NCBI).

Capítulo III

Resultados y Discusión

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Colecta de abejas *Apis mellifera* y *Meliponinos* en apiarios, enjambres silvestres y nidos en distintos lugares de Panamá.

Se colectaron en total 40 colmenas, 18 enjambres de *Apis mellifera* y 7 nidos de *meliponinos*. Las colectas de abejas de este estudio se realizaron en 5 provincias, las cuales incluyeron colectas en el apiario del Instituto de Investigaciones Científicas de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), el apiario del Instituto Nacional de Agricultura (INA), el apiario el Rodeo ubicados en la provincia de Veraguas y el apiario de la Facultad de Ciencias Agronómicas la Universidad Autónoma de Chiriquí. Se colectaron abejas de enjambres silvestres en las provincias de Panamá Oeste, Veraguas, Herrera y Colón y colectas en distintos nidos de *Meliponinos* en la provincia de Herrera.

Cuadro 1. Resumen de las diferentes localidades de apiarios, enjambres y nidos de abejas colectadas.

Provincia	Apiario	N° Colmenas, enjambres y nidos manejados colectados
Veraguas	Instituto de investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología INDICASAT AIP	22 colmenas <i>Apis mellifera</i>
Veraguas	Instituto Nacional de Agricultura	5 colmenas <i>Apis mellifera</i>
Veraguas	Rodeo	13 colmenas <i>Apis mellifera</i>
Veraguas	Rio de Jesús	9 enjambres <i>Apis mellifera</i>
Panamá Oeste	Ollas arriba, Tinajones y Chame	2 enjambres <i>Apis mellifera</i>
Herrera	Ocú	2 enjambres de <i>Apis mellifera</i>
Herrera	La Canoa, La Candelaria, Las Minas y Ocú	7 nidos manipulados de <i>meliponinos</i>
Colón	Buena aventura	1 enjambre de <i>Apis mellifera</i>
Chiriquí	Facultad de Ciencias Agronómicas	2 enjambres de <i>Apis mellifera</i>

3.2 Diagnóstico y prevalencia parasitaria de *Nosema ceranae* y *Varroa destructor* en abejas de la miel *Apis mellifera* y Meliponinos en Panamá

Se colectaron y analizaron 58 muestras de abejas de *Apis mellifera* y 7 muestras de abejas *Meliponinos* de diferentes provincias (Figura 2). Se analizaron microscópicamente un total aproximado de 1,500 muestras de abejas, de las cuales 14 muestras resultaron positivas para la detección de *Nosema spp*, mientras que 13 muestras resultaron positivas molecularmente para *Nosema ceranae*. Cabe señalar que se repitieron los análisis hasta 4 veces por cada muestra positiva. Nuestros resultados confirman que ambas metodologías son apropiadas para identificar *N. ceranae*, como ha sido previamente aceptado y descrito por (Higes y col., 2005). Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos en los análisis moleculares para la detección de *N. apis*. Las muestras que resultaron positivas provenían de apiarios y enjambres de las provincias de Panamá Oeste, Colón y Veraguas. Así, del total de muestras analizadas el 20% de muestras resultaron positivas para *Nosema ceranae*, con un 22.2% de prevalencia en enjambres y un 26% de prevalencia en colmenas.

Para la identificación de la presencia del ácaro *Varroa destructor* en las abejas colectadas se encontró que 34 muestras estaban infectadas por *Varroa destructor* y 31 muestras resultaron libres de *Varroa destructor*. Así, del total, el 53.1% de muestras resultaron infectadas por *V. destructor*, con un 22.2% de prevalencia en enjambres y un 61% de prevalencia en colmenas colectadas. Nuestro resultado es similar a los encontrados en un estudio realizado en Chile en época de verano, en el cual se encontraron una prevalencia de *Varroa destructor* del 58 % (Hinojosa & González, 2004). Así, nuestros resultados soportan el estudio previo realizado en Panamá, (Matos y col., 2020) con una prevalencia del 27% para *Varroa destructor*, a diferencia de los estudios realizados en Costa Rica (Moreno y col.,2021) los cuales obtuvieron

una prevalencia del 100% de infección en las muestras analizadas. Mientras que nuestros resultados indican que los nidos de Meliponinos analizados en este estudio no están siendo infectados por ninguno de los tres patógenos estudiados, es decir 0% de prevalencia para *Nosema ceranae*, *Nosema apis* y *Varroa destructor*.

