



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS

“Prevalencia de *Nosema* spp. en el abejorro nativo *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae) criado en cautiverio y en poblaciones silvestres de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas”

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

GUERRERO NERI ERIKA ARGELIA

Nº de cuenta. 41102256-9

Asesores:

MVZ. ADRIANA CORREA BENÍTEZ

DR. RÉMY VANDAME



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Este trabajo es para ti, mi gran amor, quien me dibuja en el alma una sonrisa, quien comparte los más bellos momentos, con quien he reaprendido la manera más sencilla de andar por la vida, con quien invento noches interminables, días resplandecientes, aquel que me recuerda que el reflejo mismo del amor está en la mirada de uno con la vida, quien juega a ser feliz, único y libre...Mi bien amado hijo Ik´.

Para ti mi compañera, maestra de la vida, quien me ha dado el primer amor, quien con sus manos crea y da el más cálido cobijo, de quien deseo honrar la vida, quien me ha aconsejado con su sabiduría a sonreírle a la vida, vida maravillosa, quien me enseña a ir tranquila, sin complicaciones, feliz, dichosa y sobre todo compartiendo lo que sólo ella desborda, amor infinito...Mi adorada Rosy, linda madre mía.

Para ti mi guerrero incansable, quien me enseña que por aquello que más se añora vale la pena esforzarse, quien me recuerda seguir en el sendero de todo lo que me haga feliz, quien me procura cada instante, quien me acompaña a inventar, quien me enseña que el arte de la vida se crea con diferentes técnicas, de quien he recibido la fuerza y la seguridad de que un mejor mañana es posible, sólo se requiere dedicarle a cada momento la mejor experiencia, sabiendo que nada es para siempre... Mi querido Ale, padre adorado.

Para ustedes mis únicos, especiales y adorados guías, de quienes he aprendido las formas más amables de la vida, de quienes he recibido los consejos más elocuentes y a la vez los más descabellados, quienes siempre han estado a cada lado mío, siempre cerca de mi corazón, quienes me han acompañado a lo largo de la vida, para llenarla de grandes momentos, de lecciones; con quienes siempre he podido apoyarme y caminar segura de que su amor siempre me alcanza...Mis entrañables Ernes y Edd, hermanos de mi vida y de mi alma.

Y para ellas, quienes logran alcanzar sus ideales, quienes no creen cuando les dicen “no puedes”, ellas que crían, las que educan con virtud, las que alzan la voz, las que se procuran, las que aman libremente, las que juegan, las que ríen, las que lloran, las que caen, las que están en duelo, las que levantan el vuelo; ellas, las que viven, quienes deben ser libres, estar a salvo y vivir en paz, quienes quieren seguir creando nuevos trazos en el camino de la vida...Mujeres del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Adriana Correa Benítez y al Dr. Rémy Vandame quienes dirigieron esta tesis, por su orientación, por su invaluable apoyo y por su gran empatía en una situación muy apremiante de mi vida. Dra. Adriana Correa, quien, gracias a sus maravillosas clases de apicultura en la Facultad de Veterinaria, reforzó en mí el gusto e interés por la apicultura, Dr. Rémy Vandame, quién me mostró el mundo fascinante de la conservación y cría de abejorros nativos, donde logré reconocer el “canto” de los abejorros.

A los jurados de mi examen la Dra. Mariana Carbajal Rodríguez, Dra. María Cristina Guerrero Molina, Dra. Itzel Vasquez Valencia y el Dr. Ricardo Anguiano Baez, por su amable asesoría, por su tiempo dedicado tanto para revisar las muestras como por brindarme el material para la visualización de estas, y por darme siempre su apoyo para la realización de este trabajo.

A cada uno de los miembros del equipo Abejas ECOSUR, por sus enseñanzas, por compartir los saberes y los sabores abejeros, especialmente a los “abejorrólogos” Ale por la disposición y apoyo con el muestreo de abejorros del cuarto de cría, Angélica; por revisar el primer borrador del protocolo y aconsejarme con esas primeras correcciones, Óscar y Edgar; por su disposición, gran apoyo y tiempo dedicado para la recolecta de abejorros en campo, y a Jorge por sus oportunos consejos.

Al Técnico parasitólogo David Velasco por la enseñanza, por las horas de trabajo en laboratorio dedicadas a la asesoría en el diagnóstico certero de las esporas de Nosema. Por encontrar soluciones para el análisis de las muestras y asesorarme en la realización de la técnica de tinción utilizada en este trabajo.

Al Dr. Eduardo Pérez, por la revisión de los datos y el análisis de estos.

Al Dr. Ángel García Hernández por su disposición y soporte para la realización de las técnicas en laboratorio.

A mis amigos, quienes fueron de gran ayuda y me brindaron su apoyo para la consecución del presente trabajo, con quienes se buscaron soluciones cuando parecía que las cosas estaban detenidas durante la pandemia; Eduardo Morales, mi querido amigo, tu gran apoyo siempre me ha acompañado y en este trabajo ha sido esencial y cual empujón de alegría para lograr el objetivo, Ana Araujo; quien buscó la manera de apoyarme con la visualización de las muestras al igual que Salvador Zamacona, quien me apoyó para que el trabajo siguiera avanzando y lograra culminar este proceso.

A mi familia que siempre ha estado al lado mío aconsejándome, y que durante este proceso me apoyó incansablemente. A mi hijo Ik´ quien intentaba leer artículos sobre Nosema y me sugería alegremente a tomar repetidos descansos, por ser paciente en las horas que dedicaba a este trabajo y por darme ánimos para alcanzar este objetivo.

Y a La Energía Vital que me mantiene presente, en asombro, con consciencia espiritual y con regocijo por aprender, conocer y valorar a seres tan importantes como los abejorros, quienes fueron estudio de este trabajo y los que su existencia es tan importante como la del Universo mismo.

CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Polinización como servicio ambiental.....	2
2.2. Importancia de las abejas.....	3
2.3. Declive de insectos polinizadores.....	4
2.4. Abejorros del género <i>Bombus</i>	7
2.5. Cría y comercialización de abejorros.....	10
2.6. Interacciones Parásito - Hospedero en ápidos.....	13
2.7. Problemas sanitarios importantes en abejorros.....	17
2.8. Microsporidios del género <i>Nosema</i> en ápidos.....	18
2.8.1. <i>Nosema apis</i>	22
2.8.2. <i>Nosema ceranae</i>	22
2.8.3. <i>Nosema bombi</i>	23
2.9. Nosemosis en abejorros.....	24
2.10. Detección y prevalencia de <i>Nosema</i> spp. en abejorros.....	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1. Objetivo general.....	34

4.2. Objetivos específicos.....	34
5. HIPÓTESIS.....	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
6.1. Recolección de abejorros.....	36
6.2. Preparación de las muestras.....	36
6.3. Microscopía.....	40
6.4. Análisis de los datos.....	40
7. RESULTADOS.....	42
7.1. Determinación de la prevalencia de <i>Nosema</i> spp. en abejorros nativos.....	42
7.2. Análisis microscópico de las muestras mediante Método de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori.....	48
8. DISCUSIÓN.....	51
9. CONCLUSIONES.....	55
10. REFERENCIAS.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadro de abreviaturas	VII
Cuadro 2. Valor de producción del sector agrícola en riesgo por la pérdida del servicio de polinización.....	6
Cuadro 3. Patógenos y parásitos de abejorros y abejas melíferas.....	16
Cuadro 4. Abejorros manejados (<i>B. ephippiatus</i>) del laboratorio de ECOSUR analizados para la detección de <i>Nosema</i> mediante microscopía.....	38
Cuadro 5. Abejorros silvestres (<i>B. ephippiatus</i>) colectados en campo, analizados para la detección de <i>Nosema</i> spp. mediante microscopía.....	38
Cuadro 6. Colonias de abejorros <i>B. ephippiatus</i> analizadas para la detección de <i>Nosema</i> spp. por microscopía, utilizando el método de Cantwell.....	43
Cuadro 7. Colonias de abejorros <i>B. ephippiatus</i> analizadas para la detección de <i>Nosema</i> spp. por microscopía, utilizando el método de tinción tricrómica de Gomori.....	44
Cuadro 8. Cuadro comparativo de prevalencias y porcentajes de detección mediante método de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori.....	45
Cuadro 9. A. Prevalencia detectada en los abejorros silvestres analizados mediante método de Cantwell B. Prevalencia detectada en los abejorros silvestres analizados mediante método tinción tricrómica de Gomori.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del ciclo de vida de los abejorros (género <i>Bombus</i>).....	8
Figura 2. Distribución de la riqueza de abejorros en México.....	10

Figura 3. Eversión del tubo polar durante la germinación de la espora.....	20
Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Nosema</i>	21
Figura 5. A-I. Identificación de esporas <i>Nosema</i> spp., mediante diversos métodos microscópicos y de tinción.....	30
Figura 6. Porcentajes de prevalencia y detección de <i>Nosema</i> spp. de los 3 grupos de colonias analizadas mediante método de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori.....	44
Figura 7. Prevalencia encontrada en las colonias manejadas del laboratorio de crianza de ECOSUR analizadas mediante método de Cantwell.....	45
Figura 8. Prevalencia encontrada en las colonias manejadas del laboratorio de crianza de ECOSUR analizadas mediante método de tinción tricrómica de Gomori.....	46
Figura 9. Porcentajes de prevalencia y detección de <i>Nosema</i> spp. en los abejorros silvestres analizados mediante método de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori.....	47
Figura 10. J-M. Micrografías de esporas de <i>Nosema</i> spp.....	49
Figura 11. N-Q. Micrografías de esporas de <i>Nosema</i> spp. de los montajes realizados mediante tinción tricrómica de Gomori.....	50

Cuadro 1. Abreviaturas

Abreviación	Definición
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ha	Hectáreas
t	Toneladas
MMt	Millones de toneladas

1 RESUMEN

GUERRERO NERI ERIKA ARGELIA. “Prevalencia de *Nosema spp.* en el abejorro nativo *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae) criado en cautiverio y en poblaciones silvestres de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas”, bajo la dirección de: MVZ. Adriana Correa Benítez y DR. Rémy Vandame.

El presente trabajo se centró en el diagnóstico mediante microscopía del parásito *Nosema spp.* en colonias manejadas del abejorro *Bombus ephippiatus* criados en El Colegio de la Frontera Sur y de abejorros silvestres de dos sitios del municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, utilizando la metodología de Cantwell y la técnica de tinción tricrómica de Gomori. Se analizaron 22 colonias del laboratorio de ECOSUR durante los meses de febrero, julio y agosto del año 2020, y 42 abejorros silvestres colectados en campo, para poder documentar la prevalencia del microsporidio en dichos individuos, documentar la eficacia de las dos técnicas de diagnóstico y, además, determinar si un tamaño de muestra de 3 individuos es adecuado para diagnosticar la enfermedad en estos abejorros. Las colonias de ECOSUR que fueron analizadas mediante la técnica de Cantwell presentaron una prevalencia de por lo menos el 68%; mientras que aquellas analizadas mediante tinción tricrómica de Gomori, presentaron una prevalencia de al menos el 91%. Por otro lado, los abejorros silvestres que fueron analizados mediante la técnica de Cantwell presentaron una prevalencia del 29% (sitio A y B) y aquellos analizados mediante tinción tricrómica de Gomori presentaron una prevalencia del 43% (sitio A) y del 100% (sitio B). Los resultados obtenidos en abejorros silvestres resultaron ser contrastantes con respecto a aquellos obtenidos por Gallot-Lavallée (2016), de igual forma con estos resultados se obtuvo una diferencia entre ambas técnicas, encontrando que la tinción tricrómica de Gomori es más eficaz para el diagnóstico del microsporidio; y también se pudo documentar que si bien, una muestra de 3 individuos permite diagnosticar la enfermedad; el porcentaje de detección es mayor cuando se realizó el análisis con 9 individuos, sin embargo, la realización de estudios que permitan estandarizar el tamaño de la muestra en abejorros para la detección de *Nosema spp.* son requeridos.

Palabras clave: *Bombus ephippiatus*, microsporidios, prevalencia, microscopía diagnóstica.

2 INTRODUCCIÓN

2.1. Polinización como servicio ambiental

La naturaleza provee de una gran variedad de beneficios que son esenciales para la existencia y el bienestar humano; estos beneficios mejor conocidos como servicios ecosistémicos, se concretan en servicios reales o funcionales una vez que la sociedad les asigna valores, permitiendo al ser humano reconocerlos, aprovecharlos o disfrutarlos y evaluar los beneficios que se obtienen (1), ya que de su evaluación y valoración se podrán implementar medidas que garanticen el buen aprovechamiento de los servicios, mismos que se han considerado estar en riesgo (2,3). Dichos servicios se han clasificado en 4 líneas funcionales, permitiendo determinar los recursos y sus cambios, así como su incidencia en el bienestar humano, los cuales se clasifican (dependiendo de su función) en: servicios de aprovisionamiento (ej. provisión de agua dulce, recursos maderables, alimentos, fibras y medicamentos), de soporte (reciclaje de nutrientes, formación de suelos), culturales (ej. recreación, inspiración espiritual, herencia cultural) y de regulación (ej. depuración del agua, regulación del clima, polinización) (1,3–5). Estos servicios además de proveer de recursos esenciales para la calidad de vida del ser humano constituyen entradas de gran valor para la economía local y global (5).

Dentro de los servicios ecosistémicos de regulación, que son aquellos beneficios obtenidos de la regulación de los procesos de los ecosistemas, sin pasar por procesos de transformación se encuentra la polinización, proceso fundamental que ocurre en plantas con flores (angiospermas), cuando se transfiere el polen de las flores presente en las anteras (parte masculina de la flor) hasta el estigma (parte femenina de la flor), ocurriendo así la fertilización, y con ello la obtención de frutos y semillas. La polinización como servicio de regulación es de gran importancia para los ecosistemas, ya que gracias a este proceso se

mantienen las poblaciones de gran diversidad de plantas silvestres, además de ser un servicio ecosistémico fundamental en la productividad agrícola (4,5).

La polinización puede ocurrir por acción del viento, la gravedad o el agua (vectores abióticos), así como por animales (vectores bióticos), donde se estima que más del 75% de los principales cultivos alimentarios y alrededor de un 86% de las especies silvestres de plantas con flores dependen de la polinización mediada por animales, tales como mamíferos, aves y una gran diversidad de insectos, los cuales todavía requieren ser más reconocidos por su valioso aporte a los servicios ecosistémicos (1,5,6).

2.2. Importancia de las abejas

De los insectos polinizadores, las abejas (Hymenoptera, Apoidea, Apidae) con más de 20,000 especies reconocidas, son consideradas a nivel mundial las más importantes, ya que gracias a sus servicios de polinización se argumenta que mantienen las poblaciones de gran variedad de plantas silvestres favoreciendo a la biodiversidad de los ecosistemas (7), además de su valor para la producción de semillas, recursos forrajeros y su contribución para la producción de cultivos alimentarios; algunos de los cuales dependen completamente o en cierto grado de la polinización mediada por animales, como son los cultivos de chile habanero (*Capsicum chinense*), girasol (*Helianthus annuus*), manzano (*Malus domestica*), almendro (*Prunus dulcis*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), canola (*Brassica spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), mango (*Mangifera indica*), sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Cucumis melo* L.), calabaza (*Cucurbita spp.*), guayabo (*Psidium guajava*), maracuyá (*Passiflora edulis*), vainilla (*Vanilla planifolia*), naranjo (*Citrus sinensis*) y jitomate (*Solanum lycopersicum* L.); por mencionar algunos. Varios de los cultivos alimentarios de los que se beneficia la humanidad han podido ser estudiados y se ha demostrado que con la presencia de ciertas especies de abejas aumentan la producción de sus frutos y semillas, así como su calidad (ej. tamaño, forma y peso) (2,5,8–11).

En este sentido, la creciente demanda de alimentos, así como el aprovechamiento de los distintos recursos obtenidos de las plantas polinizadas por estos insectos; son factores clave para el manejo y comercialización de diversas especies de abejas, teniendo a la abeja melífera occidental (*Apis mellifera* L.) como la principal especie manejada mundialmente (6,12,13). Sin embargo, dicha especie no es tan eficiente para polinizar todos los cultivos alimentarios por lo que también se requiere de otras especies de abejas, como la abeja oriental (*Apis cerana* F.), utilizada en muchos cultivos del sur y sureste de Asia (de donde es nativa), misma que ha logrado ampliar su distribución desde su introducción a Papúa Nueva Guinea en los años 70, estableciéndose también en las Islas Salomón y el Noreste de Australia (14,15). Abejorros del género *Bombus*, que han sido manejados comercialmente desde la década de los 80, siendo las especies *Bombus terrestris* y *Bombus impatiens* las más manejadas y distribuidas en Europa y Norteamérica respectivamente (16). También en gran parte de Canadá y Estados Unidos se comercializan diversas especies de abejas solitarias (género *Osmia*, *Megachile* y *Nomia*), demostrando su eficiencia en cultivos como el manzano (*Malus domestica*), la alfalfa (*Medicago sativa*), la canola (*Brassica spp.*) entre muchas otras (2,16–19), y otras especies de abejas solitarias como lo son las abejas carpinteras (género *Xylocopa*) que se manejan comercialmente en Sudamérica, principalmente para la polinización de varias especies de la Flor de la pasión (20,21).

Es por tal motivo, que el manejo adecuado de estas especies, así como su conservación es de vital importancia para el buen funcionamiento de los ecosistemas, para mantener las poblaciones de plantas silvestres y asegurar el tan valioso servicio de polinización que proveen para la alimentación mundial.

2.3 Declive de insectos polinizadores

Los insectos polinizadores y fundamentalmente las abejas están en declive mundialmente, dicho declive ha sido mayormente documentado en las regiones del mundo con mayor industrialización como los son el Noroeste de Europa y Este de América del Norte (5,7,11,22–24). Esta disminución se debe a múltiples factores como son: el cambio climático;

el cual ha ocasionado un desfase en la floración de plantas silvestres, no obstante, se ha postulado que el calentamiento global podría desacoplar los periodos de vuelo de las abejas y las floraciones, ocasionando así déficits de polinización y disminución de la diversidad de especies. Por otro lado, la intensificación del uso de la tierra en donde al existir un cambio en el uso de suelo provoca el deterioro y fragmentación del hábitat ocasionando la pérdida de sitios de anidación de diversas especies; la comercialización de monocultivos, los cuales dejan a las abejas con una pobre diversidad de recursos nectaríferos y poliníferos de los cuales depende su desarrollo, aunado a esto al uso desmedido de pesticidas que como bien se ha demostrado causa daños neurológicos a las abejas, deformaciones y diferencias significativas en el tamaño de los adultos, así como ser uno de los principales factores en el Síndrome del Colapso de las Colonias (CCD por sus siglas en inglés); la propagación de especies exóticas las cuales pueden competir tanto por zonas de anidación así como por fuentes de alimento y contribuir a la gran problemática de diseminación de patógenos que repercuten de manera importante en el desarrollo de las colonias, y como es bien sabido diversas enfermedades de las abejas pueden presentarse como coinfecciones (virus, parásitos, bacterias, microsporidios) sin poder identificar un único agente en el declive de las colonias, e incluso propagarse dentro y entre poblaciones de abejas manejadas y silvestres potencializando el riesgo de diseminación de patógenos, aún entre diferentes especies (2,7,10,22,25–31).

Los trabajos realizados por Bauer y Wing (2016), simulan el daño catastrófico que ocurriría por el declive de polinizadores en 18 regiones del mundo, poniendo como escenario los cultivos alimentarios que dependen de la polinización mediada por animales, arrojando datos de riesgo desde 0% (ningún riesgo) para cultivos como el azúcar en regiones del Oeste de Europa, pero no así para la región del Oeste de África donde representa más del 50% de riesgo, las cifras que exceden más del 50% (alto riesgo) son para los cultivos frutícolas, siendo este sector el más vulnerable a esta situación, en regiones del mundo como Europa, Asia y Norteamérica principalmente (**Cuadro 2**) (32).

Así mismo el trabajo realizado por Martínez-López *et al.*, (2021) propone un análisis a futuro de los cambios esperados en la distribución de especies de abejorros de Mesoamérica, planteando tres diferentes escenarios de cambio climático, mostrando una reducción esperada

en la idoneidad del hábitat y en la distribución de las especies, que va desde el 7% hasta el 67% para el año 2050 (33), datos de gran interés y preocupación sobre la amenaza que representa el cambio climático en estos insectos polinizadores, y que finalmente repercute de manera significativa en la seguridad alimentaria y el bienestar humano.

Con lo que se pone en evidencia el grave riesgo que representa el declive de los insectos polinizadores, en este caso las abejas que como ya se mencionó son de gran importancia, considerando así que la reducción de la diversidad de los insectos polinizadores puede traer graves consecuencias ecológicas y evolutivas para las plantas, una crisis en la seguridad alimentaria y en la función de los ecosistemas (22), por lo que se requiere seguir estudiando y valorando su función e importancia para poder implementar medidas políticas, culturales y sociales para su conservación.

Cuadro 2. Porcentaje del valor de producción del sector agrícola en el año 2004 en riesgo por la pérdida del servicio de polinización (las celdas sombreadas indican más del 30% en riesgo; la numeración en negrita indica más del 50% en riesgo). Tomado y modificado de Bauer y Wing (2016).