Otros estudios realizados en países con condiciones climáticas y geográficas distintas, muestran resultados diferentes, que van entre leves y fuertes porcentajes de prevalencia para *Nosema ceranae*, en reportes similares en Italia (Papini y col., 2017) y en Canadá (Emsen y col., 2015), en Serbia 73 a 93% en el 2012 (Stanimirović y col., 2019), China 61%, Taiwán 73%, Japón 75% de prevalencia (Chen y col.,2007), en Zacatecas México ellos encontraron que la prevalencia fue de 23%(Medina-Flores y col., 2014).

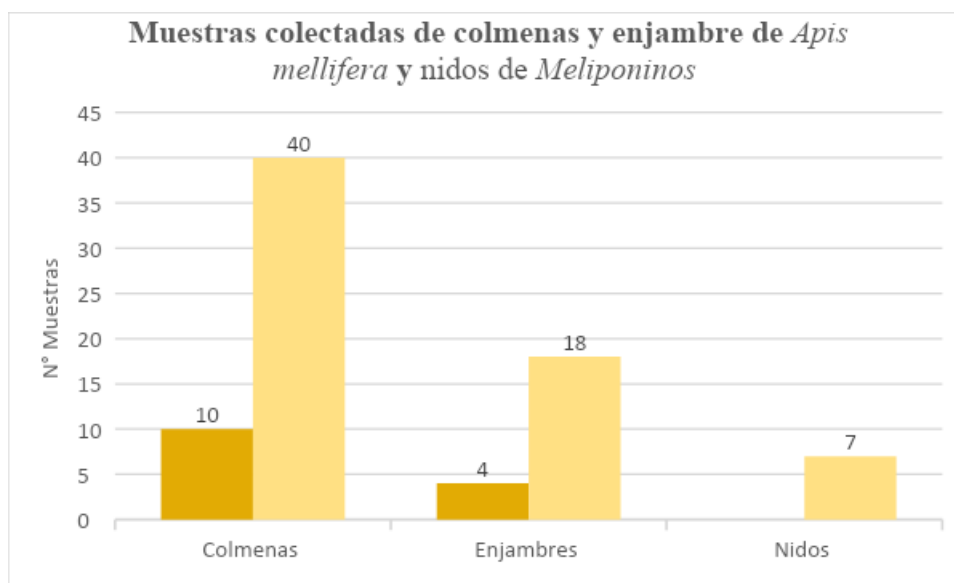


Figura 5. Muestras colectadas de colmenas y enjambres de *Apis mellifera* y nidos de *Meliponinos* en diferentes apiarios del país. La barra de color crema muestra la cantidad de muestras analizadas y la barra de color amarillo muestra la cantidad de muestras positivas por colmenas, enjambres y nidos.

3.3 Electroforesis en Gel

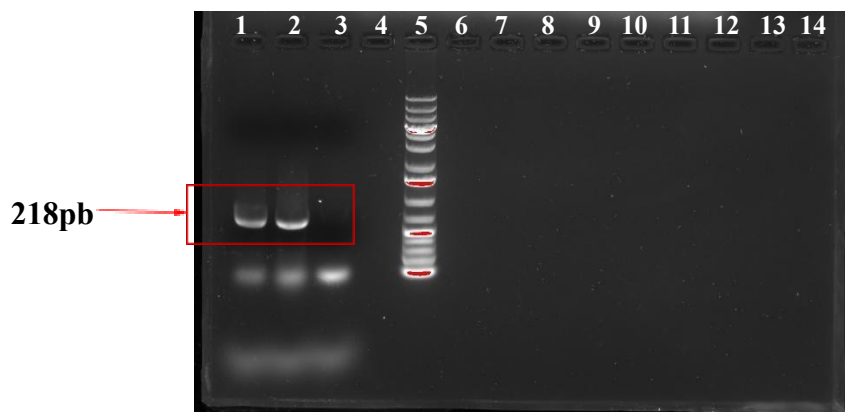


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Pocillo 1 y 2 se encuentran las muestras positivas para *Nosema ceranae* con la amplificación a un tamaño de 218pb, muestras de Chame y Chiriquí, respectivamente. El pocillo 6 muestra la escalera de peso molecular 100 pb.

3.4 Análisis de la distribución de los patógenos *Nosema ceranae* y *Nosema apis* en colmenas y enjambres de *Apis mellifera*, y nidos manipulados de *Meliponinos* en distintas provincias de Panamá

Nuestros resultados indican que el patógeno *Nosema ceranae* presenta una distribución a lo largo del país en apiarios como el Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de alta Tecnología, Rodeo ubicados en Veraguas así también en enjambres de distintas zonas del país en provincias como Panamá Oeste, en lugares como Ollas Arriba, Chame y Elegido, Veraguas en Río de Jesús, y Colón ubicado en Buena Aventura. En este sentido nuestros resultados indican una importante diferencia en el porcentaje de infección, esta diferencia podría explicarse por el número de colectas por provincias ya que el número de colectas no fue uniforme en cuanto al número de apiarios y enjambres colectados por provincia

3.5 Secuenciación tipo Sanger

Se secuenciaron 13 muestras que resultaron positivas para la detección molecular de *Nosema ceranae*, de las cuales se obtuvieron 11 secuencias de buena calidad para realizar el análisis filogenético de Máxima Verosimilitud (Figura). Todas las muestras secuenciadas fueron comparadas y revisadas en la base de datos de NCBI GenBank utilizando blast donde las 11 muestras mostraron una similitud desde el 97% hasta el 100% con *Nosema ceranae*

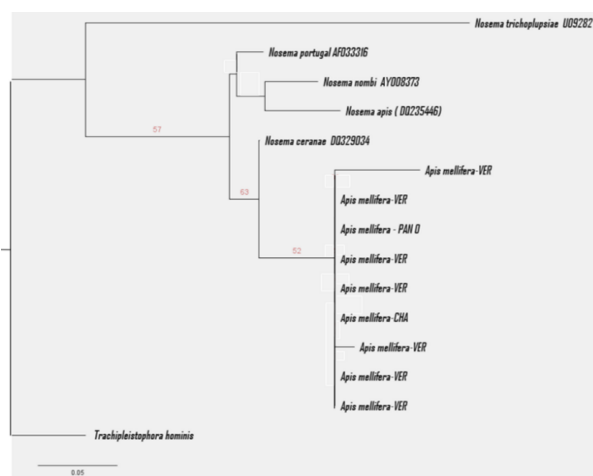


Figura 7 Árbol filogenético de *Nosema ceranae* identificado en abejas *Apis mellifera* inferido mediante análisis de Máxima Verosimilitud. El outgroup es *Trachipleistophora hominis*, los valores de bootstrap se ubican en las ramas del árbol.

3.6 Prevalencia de *Nosema ceranae* y *Varroa destructor* en *Apis Mellifera* y Meliponinos del país

De las 13 colmenas analizadas del apiario El Rodeo la prevalencia de *Nosema ceranae* fue de 7.69%, mientras que en el apiario del Instituto de investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología la prevalencia fue de 31.80%, posiblemente esta diferencia se debe a la diferencia en la cantidad de colmenas colectadas en cada apiario, ya que del apiario de

INDICASAT se colectaron 22 colmenas y solamente 5 colmenas del apiario del Instituto Nacional de Agricultura, resultando con un 0% de prevalencia.