Región	Vegetales	Frutas	Frutos secos	Granos	Semillas oleaginosas	Azúcar y Otros cultivos
África Oriental	1.5	8.64	17.08	1.35	22.96	4.3
África Central	2.13	8.19	5.32	1.56	6.64	24.82
África Septentrional	8.73	35.75	21.62	0.95	7	0.37
África meridional	4.78	13.61	12.87	0.23	25	0.05
África Occidental	1.06	13.45	25.45	0.7	7.12	51.04
América Central y el Caribe	8.5	22.72	15.77	1.15	10.08	6.86
América del Norte	5.04	35.78	43.66	0.08	24.69	0.1
América del Sur	3.33	15.26	23.5	0.41	24.3	8.29
Asia central	7.15	44.55	42.86	0.16	20.96	0.08
Asia Oriental	5.95	51.88	7.11	0.3	24.63	0.16
Asia Meridional	7.86	34.49	12.9	0.27	24.41	2.91
Asia sudoriental	4.99	27.08	25.48	0.16	8.77	8.51
Asia Occidental	11.67	34.81	12.82	0.23	4.89	1.12
Europa Oriental	8.89	45.77	8.28	0.47	24.66	0.09
Europa Spentrional	3.18	47.7	0	0.35	24.51	0
Europa Meridional	7.79	26.67	24.22	0.23	1.13	3.04
Europa Occidental	5.15	22.72	1.6	0.21	24.49	0
Oceanía	4.21	29.02	26.12	0.16	21.9	5.53

2.4 Abejorros del género *Bombus*

De las 20 mil especies de abejas reconocidas, cerca de un 3% son sociales, es decir, que dentro de una colonia existen dos o más hembras adultas viviendo en un mismo nido, las hembras adultas que constituyen una colonia están conformadas por obreras; quienes realizan diferentes funciones como son: alimentación de las larvas, limpieza, pecoreo, etc., y una reina, misma que se encarga únicamente de la puesta de huevos, esto ocurre principalmente en especies de abejas de la tribu Apini y Meliponini (familia *Apidae*). En el caso de las reinas de abejorros (tribu Bombini), algunas especies de abejas carpinteras y abejas del sudor (*Xylocopinae* y *Halictinae*) respectivamente, al inicio de la fundación de la colonia además de la puesta de huevos, las reinas también se encargan de la recolecta de polen y néctar; mismo que servirá para alimentar a su descendencia (13,34); los abejorros son considerados así especies sub-sociales cuando la reina inicia la fundación de la colonia, para después convertirse en una colonia eusocial, con obreras y reina realizando sus funciones correspondientes (13).

Los abejorros presentan un ciclo de vida anual, para la mayoría de las especies de climas templados, la reina que ha salido de la hibernación a inicios de la primavera busca un nido donde fundar su colonia y comienza con el abastecimiento de fuentes de néctar y polen, durante las siguientes 4 semanas se encargará por completo del forrajeo y pondrá en un inicio alrededor de 6-8 huevos (13,35). Una vez que emergen las primeras obreras comienza la etapa social y cuando la colonia es lo suficientemente grande y está provista de suficientes recursos, la reina comienza la oviposición de sexuales (reinas vírgenes y machos), estos últimos abandonan el nido poco después de haber emergido, así pues para el final del otoño hembras y machos emergen de su nido y se aparean, para que las futuras reinas logren encontrar un lugar donde hibernar, mientras que la antigua reina, obreras y machos mueren al final de la temporada (**Figura 1**) (35).

Con cerca de 260 especies del género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae), los abejorros se encuentran distribuidos ampliamente en las regiones Oriental, Neotropical y Holártica, existiendo la mayor diversidad y riqueza de especies en las regiones templadas de Eurasia y Norteamérica (13,34,36). Para la región Neotropical se contemplan 42 especies conocidas

que se distribuyen a lo largo de México, Centroamérica y Sudamérica (13,37,38). De estas 42 especies reconocidas, Mesoamérica alberga cerca de 23 especies, mismas que se encuentran ampliamente distribuidas en el territorio nacional, principalmente en las regiones montañosas de clima templado en altitudes que oscilan entre 50 – 4300 msnm, así como zonas tropicales del país, con especies excepcionales como son *B. sonorus* y *B. morrisoni* que habitan en climas desérticos (39–41).

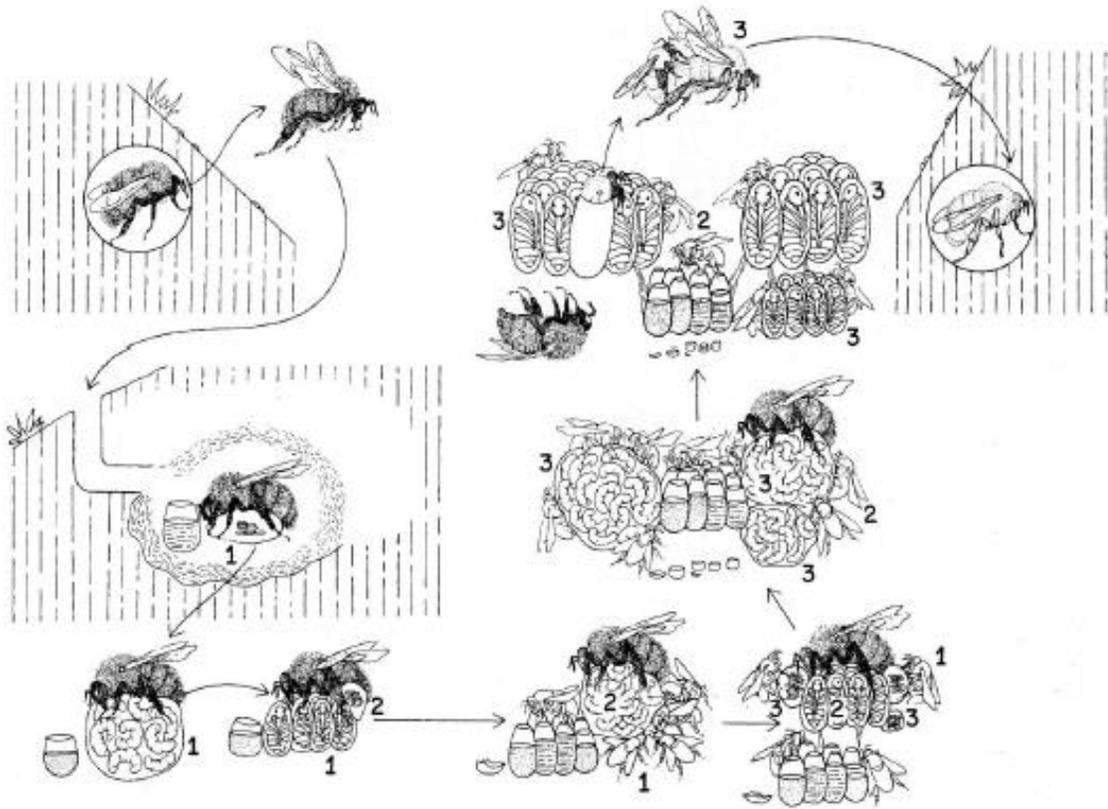


Figura 1. Diagrama del ciclo de vida de los abejorros (género *Bombus*). (izq) La joven reina emerge de la hibernación y funda una colonia, produciendo obreras en la etapa inicial y nuevas reinas y machos en la etapa terminal, quienes se aparean (der) y son las nuevas reinas que buscan un lugar donde hibernar, mientras que los machos mueren al final de la temporada. (1 y 2) muestra la producción de dos camadas de obreras y (3) una de reinas. Tomado de Heinrich (2004).

De acuerdo con Vandame *et al.*, (2017) en un exhaustivo trabajo de recolección de datos e identificación de especies en el territorio mexicano, se ha constatado que si bien la

distribución de especies en el país es amplia, se pueden reconocer zonas de mayor riqueza de diversidad las cuales corresponden a la Sierra Madre de Chiapas y al eje Neovolcánico Transversal, este último que comprende los estados de Veracruz, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, México, Ciudad de México, Morelos, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Guerrero, Nayarit, Colima y Jalisco (40) (**Figura 2**). Aún a pesar de la gran diversidad de abejorros presentes en Mesoamérica, la situación actual de declive pone a ciertas especies en la Lista Roja de especies en peligro, de acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, (IUCN por sus siglas en inglés) del grupo de especialistas de la BBSG (Bumblebee Specialist Group) cerca de un 52% de las especies de abejorros se encuentran en una categoría de riesgo, situación alarmante y que debe ser considerada para generar acciones en pro de su conservación (40,42). Los estudios realizados en los últimos años (2019-2020) por estos especialistas, consideran a algunas especies de abejorros endémicos en riesgo como son: *B. (Cu.) haueri*, *B. (Cu.) brachycephalus*, *B. (Th.) steindachneri*, que figuran como especies amenazadas, *B. diligens* (Th.) y *B. (Th.) digressus* como especies casi amenazadas, *B. (Th.) medius* en estado vulnerable y *B. (Th.) weisi*, *B. (Th.) trinominatus*, *B. (Cu.) macgregori* y *B. (Py.) ephippiatus* como especies de menor preocupación de riesgo (42,43). Además de las especies nativas presentes en Mesoamérica, también está presente la especie norteamericana (*B. impatiens* Cresson) que desde el año 94 se introdujo en el territorio mexicano para su comercialización (16,44).

La amplia distribución que presentan los abejorros en México es de gran importancia por la estrecha cercanía que tienen con otras especies de abejas, principalmente las abejas melíferas (*Apis mellifera*), las cuales también están bien distribuidas en gran parte del país (45), por lo que las visitas a los mismos parches florales pueden ser comunes. Múltiples especies pueden coexistir debido a las particularidades morfológicas y de pecoreo de cada especie, resultando en elección de flores diferenciadas, sin embargo, al haber pocos recursos florales debido a cambios en el uso de suelo o pérdida de la diversidad de flora, pudiera existir competencia por las fuentes de alimento entre abejorros silvestres y abejas melíferas (46,47).

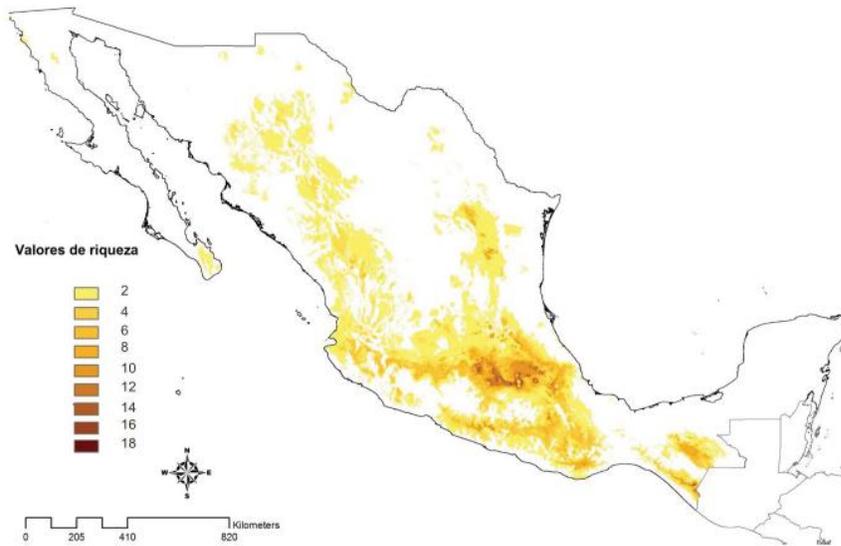


Figura 2. Distribución de la riqueza de abejorros en México. Tomado de Vandame (2017).