Los resultados de la prevalencia de *Nosema ceranae* en los enjambres silvestres, se encontró que el enjambre colectado en Río de Jesús, en la provincia de Veraguas mostró una prevalencia del 33.3%, mientras que de los 9 enjambres de *Apis mellifera* colectados, encontramos 100% de la prevalencia en los enjambres de Ollas arriba y en Chame. Sin embargo, sólo se colectó un enjambre en cada lugar y está limitada cantidad podría explicar su alta prevalencia comparada con las otras localidades colectadas. Los enjambres colectados en Ocú, Universidad Autónoma de Chiriquí y Buena Ventura en Colón resultaron con 0% de prevalencia, ya que no fue posible detectar conidias de *Nosema ceranae*.

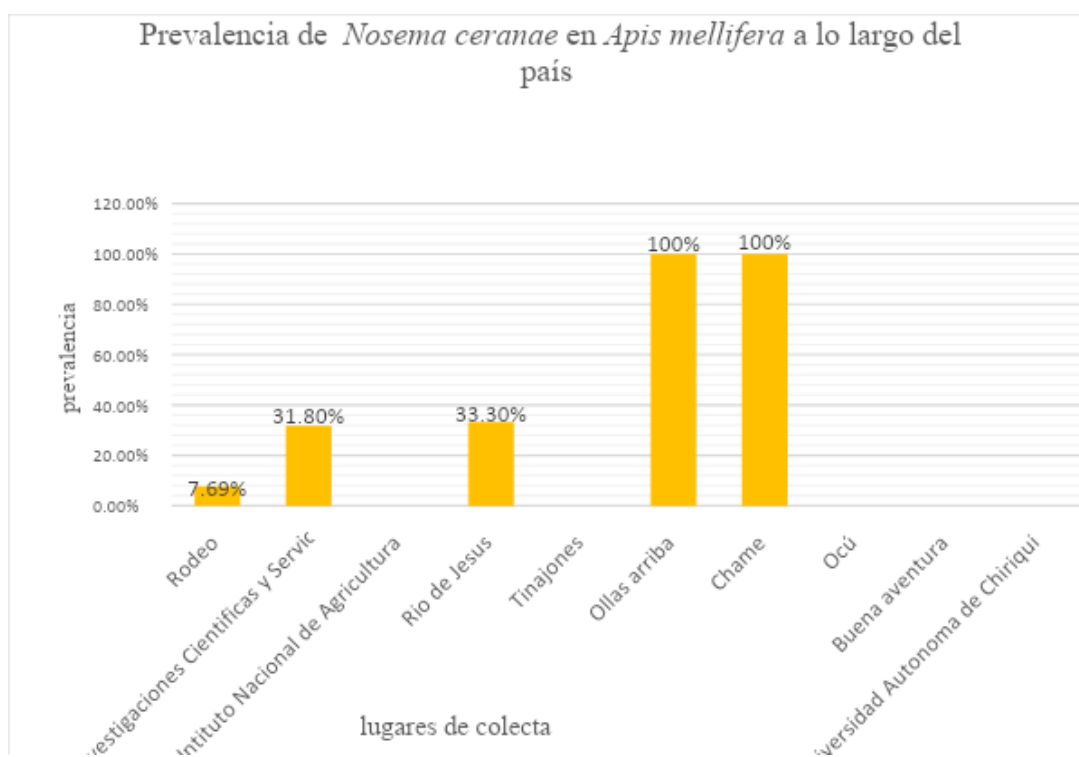


Figura 8. Prevalencia de *Nosema ceranae* en muestras de *Apis mellifera* colectadas en distintos lugares de la República de Panamá

3.7 Prevalencia de *Varroa destructor* en *Apis mellifera* en Panamá.

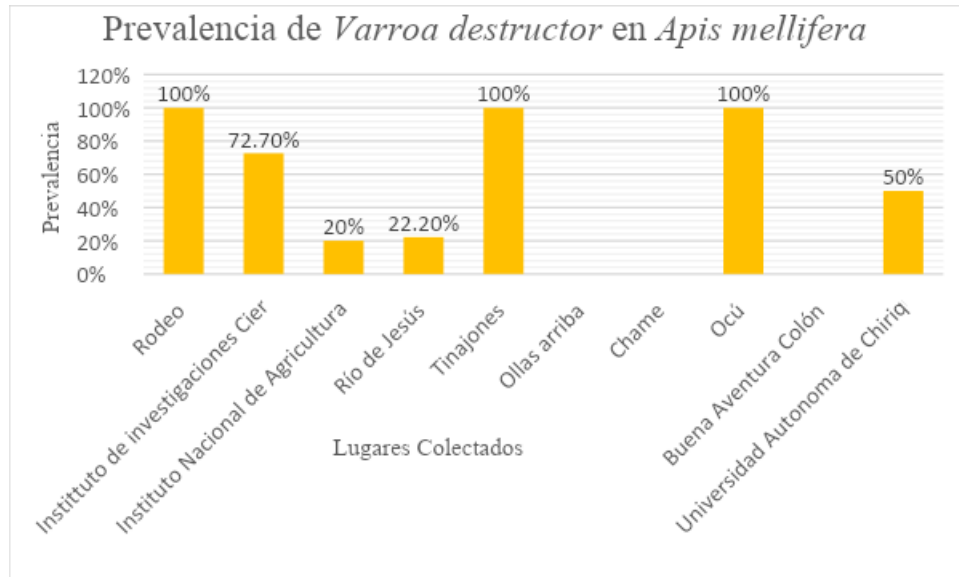


Figura 9. Prevalencia de *Varroa destructor* en *Apis mellifera* colectadas en distintos lugares de Panamá.

De las 13 muestras colectadas del apiario del Rodeo en Veraguas, 22 muestras de INDICASAT-AIP, y 5 colmenas muestreadas del apiario del INA encontramos que hay una alta prevalencia en estos apiarios, indicando que el número de colmenas pudiese no afectar la alta prevalencia determinada para *V. destructor*. Mientras que las muestras colectadas en Río de Jesús con 9 enjambres colectados resultaron con una importante prevalencia, mientras que para el enjambre colectado en Tinajones de Panamá Oeste mostro una prevalencia del 100%, para los 2 enjambres colectados en Tinajones de Panamá Oeste mostro una prevalencia del 100%, para los 2 enjambres colectados en Ocú resultaron con una prevalencia del 100%, al igual que para los 2 enjambres colectados en la Universidad Autónoma de Chiriquí con una prevalencia del 100%.

3.8 Prevalencia de *Nosema ceranae* y *Varroa destructor* en nidos manipulados de *Meliponinos* colectados en distintos lugares de la provincia de Herrera.

No encontramos *Nosema ceranae*, ni tampoco *Varroa destructor* en las abejas de la Tribu

Meliponini (abejas sin aguijón) son escasos los estudios y en especial a nivel de Sudamérica y Centroamérica (Nunes-Silva y col., 2016).

3.9 Interacción parásito-parásito en colmenas de *Apis mellifera* en distintos apiarios del país

Nuestros resultados indican que de las 40 muestras obtenidas en las distintas provincias del país solo 8 colmenas se encontraban sanas, es decir no presentaron ningún tipo de infección.