2.5 Cría y comercialización de abejorros

Debido a las características morfológicas particulares de los abejorros, se sabe que logran una polinización efectiva de especies de plantas con flores de corolas profundas (visitadas mayormente por abejorros de lenguas largas), aunque algunas especies prefieren visitar flores de corolas ligeramente más cortas que la longitud de su lengua, esta característica les otorga un cierto grado de especialización (16,46–48). También juega un papel muy importante el tamaño de su cuerpo y la cantidad de vellosidades, el tamaño de las corbículas con lo cual pueden acarrear mayor cantidad de polen, así como su notable resistencia a climas adversos (como son lluvias y fuertes vientos), lo que les permite pecorear aún durante estas condiciones, mismas que son más hostiles para otras especies de abejas (48,49).

Por otro lado, gran variedad de plantas silvestres con flores y algunos de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial para el ser humano como son la papa, berenjenas, jitomate, chiles (Solanaceae), arándanos (Ericaceae), melón, pepino, calabacita (Cucurbitaceae), entre

otros, requieren de un tipo de polinización conocido como “polinización por zumbido” (35,50), dado que el polen en este tipo de flores queda restringido en las anteras (anteras poricidas), se requiere que ocurran vibraciones en las corolas de las flores para que liberen el polen que se encuentra más profundo y sólo así se logre una polinización efectiva, se sabe que dicha polinización es realizada por los abejorros, gracias a los fuertes músculos torácicos que tienen, con los cuales logran mediante movimientos repetidos ejercer la vibración necesaria para la liberación del polen (44,51,52).

Según la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) 2019, publicada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), de los cultivos con mayor producción anual por millones de toneladas se encuentra el jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) con 2,860,305.2 t, con una superficie cultivada de 42,383.3 ha (53), de las cuales en la última década la superficie establecida con agricultura protegida (uso de malla sombra e invernadero) para este cultivo creció a una tasa promedio anual del 22.7%, sembrando a nivel nacional 22,236 ha, con una producción de 1,397,515 t (54), este tipo de agricultura se concentra principalmente en los estados de San Luis Potosí, Baja California y Sinaloa, aunque va adquiriendo mayor importancia en los estados de Jalisco, Sonora, Coahuila, Puebla, Guanajuato, Baja California Sur y Oaxaca; la productividad del jitomate continúa creciendo, con lo que actualmente México se sitúa como el décimo productor y primer exportador de jitomate a nivel mundial (55,56), sucediendo así un incremento en las importaciones a nivel mundial del 39.41% en la última década, siendo Estados Unidos el principal importador de jitomate (56). Se estima que para el año 2030 la demanda mundial de este cultivo aumentará de 8.92 a 11.78 MMt (56), sin embargo, este tipo de agricultura al mantener a los cultivos en ambientes protegidos (invernaderos, casas de sombra) restringe o reduce el papel de los insectos polinizadores en estos cultivos, por lo que se requiere del uso de polinizadores manejados (aquellos polinizadores semi-domesticados producidos en grandes cantidades para ser vendidos y comercializados) para lograr cantidades aceptables de producción (21), por lo que la polinización efectiva por medio de polinizadores manejados como es el caso de abejorros es esencial para cubrir las necesidades del mercado tanto nacional como mundial (57).

Mundialmente se manejan 5 especies de abejorros fuera de su lugar de origen (16,55), de estas especies, en México desde el año 1994 la empresa Holandesa Koppert Biological Systems inició con la comercialización del abejorro exótico *Bombus impatiens* Cresson; especie originaria del este de Norteamérica (Estados Unidos y Canadá) (44,58), comercio que creció de manera exponencial en los últimos años, actualmente alrededor de 50,000 colonias de abejorros exóticos son comercializados anualmente para la polinización de cultivos protegidos (59).

Si bien esta especie ha demostrado ser eficiente en la polinización de cultivos en invernadero en México, es importante reconocer el riesgo potencial que representa para los abejorros silvestres, si se mantienen las condiciones favorables para su desarrollo y establecimiento, como ya ha ocurrido con otras especies, en donde se ha podido documentar el establecimiento de especies exóticas en países como Nueva Zelanda, Tasmania, Chile y Australia (16,35). Los riesgos potenciales que representan la introducción de especies exóticas son la competencia por fuentes de alimento y zonas de anidación, posible hibridación de especies y la diseminación de patógenos y enfermedades, que pueden ser derramados de especies manejadas a abejas silvestres y viceversa; inclusive entre abejas de distintas especies (16,35,51,57,59,60).

El interés por manejar especies nativas para la polinización de cultivos ha ido creciendo en los últimos años, debido a los riesgos potenciales que representa el manejo y comercialización de abejorros exóticos, con lo que se han desarrollado importantes trabajos de investigación en la crianza y manejo del abejorro nativo *Bombus ephippiatus* Say (Hymenoptera: Apidae: Bombini) subgénero *Pyrobombus* para la polinización de diversos cultivos como jitomate, berenjena, pepino, chiles morrones, melones, sandías y diferentes especies de berries (44,49,51,58,61). Esta es la especie mayormente conocida y manejada ecológicamente, la que se ha estudiado más y se ha considerado ser tan eficiente para la polinización de cultivos bajo invernadero como lo es la especie exótica *B. impatiens* (44,51,57).

El abejorro *B. ephippiatus* presenta una amplia distribución en el país, desde Chihuahua hasta Chiapas, con la excepción de Baja California y la península de Yucatán, extendiendo su distribución por todo Centroamérica y Panamá, en altitudes que han sido reportadas desde los 800 hasta 3400 msnm, en zonas templadas y montañosas principalmente (44,51,57,62).

La importante topografía montañosa tanto de México como de Centroamérica provee de hábitats que sirven como barreras biogeográficas, permitiendo que alberguen una basta diversidad de especies (63). De acuerdo con *Duennes et al.*, (2017) el abejorro nativo *B. ephippiatus* puede ser considerado no solamente como una especie que se distribuye ampliamente en Mesoamérica, por el contrario, se considera que sean cinco diferentes linajes (complejo *Bombus ephippiatus-wilmattae*) que se han diversificado gracias a estas barreras biogeográficas, el Istmo de Tehuantepec (que separa la Sierra Madre del Sur del bloque maya), la Depresión de Nicaragua (que separa las tierras altas del bloque Chortis de Honduras y Nicaragua de las tierras altas de Costa Rica) y la Depresión Central (que divide las cadenas montañosas de Chiapas y Guatemala) (40,63). Esto es importante si se pretende comercializar con dicha especie, ya que aun siendo nativa debe evitarse el movimiento de especies entre las diferentes barreras naturales antes mencionadas, con la finalidad de evitar un entrecruzamiento y disminuir la riqueza genética y así poder mantener la diversidad de especies.

2.6 Interacciones Parásito - Hospedero en ápidos

Muchos de los patógenos que son reconocidos en el mundo animal, son albergados por más de una especie, ocurriendo una gran infinidad de interacciones entre hospederos y parásitos, mismos que juegan un rol muy importante en la regulación de las poblaciones contribuyendo así en el equilibrio ecosistémico de especies (34,64). Las interacciones parásito-hospedero han sido ampliamente estudiadas, con la finalidad de conocer los mecanismos que se mantienen entre ellos; estudiando así la infectividad del parásito y la susceptibilidad del

huésped; así como la capacidad que tienen los parásitos; especialmente los micro parásitos (como virus, hongos, bacterias, protozoos) para lograr infectar una o varias especies, manteniendo sus ciclos biológicos en situaciones y ambientes determinados y a su vez desarrollar mecanismos que les permiten inclusive proliferar en nuevos hospederos (24,34,64).

Se sabe que los parásitos logran proliferar de manera más exitosa en comunidades de individuos sociales, a diferencia de organismos solitarios (34), en el caso de los insectos y particularmente en abejas, diversos estudios han podido demostrar bajo condiciones controladas, que se presenta un mayor índice de éxito o replicación de los parásitos en especies sociales; ya que las condiciones de alta densidad de individuos (huéspedes) y uniformidad genotípica resultan ventajosas, factor que influye en el desarrollo, transmisión e infectividad y la subsecuente manifestación de comunidades enfermas, además de otros factores como son la susceptibilidad del hospedero, su respuesta inmune, factores de estrés y variabilidad genética; sin embargo, los mecanismos específicos del sistema social determinarán si se presenta una mayor o menor respuesta a la infección (34,64,65).

Existe gran evidencia sobre los riesgos potenciales que representan la movilización de especies manejadas y más aún la introducción de especies exóticas de abejas, siendo uno de los principales factores de riesgo el “derrame de patógenos”, en donde las colonias manejadas pueden presentar altos niveles de patógenos actuando como “reservorios” y propagando los patógenos a una población huésped “no reservorio” simpátrica, ocasionando así mayores impactos negativos en los conespecíficos silvestres, cabe aclarar que este “derrame de patógenos” puede actuar en ambos sentidos, tanto especies manejadas como poblaciones silvestres pueden actuar como reservorios (23,28,66). Este “derrame de patógenos” en abejorros se documentó por primera vez en Japón en el año 2000, donde ocurrió la propagación del ácaro traqueal *Locustacarus buchneri* presente en colonias manejadas de *B. ignitus* a poblaciones nativas debido al “derrame de patógenos” (28). Otros trabajos que sugieren el “derrame de patógenos” son los realizados por Colla *et al.*, (2006), quienes

encontraron altos niveles de los patógenos *Crithidia bombi* y *Nosema bombi* en especies de abejorros silvestres que se encontraban cercanos a invernaderos donde se manejan abejorros para la polinización, concordando que los abejorros silvestres cercanos a invernaderos se encontraban mayormente infectados con estos patógenos; siendo el “derrame de patógenos” la principal causa para que se presentara este patrón (28,66). Además de los ya mencionados, existen evidencias de “derrame” de diversos patógenos y parásitos entre abejorros y abejas del género *Apis*, con lo cual la especie “reservorio” puede llegar a presentar aún mayores prevalencias de los patógenos existentes, aumentando el riesgo de diseminación de enfermedades a otras especies (**Cuadro 3**) (34).

Otro de los temas de interés en las interacciones entre parásitos y hospederos son los llamados “saltos de hospedero” en donde la viabilidad del parásito evoluciona hacia nuevas especies de hospedero, requiriendo adaptaciones a la nueva fisiología y comportamiento del huésped con lo cual garantiza su supervivencia y replicación (67,68). Esto es de gran importancia para las comunidades de abejas, ya que como bien se ha documentado, diversos patógenos han evolucionado para ser viables en nuevos hospederos, tal es el caso del microsporidio *Nosema ceranae* el cual se supone que hizo un “salto de hospedero” a la abeja melífera hace más de una década, donde anteriormente (desde 1900) sólo se reconocía a *Nosema apis* como el único agente causante de Nosemosis en abejas, de igual forma los ácaros ectoparásitos de la abeja melífera *Varroa destructor* y *Varroa jacobsoni*; se presume que realizaron el salto de hospedero aproximadamente hace 70 y 12 años (respectivamente) a la abeja europea, cuando entraron en contacto con este nuevo hospedador, desde su huésped ancestro (*A. cerana*), *V. jacobsoni* quedó restringida en Oceanía mientras que *V. destructor* fue causante de colapsos en las poblaciones de abejas alrededor del mundo (68), esto pudo suceder debido a que los nuevos parásitos causaron un impacto negativo importante en las poblaciones de los nuevos huéspedes, logrando diezmar o incluso extinguir dichas poblaciones hasta que sus contra adaptaciones evolucionaran (68).

Bajo este contexto, es de gran importancia mantener un manejo adecuado de las colonias comerciales, así como las buenas prácticas de sanidad para reducir o eliminar el riesgo potencial que representa la presencia de parásitos y patógenos en abejorros, cuya demanda sigue incrementándose debido a las necesidades del comercio de cultivos alimentarios a nivel mundial.

Cuadro 3. Patógenos y parásitos de abejorros y abejas melíferas para los que existe evidencia de “derrame” hacia poblaciones o especies aparentemente libres del patógeno o con prevalencias bajas. ¹Encontrados además en otras especies de abejas. Tomado y modificado de Arbulo (2015).

Parásito	Tipo de parásito	Especies reservorio	Especies receptoras
<i>Apicystis bombi</i>	Protozooario Neogregarino	Abejorros comerciales	Abejorros silvestres Abejas melíferas
<i>Cnithidia bombi</i>	Protozooario Tripanosoma	Abejorros comerciales	Abejorros silvestres
<i>Nosema bombi</i>	Hongo Microsporidio	Abejorros comerciales	Abejorros silvestres
<i>Nosema ceranae</i> ¹	Hongo Microsporidio	Abejas melíferas Abejorros comerciales	Abejorros Abejorros silvestres
<i>Locustacarus buchneri</i>	Ácaro	Abejorros comerciales	Abejorros silvestres
Virus de las alas deformes (DWV) ¹	Virus Iflavirus	Abejas melíferas	Abejorros
Virus de la parálisis lenta de la abeja (SBPV)	Virus Iflavirus	Abejas melíferas	Abejorros
Virus israelí de la parálisis aguda (IAPV)	Virus Dicistriviridae	Abejas melíferas	Abejorros
Virus de la parálisis aguda de la abeja (ABPV)	Virus Dicistriviridae	Abejas melíferas	Abejorros
Virus Kashmir de la abeja (KBV)	Virus Dicistriviridae	Abejas melíferas	Abejorros
Virus de la celda negra de la reina (BQCV) ¹	Virus Dicistriviridae	Abejas melíferas	Abejorros
Virus de la cría ensacada (SBV) ¹	Virus Dicistriviridae	Abejas melíferas	Abejorros
Virus del Lago Sinai (LSV)	Virus	Abejas melíferas	Abejorros
<i>Ascosphaera spp</i>	Hongo	Abejas melíferas	Abejorros
<i>Aethinia tumida</i>	Coleóptero	Abejas melíferas	Abejorros

2.7 Problemas sanitarios importantes en abejorros

Los abejorros nativos se enfrentan a amenazas de parásitos y patógenos, que causan detrimentos importantes en sus poblaciones; entre los principales parásitos que afectan a los abejorros destacan los parásitos de transmisión oro-fecal de abejas adultas como son el hongo microsporidio *Nosema bombi*, el parásito tripanosomátido *Crithidia bombi* y el neogregarino *Apicystis bombi*, el ácaro traqueal *Locustacarus buchneri*, los parasitoides de cría como *Melittobia acasta* y *M. chalybii* y principalmente el virus de las alas deformes (DWV) (24,69–71), dichos agentes han repercutido de manera significativa en los abejorros, causando deformidades, detrimentos en sus poblaciones, reducciones en la longevidad de las colonias, deficiencias en su habilidad de aprendizaje, disminución en las reservas de grasa, y pobre respuesta a otros factores estresantes (70,72). La mayoría de estos parásitos y patógenos han logrado propagarse de colonias comerciales a colonias silvestres, en donde abejorros manejados que se utilizan para la polinización de cultivos en invernaderos, regularmente escapan de las instalaciones de invernadero para la obtención de recursos, ya que como se ha podido documentar cerca del 73% del polen recolectado por obreras de abejorros manejados en invernaderos lo obtienen de plantas fuera del invernadero (66); con lo que al ser reservorios de una o más enfermedades, perpetúan el riesgo de transmitir enfermedades a especies silvestres y viceversa. Además, diversos patógenos que han sido identificados en las abejas melíferas pueden estar pasando a otros huéspedes de abejas con el movimiento y comercialización global de las abejas melíferas y sus productos, aunque también dichos patógenos pueden estar ampliamente distribuidos en la naturaleza (71).

Las instalaciones de cría comercial representan un factor importante para la proliferación de patógenos y parásitos, debido a la alta densidad de individuos (hospederos) en dichas instalaciones; se crean situaciones ideales para que estos agentes logren aumentar sus poblaciones; además de que al proveer a las colonias con alimento ad libitum, les permite desarrollarse y sobrevivir aún a pesar de tener cargas parasitarias altas; donde naturalmente la muerte de hospederos es uno de los factores que influyen en la reducción de poblaciones de parásitos (73).

Teixeira *et al.*, (2017) han podido constatar la presencia de diversos patógenos presentes en productos de la colmena (polen, jalea real, miel) de colonias infectadas, encontrando esporas de *Paenibacillus larvae*, *Ascosphaera apis*, *Nosema ceranae* y *Nosema apis*, representando un riesgo para colonias de abejas manejadas que requieren de alimentación con alguno de estos productos (74) ; tal es el caso de los abejorros, que durante la cría y desarrollo para su comercialización se requiere del uso de polen (pasta de polen mezclada con jarabe de azúcar, en algunos casos) proveniente de colmenas de abejas melíferas, como fuente proteica para mantener y desarrollar colonias que posteriormente serán comercializadas para la polinización de cultivos; un tema importante a considerar ya que el polen puede actuar como vector para la diseminación de enfermedades, por lo cual se requiere de métodos que permitan su esterilización con el fin de matar los parásitos presentes y reducir el riesgo de infección a colonias de abejorros (72,74). Actualmente una de las mayores empresas de cría y comercialización de abejorros (Biobest) utiliza el método de irradiación para “esterilizar” el polen y poder así eliminar los parásitos presentes en el mismo y proveer una alimentación higiénica a sus colonias (72). Aún se requiere mejorar los métodos de esterilización del polen a fin de reducir por completo los parásitos presentes, como pudo demostrar Graystock *et al.*, (2016) donde el método de irradiación Gamma logra eliminar y degradar el DNA/ del Virus de las alas deformes (DWV), *N. ceranae*, Virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) y Virus de la cría ensacada (SBV), no así para *Crithidia bombi*, *N. apis*, *Ascosphaera apis* y *Apicystis bombi* que permanecen en el polen a pesar de recibir este tratamiento (72), se requieren medidas para mejorar estos métodos.

Aunque es poco probable que las poblaciones de abejorros y otras especies de abejas silvestres sean extirpadas por parásitos, como único factor, el derrame constante de patógenos desde un reservorio de abejorros con alta prevalencia de parásitos podría extirpar pequeñas poblaciones huéspedes y contribuir con el declive de polinizadores.

2.8 Microsporidios del género Nosema en ápidos

Los microsporidios son un gran grupo de hongos unicelulares, parásitos intracelulares obligados (todo su ciclo biológico se desarrolla dentro de las células del huésped) que presentan estructuras únicas; comparados con otros eucariotas son altamente reducidos en todos los niveles (metabólico, bioquímico, morfológico e incluso molecular) principalmente les caracteriza la presencia de organelos de extrusión, cuya función principal es la de inyectar el contenido de la espora (estadio de resistencia) en las células del huésped y poder contribuir efectivamente en el proceso de infección (75–78).

Descritos por primera vez en el siglo XIX, cuando la industria de la seda en Europa estaba siendo devastada por un microorganismo que atacaba a los gusanos de la seda, en aquel entonces dicho microorganismo fue nombrado *Nosema bombycis* Nagëli; posteriores estudios crearon un nuevo grupo llamado Microsporidia, donde actualmente cerca de 1200 especies han sido descritas, con más de 700 especies de insectos huéspedes (75,79,80). Se sabe que los microsporidios están ampliamente distribuidos, infectando a una gran cantidad de animales vertebrados e invertebrados y algunos protozoarios siendo más prevalentes en peces y artrópodos, donde han causado daños importantes en la industria acuícola y apícola, además de ser utilizados en el control de plagas (76).

La particularidad que tienen los microsporidios es la presencia de una célula altamente organizada; la espora, el único estadio que puede sobrevivir fuera de la célula hospedera, cuya longevidad y viabilidad se ve influenciada por diversos factores ambientales (34,76,81). Dicha espora presenta una característica singular, la presencia de un filamento o túbulo polar enrollado, que le permite inyectar el contenido de la espora (esporoplasma), cuando se presentan las condiciones ideales dentro del hospedero (**Figura 3**) (34,76,79). Las esporas varían en tamaño entre especies, su longitud está en un rango entre 1 a 12 μm y su forma varía desde ovaladas, redondeadas, en forma de lágrimas o en forma de huso, presentan la característica que al ser observadas mediante microscopía a 250 X o 400 X son discernibles como formas brillantes refractivas (79); siendo la espora el punto focal para su diagnóstico, estrategia de infección y ciclo de vida (76).

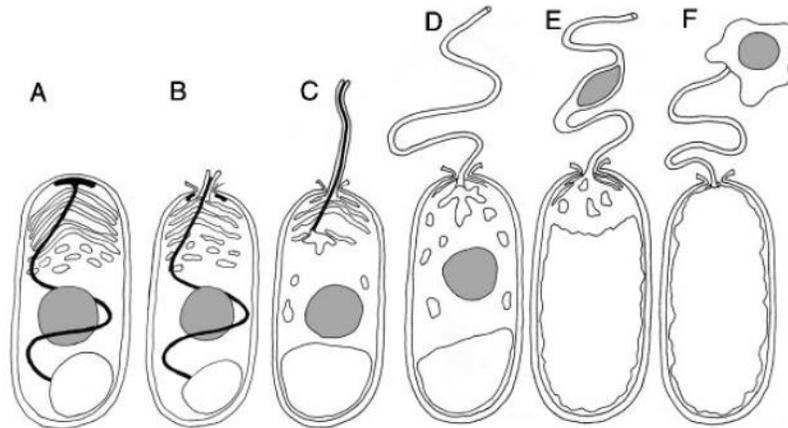


Figura 3. Eversión del tubo polar durante la germinación de la espora. **(A)** Espora latente, mostrando filamento polar (negro), núcleo (gris), polaroplasto y vacuola posterior. **(B)** Polaroplasto y vacuola posterior se hinchan, se rompe el disco de anclaje, y el filamento polar comienza a evertir. **(C)** El filamento polar continúa su eversión. **(D)** Una vez que el tubo polar está totalmente evertido, el esporoplasma es forzado hacia adentro **(E)** a través del tubo polar. **(F)** El esporoplasma emerge desde el tubo polar rodeado de nueva membrana. Tomado de Keeling y Fast (2002).