Estos resultados se diferencian de lo encontrado en el 2021 (Matos y col., 2021), en el cual encontraron una mayoría colmenas sanas, seguido en cantidad por las 8 colmenas infectadas con *Nosema ceranae*, las colmenas infestadas con *Varroa destructor* son el tercer grupo en orden de nivel de infección alto con 31 colmenas y el grupo de coinfección posee el menor número de colmenas

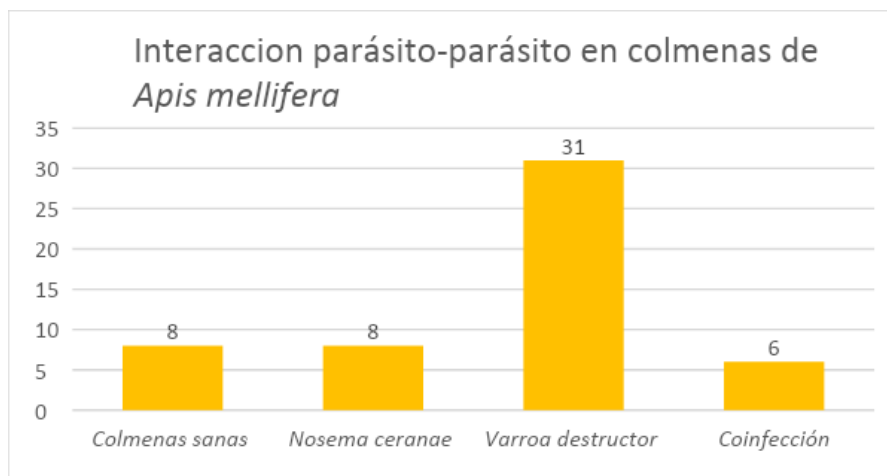


Figura 11. Interacción parásito- parásito en colmenas de *Apis mellifera*

3.10 Interacción parásito-parásito en enjambres silvestres de *Apis mellifera*

De nuestros resultados de los 16 enjambres colectados en las distintas provincias del país, encontramos 6 colmenas sanas, sin ningún tipo de infección, mientras que 5 colmenas resultaron infectadas con *Nosema ceranae*, 6 enjambres estaban infectadas con *Varroa destructor* y 1 solo enjambre presentó coinfección con ambos parásitos.

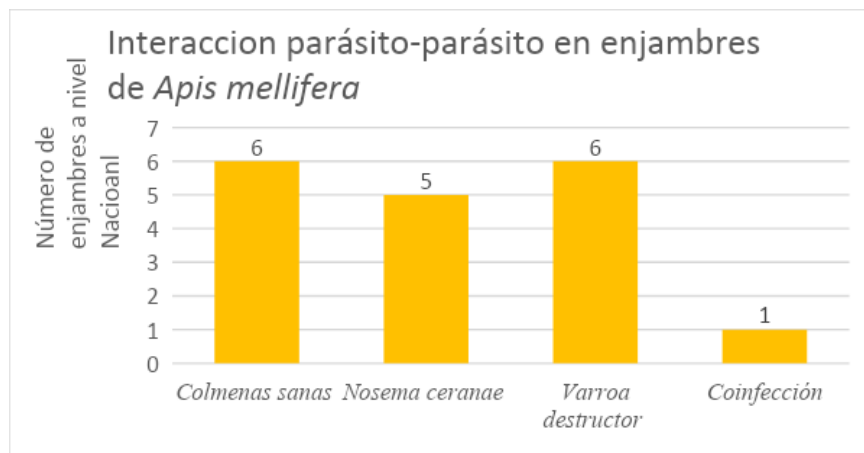


Figura 12. Interacción parásito-parásito en enjambres de *Apis mellifera*

Conclusiones

CONCLUSIONES

- El análisis filogenético demostró que el parásito *Nosema ceranae* está circulando, pero no *Nosema apis* en abejas productoras de la miel *Apis mellifera* tanto en apiarios como en enjambres silvestres a lo largo del país.
- Se encontró que en la provincia de Veraguas el parásito tiene una prevalencia mayor en comparación a las otras provincias, tanto en apiarios como enjambres tomando en cuenta el número de colecta, ya que se observó que en algunos lugares la prevalencia fue del 100% pero se recolectaba menos muestras a comparación de las demás.
- Si bien la base del estudio no era el ectoparásito *Varroa destructor* se tomó en cuenta ya que pudimos observar que sí existe una coinfección entre *Nosema ceranae* y *Varroa destructor*; y estas tienen una correlación positiva ya que se observa que pueden estar coinfectadas y que su efecto no es letal para las colmenas o los enjambres.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