Los microsporidios con su amplia distribución han logrado infectar a una gran variedad de insectos, la mayoría de los microsporidios entomopatógenicos ocurren en el género *Nosema* con más de 150 especies descritas, comúnmente infectando insectos del Orden Lepidóptera e Himenóptera, donde han ocasionado daños severos y de gran importancia económica (34,80,82). Las principales especies que afectan a los insectos himenópteros, y específicamente a las abejas fueron reconocidos de tres especies principales: los microsporidios *Nosema apis*, *Nosema ceranae* y *Nosema bombi*, quienes parasitan a la abeja melífera (*A. mellifera*), la abeja asiática (*A. cerana*) y a los abejorros (género *Bombus*), respectivamente, aunque no exclusivamente, como ya se ha mencionado anteriormente, debido a saltos de hospedero, estas especies han logrado parasitar nuevos hospederos (34,80,82).

La infección en estas especies ocurre principalmente por la ingestión de alimento o agua contaminados con esporas, mediante trofolaxia o cuando realizan labores de limpieza, ingiriendo así las esporas presentes y que se mantienen viables en el medio ambiente (81). Las esporas que han sido ingeridas requieren de condiciones ideales dentro del tubo digestivo para desencadenar su germinación, entrando en la primer fase de reproducción vegetativa (merogonia) en donde crece y se multiplica dentro de las células del intestino, produciendo células hijas (merozoitos) que tienen el potencial de repetir dicho proceso o entrar en la segunda fase reproductiva, que es la producción de esporas (esporogonia); pudiendo infectar otros tejidos de acuerdo con la especie del patógeno que se trate, las esporas finalmente son liberadas mediante las heces de los individuos infectados (**Figura 4**); ocurriendo así el ciclo de infección a nuevos individuos de la colonia y perpetuando la enfermedad, sobre todo si los individuos se encuentran en situaciones que benefician la proliferación del patógeno, mismas que ya se mencionaron anteriormente (34,75,80–83).

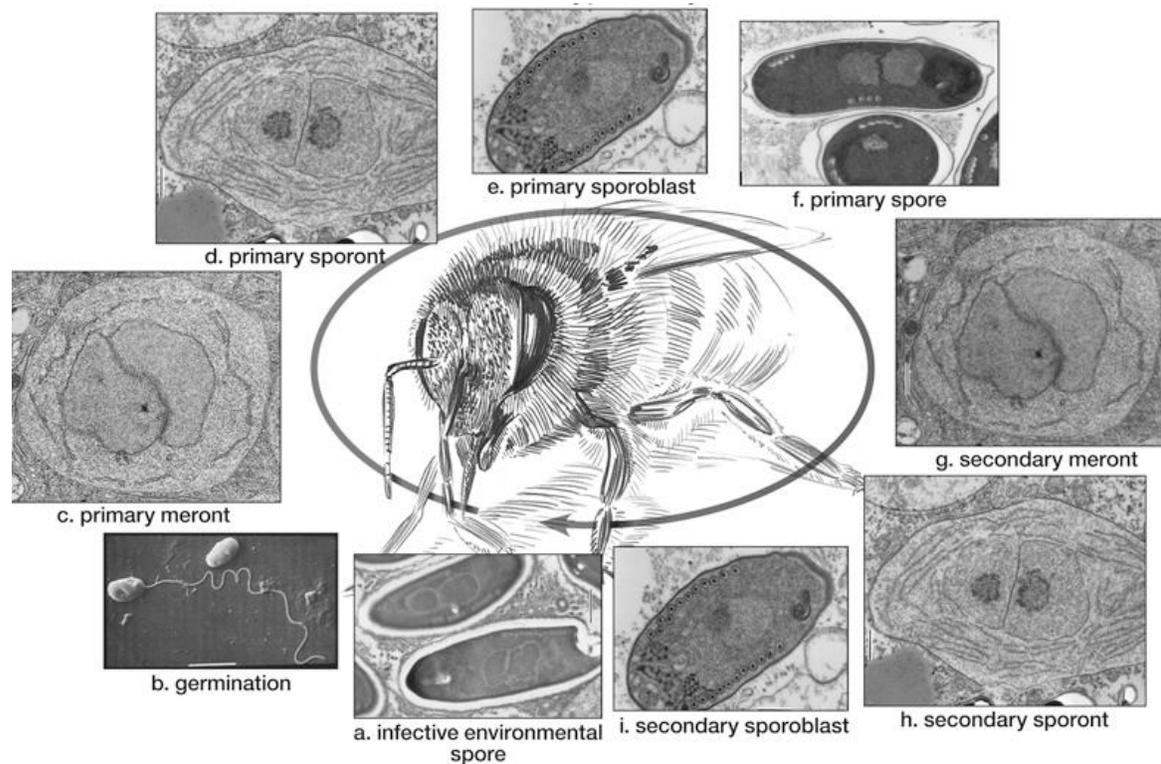


Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida de *Nosema*. Tomado de Solter (2010).

2.8.1. *Nosema apis*

El microsporidio *Nosema apis* Zander, fue descrito en 1909, en las abejas melíferas (*Apis mellifera*), considerado hasta el 2005 como el único agente causante de la Nosemosis, también conocida como Nosemosis “tipo A”; enfermedad que afecta a las abejas adultas, infectando las células epiteliales del intestino medio y el tejido muscular de las abejas melíferas; siendo una de las enfermedades más difundidas a nivel mundial (78,84). *N. apis* presenta un ciclo de vida directo y es transmitido horizontalmente a las abejas melíferas, este tipo de transmisión es la más común en los microsporidios y puede ocurrir entre huéspedes emparentados o no y entre huéspedes de esta o diferente especie; dicha transmisión depende fuertemente de la carga del parásito, por lo que, a mayor cantidad de esporas producidas mayor será la oportunidad del parásito para infectar a su hospedero (34,85).

Este agente causa disentería, pudiendo observar manchas fecales en la entrada de las colmenas, abejas rastreras (temblorosas) y con abdómenes dilatados, otra signología típica es la coloración blanca lechosa del intestino medio (ventrículo), esto debido a la degeneración del epitelio digestivo, a nivel de la colonia se le ha atribuido ser causante de la disminución de la cría y por ende, del tamaño de la colonia, además de reducir la supervivencia de las colonias cuando se presentan altas cargas parasitarias; esta es una enfermedad estacional, que se caracteriza por altos niveles de infección en primavera, posteriormente baja durante el verano e invierno y se presenta un ligero pico durante el otoño (34,78,85,86).

2.8.2. *Nosema ceranae*

Nosema ceranae originalmente descrita en la abeja asiática (*A. cerana*) en la década de 1990 (87), fue hasta el año del 2005 que se descubrió su presencia en la abeja melífera (*A. mellifera*), y en el año 2009, se registró por primera vez su presencia en abejorros;

actualmente se encuentra presente no solamente en las especies antes mencionadas, pues también se ha reportado su presencia en otras especies de la superfamilia Apoidea (34,78,87).

Los principales efectos que causa *N. ceranae* a nivel individual y de la colonia son una marcada reducción en la supervivencia de las obreras, estrés energético y nutricional, esto en parte se debe a la degeneración que ocasiona en el epitelio digestivo, razón por la cual al igual que *N. apis* se puede apreciar el ventrículo encogido y blanquecino, alteraciones metabólicas, alteraciones en los controles hormonales, reducción en la respuesta inmune de los individuos, baja productividad y reducción en la población adulta (34,88,89). Si bien no hay signos claros de la infección que causa a nivel de las colonias, diversos autores le han atribuido ser factor en el despoblamiento de las colonias, debido a su alta virulencia, que aún a pesar de eso puede ser variable en las poblaciones de abejas (34).

2.8.3. *Nosema bombi*

Entre los patógenos más comunes de los abejorros se encuentra el microsporidio *N. bombi*, descrito por primera vez en 1914 por Fantham y Porter, siendo considerado hasta el 2009 como el único microsporidio conocido que infectaba a los abejorros (24,34,90). Este patógeno que infecta principalmente los túbulos de Malpighi y los tejidos del intestino medio (ventrículo), pero también se ha reportado su presencia en tejido graso, músculo, tráquea e inclusive en tejido nervioso de los abejorros (24,77).

N. bombi se caracteriza por causar daños crónicos más que agudos, diversos autores han constatado inclusive que los individuos no llegan a presentar signologías externas evidentes que pudieran sugerir una posible infección por este parásito, realizando su comportamiento normal aún con infecciones severas (24). Sin embargo, se ha documentado que dicho parásito causa una reducción de la supervivencia de machos y hembras, disminución del tamaño de las colonias, incremento en la producción de sexuales (particularmente machos), reducción en la tasa de reproducción de hembras (muestran reducida capacidad para aparearse) y machos (esperma viable reducido); además de reducir la probabilidad de fundación de la

colonia en reinas infectadas, conduciendo potencialmente al declive de sus poblaciones (24,91–93). De acuerdo con Otti y Schmid-Hempel (2007), el comportamiento de las obreras también se ve afectado por este parásito, en colonias altamente infectadas las obreras no realizan correctamente las tareas de limpieza, pudiendo encontrar colonias sucias o con individuos muertos que no son desechados fuera del nido, lo que resulta en una sobreexposición a las esporas hacia individuos sanos y enfermos dentro de la colonia y por consiguiente la supervivencia del patógeno (93).

Debido a que los abejorros presentan un ciclo de vida anual, y son las reinas el único individuo que hiberna, se presume que *N. bombi* permanece remanente durante ese tiempo dentro de la reina, suponiendo así que las esporas podrían ser transmitidas verticalmente hacia la descendencia; aunque esto no ha sido comprobado; por lo que se asumen 3 formas de transmisión del microsporidio a las colonias: 1) directamente vía hibernación de las reinas, 2) indirectamente durante el pecoreo vía ingestión de esporas presentes en el alimento y 3) mediante la infección desde obreras enfermas que entran a la colonia (24,91,94,95).

Aunque se sabe que *N. bombi* reduce su viabilidad fuera del huésped, debido a factores ambientales que resultan poco favorables para la supervivencia de la espora (81), y por ende reduce su probabilidad de infectar a nuevos huéspedes de subsecuentes generaciones; por lo que el comportamiento infectivo de este parásito se ve afectado tanto por los factores ambientales como por la situación de los individuos, por ejemplo, en campo las obreras se enfrentan a mayores condiciones estresantes en donde inclusive llegan a morir con intensidades de infección bajas, lo que no ocurre en condiciones de laboratorio, donde se mantienen condiciones ideales que permiten intensidades de infección altas y debido al confinamiento de individuos sanos y enfermos, las tasas de reinfección podrían ser más altas también (93).

2.9. Nosemosis en abejorros

La infección causada por el microsporidio *Nosema* spp., también conocida como Nosemosis tiene un ciclo de vida aproximado de 7 días, en donde la diseminación de la enfermedad ocurre mediante la ingestión de esporas, posteriormente dichas esporas germinan en el intestino medio, donde crecen y se multiplican, pudiendo diseminarse a otros tejidos y eventualmente, las esporas sean expulsadas por las heces, en donde se cumple nuevamente el ciclo de infección entre las abejas (78,96).

En un estudio realizado en China, se logró demostrar que una gran diversidad de microsporidios incluyendo *Nosema apis*, *Nosema bombi*, *Nosema ceranae*, *Nosema portugal*, *Nosema thomsoni*, *Tubulosema pampeana* y *Vairimorpha spp.* infectan a los abejorros (97). Sin embargo, la falta de detalle de muchos estudios, sobre todo antes del desarrollo de métodos moleculares, ha ocasionado que la identificación de la especie en muchos estudios anteriores fuera incierta. Actualmente los microsporidios que se han constatado infectan a abejorros silvestres en campo son: *N. bombi*, *N. ceranae* y *T. pampeana* (97).

Debido a la alta virulencia que se les ha atribuido a *N. bombi* y *N. ceranae* se han considerado ser agentes causantes de enfermedades emergentes infecciosas, dichas enfermedades generalmente se ven facilitadas por un cambio en la ecología huésped-parásito, que conduce a nuevas oportunidades de transmisión entre especies; siendo de especial preocupación debido a los efectos impredecibles que pueden ocasionar sobre poblaciones nativas de abejorros y/o sobre poblaciones de especies manejadas (34). La realización de estudios experimentales ha permitido documentar el impacto negativo que tienen estas dos especies de microsporidios sobre las colonias, la salud de los individuos y su habilidad de aprendizaje; sin embargo la gran mayoría de los estudios se han realizado con las especies que se manejan y comercializan mundialmente (*B. terrestris*, *B. impatiens* u otras especies Paleárticas), por lo que los impactos que ocasionan estos agentes pueden variar en las cerca de 250 especies de abejorros reportadas (89,93,94,97).

Diversos estudios han podido constatar el daño que causa el microsporidio *N. ceranae* en abejorros, trabajos que han sido realizados en condiciones controladas como en campo, han encontrado que este parásito afecta la supervivencia de la colonia, genera efectos subletales en el comportamiento de las obreras, y al considerarse un parásito con alta virulencia, como se ha reportado para la abeja europea (*Apis mellifera*), podría traer consecuencias devastadoras para las poblaciones vulnerables (34,89,97–99). De acuerdo con Graystock *et al.*, (2013) no está claro si *N. ceranae* que ha sido detectado por métodos moleculares, puede infectar realmente a los abejorros o simplemente se trata de la vectorización de esporas no germinadas, sin embargo, en su trabajo pudieron comprobar de manera experimental que los abejorros son susceptibles a la infección por *N. ceranae* de cepas pertenecientes a la abeja melífera europea (98).

Bajo este contexto, y como han propuesto otros autores la infección por *N. ceranae* que ocurre en abejorros se presume ha sido causa de saltos de hospedero de cepas presentes en las abejas melíferas que han entrado en contacto con sus conespecíficos, tanto aquellos abejorros manejados comercialmente como silvestres (98).

A diferencia de *N. bombi*, parásito generalista establecido en varias especies del género *Bombus*, ocurriendo regularmente, pero a diferentes niveles; por lo que se considera como el único microsporidio que infecta realmente a los abejorros y que como ya se ha mencionado anteriormente causa efectos que repercuten negativamente en la supervivencia de los individuos, problemas reproductivos y detrimentos en el desarrollo de las colonias (34,99,100). Aunado a esto, muchas de las amenazas que están enfrentando los abejorros con la consecuente disminución de sus poblaciones, podría estar llevando a un detrimento en su diversidad genética, ocasionado así una mayor susceptibilidad a infecciones causadas por microsporidios u otros agentes; lo que permite que aumente la prevalencia de las enfermedades e inclusive se perpetúen (97,101).

Debido a la susceptibilidad que presentan las abejas frente a este parásito, es de gran importancia conocer cómo se encuentran las colonias de abejorros que se manejan para la polinización de cultivos, con el fin de implementar medidas de bioseguridad para evitar la diseminación de patógenos que pueden afectar el ciclo biológico de las poblaciones de abejas silvestres. La crianza de abejorros nativos debe considerar generar el menor impacto a las poblaciones silvestres, por el riesgo potencial que las colonias de abejorros manejados presentan hacia los abejorros silvestres mediante la transmisión y derrame de patógenos, contribuyendo así en la diseminación de enfermedades y el declive de abejorros silvestres (23,28,102,103).

2.10. Detección y prevalencia de *Nosema* spp. en abejorros

La detección oportuna y diagnóstico de diversas enfermedades que afectan a las abejas es esencial cuando se comercializa con ellas, requiriendo así mantener un estatus libre de patógenos en colonias que son manejadas tanto para obtener productos provenientes de la colmena (tratándose de la abeja melífera) así como aquellas que se ocupan para la polinización de cultivos (16). En el caso de los abejorros que son utilizados para la polinización de cultivos, es necesario el mantener colonias libres de parásitos que pudieran ser derramados a especies de abejas silvestres, poniendo en riesgo a dichas poblaciones y el equilibrio ecológico en un área determinada.

El diagnóstico y análisis de *Nosema* en abejas, ha sido primordialmente desarrollado para la abeja *Apis mellifera*, esto debido a que la abeja melífera ha sido la especie mayormente utilizada alrededor del mundo y la más estudiada, de la cual se reconoce es afectada por 2 especies de microsporidios (*Nosema apis* y *Nosema ceranae*) (104). Así pues, las metodologías utilizadas para el diagnóstico de *Nosema* tanto en campo como en laboratorio incluyen microscopía óptica, microscopía electrónica y métodos moleculares (PCR- reacción en cadena de la polimerasa); que permiten diagnosticar la enfermedad causada por *Nosema*, mediante la detección y cuantificación de las esporas presentes en los individuos analizados,

con lo cual se pueden determinar infecciones a nivel de colonia o a nivel individual en un momento dado, así como los niveles de infección y determinación de especies (104).

La microscopía óptica es una herramienta útil para el diagnóstico de Nosemosis (**Figura 5-A, B, C**), las esporas se pueden detectar en el microscopio óptico con una magnificación de 200 X o 400 X, estas se muestran refringentes, con un contorno oscuro y un tamaño promedio de 5.34 x 2.46 μm de forma generalmente oval en *N. apis*, 4.5 x 2.4 μm en *N. ceranae* en cuyo caso las esporas se observan ligeramente dobladas y menos uniformes con respecto a las de *N. apis*, y en *N. bombi* con un tamaño promedio de 4.88 x 2.88 μm en su forma oval más común, aunque como se ha encontrado en esta especie, existe una gran variación en el tamaño y forma de las esporas (ovals, redondeadas, alargadas) presentando un rango de variación de 2.77-6.63 x 1.69-3.13 μm (34,77,78,80,85,87,104). Sin embargo, la identificación certera del patógeno resulta en ocasiones difícil y subjetiva, por lo que el uso de técnicas complementarias especializadas para discernir entre las diferentes especies de Nosema es requerido, sobre todo cuando existen coinfecciones, como pueden ser técnicas de tinción, de las cuales se han descrito diversas técnicas que resultan útiles para visualizar microsporidios (**Figura 5-D, E, F**); en este caso las esporas en preparaciones tisulares, entre las que destacan: la tinción de Giemsa; útil para teñir núcleos de estadios pre-esporales, tinción de Toluidine; su uso se aplica en secciones semifinas de tejido, para determinar un área de interés para su óptima observación o la tinción tricrómica modificada de Gomori (Cromótopo 2R); esta técnica se ha utilizado para el diagnóstico de microsporidios en fluidos corporales e intestinales, siendo de gran utilidad debido a la afinidad que tiene el cromótopo 2R (colorante plasmático) por el material de cromatina, estructuras proteicas, quitina, etc; tiñendo dichas estructuras de rojo a rojo-violeta, que combinado con otros colorantes que actúan como contrastantes (azul de anilina, verde brillante) en una solución de ácido fosfotúngstico que favorece la coloración, mejoran el contraste entre las esporas de los microsporidios y el material de fondo, generando un excelente detalle y contraste en las muestras teñidas (104–108). Cabe mencionar que se deben mantener todas las medidas de seguridad por parte de quien realice las técnicas de tinción, a fin de evitar y/o reducir los

riesgos a la exposición de agentes tóxicos, además del manejo adecuado de este tipo de residuos.

Además de las técnicas anteriormente descritas, también se hace uso de microscopía de contraste de fase que es de gran utilidad ya que facilita la distinción de las esporas o la microscopía electrónica de transmisión la cual permite observar diferencias en la ultraestructura de las esporas de las diferentes especies de *Nosema* (**Figura 5-G, H, I**). (92,109–111).

Si bien la microscopía óptica permite determinar el grado de infección por *Nosema* spp. a nivel de colonia o individual, detectando y cuantificando las esporas de *Nosema* en una muestra de abejas adultas siguiendo la metodología descrita por Cantwell o la que ha sido descrita en el documento de métodos misceláneos del BEEBOOK, este método tiene en cuenta todas las esporas, siempre que tengan una forma o rasgo reconocible y no se confundan con otro material de la muestra, por lo que el uso de métodos complementarios para su diagnóstico es requerido; ya que dichas técnicas se podrían considerar subjetivas y requieren destreza por parte de quien realiza el análisis (78,104,112,113). Es importante destacar que solamente se pueden realizar identificaciones positivas observando las esporas típicas en el ventrículo o en las heces por lo que posiblemente no se puedan demostrar las infecciones muy leves (78,104,112). Como pudo demostrar Blaker *et al.*, (2014) en un estudio realizado en 9 especies de abejorros de Norteamérica, encontraron una alta prevalencia de infecciones con nula/leve esporulación por *Nosema bombi*; indicando que la exposición al patógeno es alta en la comunidad de abejorros estudiados, pero la prevalencia de infecciones esporulantes varía entre especies (114).