- Se recomienda aumentar el estudio de las muestras en enjambres y colmenas de *Apis mellifera*, así como también en nidos de *Meliponinos* ya que de este último grupo no hay investigaciones previas en nuestro país, y se necesita tener un historial actualizado de los lugares con mayor prevalencia y para así mantener a los apicultores actualizados sobre el estado sanitario de sus colmenas y ellos puedan desarrollar estrategias para evitar la infección de estos parásitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bernardi, S., & Venturino, E. (2016). Viral epidemiology of the adult *Apis mellifera* infested by the *Varroa destructor* mite. *Heliyon*, 2(5), e00101.
- Bourgeois, A. L., Rinderer, T. E., Beaman, L. D., & Danka, R. G. (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), 53–58.
- Cantwell, G E (1970) Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal* 110(6): 222-223.
- Chen, Y. P.; Siede, R. 2007. Honeybee Viruses. *Advances in Virus Research*, 70(7).33-80.
- Emsen, B., Guzman, E., Hamiduzzaman, M., Eccles, L., Lacey, B., Ruiz, R. & Nasr, M. (2015). Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honeybee colonies. *Parasitology Research*, 115(1), 175-181
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Franzen, C.; Müller, A. 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of Microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 243-285
- Fries, I.; Feng, F.; Da Silva.; Slemenda, S. B.; Pieniazek, N. J. 1996. *Nosema ceranae* Sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of Asian honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *E. Journal of Protist.* 32, 356-365.
- Fries, I; Marie-Pierre C, Yan-Ping C, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon PD, Martín-Hernández R, Natsopoulou M, Paxton JR, Tanner G, Webster CT,

- Williams GR. Standart methods for *Nosema* research. Journal of Apicultural Research. 2013. 53(1):1-28.
- Gisder, S., Hedtke, K., Mockel, 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.
 - Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzis, D., et al. (2011) Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. J Invertebr Pathol 108: 131–134.
 - Hedtke, K., Jensen, P.M., Jensen, A.B., and Genersch, E. (2011) Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalk- brood. J Invertebr Pathol 108: 167–173.
 - Herrera E & L. Sánchez, “Importancia de la biodiversidad apícola para la seguridad alimentaria de Costa Rica”, in Apicultura y su impacto en la seguridad alimentaria, San José CR , , 2011, pp. 66.
 - Higes, M., Martín, R. y Meana, A. (2006) *Nosema ceranae* , un nuevo parásito microsporidio de las abejas melíferas en Europa . *J. Invertebr Pathol* 92: 93 – 95
 - Higes, M., Martín, R., Sanz, A., Álvarez, N., Sanz, A., García-Palencia, P., Meana, A., 2005. El síndrome del despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. Vida Apícola, 133: 15-21.
 - Higes, M., Martín-Hernández, R., and Meana, A. (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie 41: 375–392.

- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Barrios, L., et al. (2008b) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10: 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., et al. (2009a) Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* 1: 110–113.
- Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Bailón, E. G.; González-Porto, A. V.; Barrios, L.; Meana, A. 2007. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2659-2669.
- Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Garrido-Bailón, E.j González-Porto, A. Vi García-Palencia, P.; Meana, A.; Bernal, J. L. 2009_ Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in profesional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 110-113.
- Hinojosa, A., & González, D. (2004). Prevalence of parasites in *Apis mellifera* L. in beehives of dry coastal and interior of Sixth Region, Chile. *Parasitología Latinoamericana*, 59(3–4), 137–141.
- Khezri, M., Moharrami, M., Modirrousta, H., Torkaman, M., Salehi, S., & Rokhzad, B. (2018). Molecular detection of *Nosema ceranae* in the apiaries of Kurdistan province, Iran. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 9(3), 273–278.
- L'Arrivée, J.C.M. (1963) The effect of sampling sites on *Nosema* determination. *J Insect Pathol* 5: 349–355.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, EG, Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., and Higes, M. (2012) Microsporidia infecting *Apis mellifera* :

- coexistence or competition. ¿*Nosema ceranae* reemplaza a *Nosema apis*?. *Environ Microbiol* 14: 2127 – 2138
- McMenemy, A. J., & Genersch, E. (2015). Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 121–129.
 - Medina-Flores, C. A., Guzmán-Novoa, E., Espinosa-Montaño, L. G., Uribe-Rubio, J. L., Gutiérrez-Luna, R., & Gutiérrez-Piña, F. J. (2014). Frecuencia de varroosis y nosemosis en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en el estado de Zacatecas, México. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 20(3), 159–167.
 - Molina A. y Pardo, A. (1979). La abeja africanizada, algunos aspectos sobre su origen, biología, taxonomía y manejo. VI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Universidad Nacional de Colombia. pp 1-61.
 - Morales, S. R. (1996). Proyecto de Miel Orgánica. Apicultura Orgánica. Motozintla, Chiapas, noviembre 1996. Primer encuentro Intercontinental. In: *Memorias AGROECOLOGIA*. 16 p.
 - Moreno, E., Calderón, R., Ramírez, M., & Van Veen, J. (2021). Prevalencia de *Nosema spp.* (Microsporidia: Nosematidae) en abejas africanizadas en Atenas, Costa Rica: número de esporas y nivel de infección durante la estación lluviosa. *Ciencias Veterinarias*, 39 (1), 1-18.
 - 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.
 - Matos, N. (2021). Identificación molecular de *Nosema ceranae* e incidencia de *Nosema Ceranae* y *Varroa destructor* en colmenas de abejas de miel *Apis mellifera* en la República de Panamá.

- Papini, R., Mancianti, F., Canovai, R., Cosci, F., Rocchigiani, G., Benelli, G., & Canale, A. (2017). Prevalence of the microsporidian *Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) apiaries in Central Italy. Saudi Journal of Biological Sciences, 24(5), 979–982.
- Pickard, P.S., and El-Shemy, A.A.M. (1989) Seasonal variation in the infection of honeybee colonies with *Nosema apis* Zander. J Apic Res 28: 93–100.
- Papini, R., Mancianti, F., Canovai, R., Cosci, F., Rocchigiani, G., Benelli, G. & Canale, A. (2017). Prevalence of the microsporidian *Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) apiaries in Central Italy. Saudi Journal of Biological Sciences, 24 (5), 979-982
- Remnant, E. J., Shi, M., Buchmann, G., Blacquiere, T., Holmes, E. C., Beekman, M., & Ashe, A. (2017). A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honeybee populations. Journal of Virology, 91(16), e00158–e00117.
- Roig-Alsina, A. y Michener, C. D. (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). University of Kansas Science Bulletin, 55, 123-173.
- Romero, R. 2007. Microbiología y parasitología humana. Argentina. Editorial Medica Panamericana S.A.
- Santillán-Galicia MT, Bal BV, Clark IJS, Alderson PG. Slow bee paralysis virus and its transmission in honeybee pupae by *Varroa destructor* Journal Apicultural Research. 2014. 53(1):146-154.
- Stanimirović, Z., Glavinić, U., Ristanić, M., Aleksić, N., Jovanović, N., Vejnović, B., & Stevanović, J. (2019). Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. Acta Veterinaria, 69(1), 1–31.

- Traver, B.E., and Fell, R.D. (2012) Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. J Invertebr Pathol 110: 408–410.
- Vergara, G. (1980) Apicultura. Campeche. Produzca miel de abeja, Primera Edición, México, 5-32 p.
- Wille, A. (1961). Las abejas jicotes de Costa Rica. Revista de la Universidad de Costa Rica, 22, 1-30.
- Zamora G, Van Veen JW. The reproductive rate of *Varroa destructor* in drone brood of Africanized honeybees. Journal of Apicultural Research. 2007. 46(3):140-143.