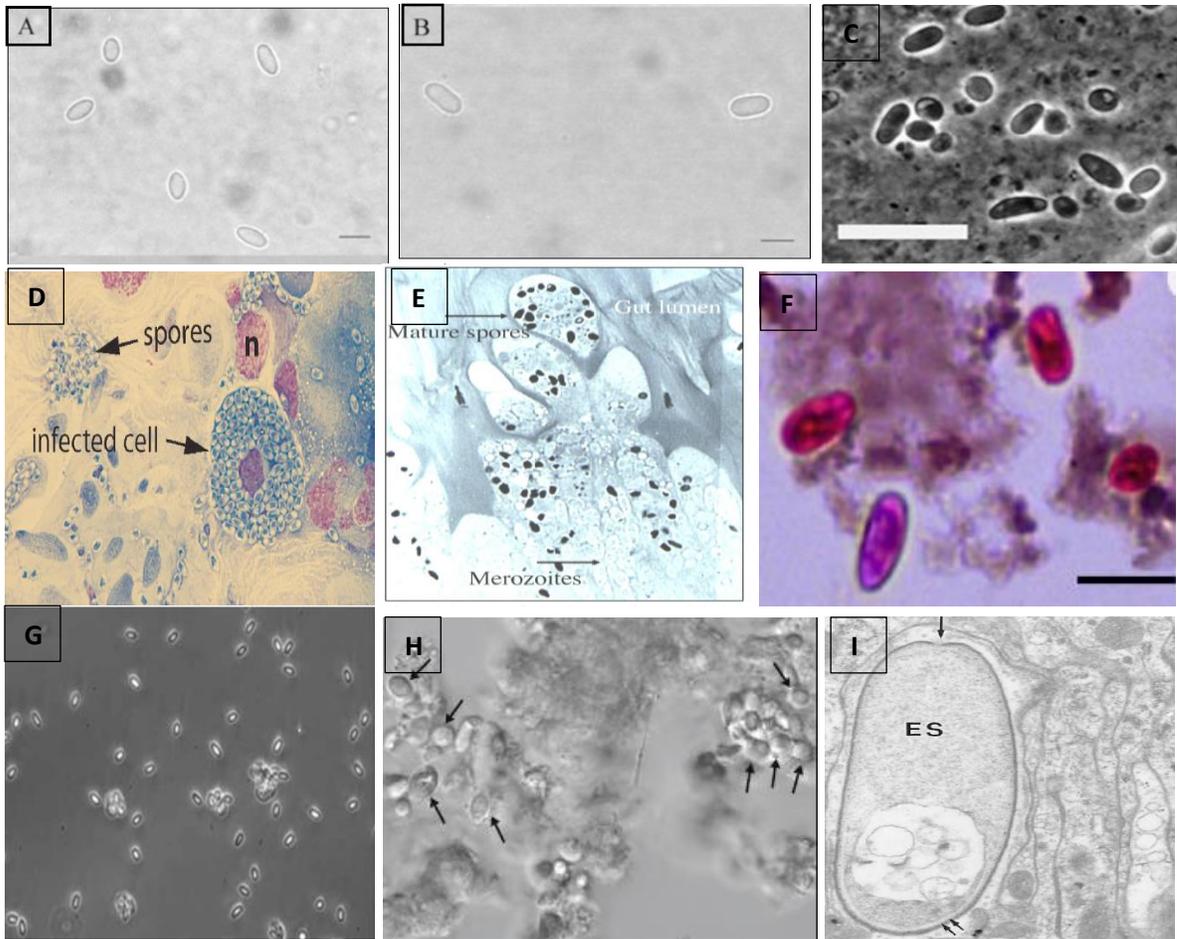


Figura 5. Identificación de esporas *Nosema* spp., mediante diversos métodos microscópicos y de tinción. (A) Esporas de *N. ceranae*, (B) *N. apis* y (C) *N. bombi* bajo microscopía de luz. (D) Detección de *Nosema* spp. usando tinción de Giemsa, (n) núcleo celular del ventrículo de una abeja (*Apis*), (E) Tinción de Toluidina de una sección semifina de tejido ventricular fijado en epoxi, y (F) Esporas de *N. bombi* teñidas con tinción Tricrómica. (G) Esporas de *N. ceranae*, (H) esporas de *N. bombi* mostrando las diferentes variantes genéticas observadas bajo microscopía de contraste de fase y (I) espora vacía (ES) en el citoplasma de células gliales del cerebro de un abejorro (*Bombus*), mostrando pared delgada (flechas dobles) e invaginación (flecha) en el lado apical donde el filamento polar se ha expulsado. (A, B, E) Tomado de Fries *et al.*, 2013. (C) Tomado y modificado de Arbulo 2015. (D) Tomado de Gisder *et al.*, 2010. (F) Tomado y modificado de Sokolova *et al.*, 2010. (G) Tomado de Bravo *et al.*, 2014. (H) Tomado de Vavilova *et al.*, 2015. (I) Tomado y modificado de Fries *et al.*, (2001).

Además de las técnicas microscópicas mencionadas anteriormente, se han desarrollado varios métodos moleculares que son más sensibles y específicos (PCR estándar, qPCR), para la detección e identificación de *Nosema* spp., detectando formas vegetativas de *Nosema* y

esporas (104,114,115). Los trabajos realizados por Klee *et al.*, (2006), Rutrech *et al.*, (2008) y Traver y Fell (2011), destacan la importancia del uso de métodos moleculares para la identificación de infecciones causadas por *Nosema* spp., en uno de estos trabajos también se ha documentado que el PCR identifica entre un 25 - 50% más casos de infecciones que la microscopía; por lo que la microscopía y el PCR juntas proporcionan complementariedad (114–117).

En Norteamérica, diversos estudios han encontrado diferencias significativas en la prevalencia de *N. bombi* en diferentes especies de abejorros, encontrando que es mayor en especies que han presentado acelerados declives en sus poblaciones como son *B. affinis*, *B. terricola* y *B. occidentalis* (114). Además, los trabajos realizados por Sokolova *et al.*, (2010) demuestran que *N. bombi* efectivamente infecta a abejorros silvestres y su rango de distribución es bastante amplio, más de lo que se ha reportado en trabajos anteriores. Aunque, estudios previos sugieren que el microsporidio fue introducido a Norteamérica a través de abejorros comerciales en 1992, el estudio realizado por Sokolova, supone que *N. bombi* ha estado presente ancestralmente en especies Neárticas de *Bombus* y se dispersó con sus múltiples hospederos Paleárticos (105).

En Europa, Asia y América del Sur, la detección del microsporidio *N. ceranae* se ha registrado en siete, cuatro y tres especies respectivamente. Se ha sugerido que el microsporidio *N. ceranae* parece ser mucho más virulento en abejorros, que su parásito natural *N. bombi*, como ha podido demostrarse en los trabajos realizados por Graystock *et al.*, (2013) quienes de manera experimental infectaron con esporas de *N. ceranae* a abejorros, los cuales presentaron una alta mortalidad dentro de los primeros 7 días post-infección, además de mostrar efectos subletales de comportamiento; lo que sugiere la alta virulencia de este parásito con sus hospederos (98).

El estudio realizado en México por Gallot-Lavalleé *et al.*, (2016) permitió determinar la presencia de *Nosema* en 85 sitios de diferentes estados de la República, encontrando una prevalencia promedio del 3.2% de 3,285 abejorros silvestres colectados, si bien se

documentaron diversas especies de Nosema (*N. thomsoni*, *N. carpocapsae* o *N. apis*), se demostró que la infección es causada principalmente por dos especies: *N. bombi* y *N. ceranae*. Para el estado de Chiapas de 291 especies colectadas se documentaron doce abejorros infectados con alguna especie de Nosema. Además, cabe destacar que la abundancia de Nosema encontrada en este estudio fue mucho mayor en el Noroeste del país (Sinaloa, Jalisco, Colima, Michoacán y Zacatecas) y específicamente, el estado de Sinaloa presentó la mayor prevalencia con un 48% en abejorros silvestres; aunque se sabe que este estado es reconocido por su gran producción de jitomates en invernadero, y con esto el uso de abejorros exóticos (*B. impatiens*), los datos arrojados no permitieron establecer un nexo causal directo entre el uso de abejorros exóticos y la prevalencia de Nosema, por lo que se requieren estudios que permitan determinar dichos patrones (59).

Bajo este contexto, es esperable que diversas especies de Nosema, puedan estar presentes en diferentes regiones del estado de Chiapas.

3 JUSTIFICACIÓN

Debido al riesgo potencial que representa la transmisión de diversas enfermedades y patógenos presentes en los abejorros, es primordial conocer cómo se encuentra la salud de las colonias de abejorros nativos criados en cautiverio, comparándola con la salud de los abejorros silvestres, con el fin de evitar o disminuir la diseminación de enfermedades que pudieran ser un factor influyente en la disminución de las poblaciones silvestres y contribuir en su conservación.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Documentar la prevalencia de *Nosema* spp., en abejorros nativos *Bombus ephippiatus* Say (Hymenoptera: Apidae) criados en cautiverio en el laboratorio de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) y en abejorros silvestres de dos localidades del municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de infección por *Nosema* spp. en las colonias de abejorros del laboratorio de crianza de ECOSUR, mediante microscopía óptica, utilizando 2 metodologías complementarias: método de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori.

- Documentar la prevalencia de *Nosema* spp. en el abejorro silvestre *B. ephippiatus* de dos localidades del Municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas.

- Determinar si el uso complementario de la tinción tricrómica de Gomori, resulta beneficioso para el diagnóstico de *Nosema* mediante microscopía.

- Determinar la efectividad del diagnóstico utilizando sólo 3 abdómenes.

5 HIPÓTESIS

La prevalencia de *Nosema* spp. de las colonias de abejorros criados en cautiverio, es más alta que la de abejorros silvestres, debido a las condiciones que se mantienen dentro del laboratorio de crianza que favorecen el desarrollo del microsporidio.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Recolección de abejorros

El proceso realizado en este proyecto fue coleccionar aleatoriamente entre 9 y 15 abejorros *B. ephippiatus* por colonia (N=22), lo cual representa el 10% de la población de cada colonia; pertenecientes al laboratorio de crianza de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal (16°42' N, 92° 36' O). En total se realizó la colecta de 261 abejorros *B. ephippiatus* (género *Bombus*, subgénero *Pyrobombus*), que fueron colectados durante el mes de febrero de 2020 para detectar la infección causada por el microsporidio *Nosema* spp., una vez colectados fueron almacenados en frascos debidamente etiquetados y preservados en alcohol etílico al 96% hasta su procesamiento.

Por otro lado, en los meses de julio y agosto del 2020 se colectaron abejorros silvestres *B. ephippiatus* de dos localidades del municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas: Sitio A) en el predio 240 de la Carretera Internacional (16°42'39.1'' N, 92°36'59.3'' W), y Sitio B) en el predio 22 Periférico Norte Poniente (16°43'57.9'' N, 92°39'39.5'' W), sitios que se encuentran a una distancia de 534m y 5600m del laboratorio de crianza de ECOSUR respectivamente. Con el uso de redes entomológicas se colectaron un total de 50 abejorros silvestres (25 abejorros por sitio), mismos que fueron colocados en frascos limpios, debidamente etiquetados y preservados en alcohol etílico al 96% hasta su procesamiento.

6.2. Preparación de las muestras

De las 22 muestras obtenidas del laboratorio de ECOSUR un total de 261 abejorros fueron colectados, sin embargo, se sometieron a análisis para el diagnóstico de *Nosema* por

microscopia un total de 174 abejorros. Los 87 abejorros restantes se mantuvieron preservados en alcohol etílico al 96% para su análisis molecular; que debido a la situación de Pandemia por COVID-19 no fue posible realizar dicho análisis, por lo que esas muestras no fueron utilizadas. Así mismo, para los abejorros colectados en campo, del total de 50 abejorros que fueron colectados, únicamente 42 abejorros fueron sometidos a análisis para detección de Nosema.

Las muestras fueron procesadas en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (19°19'46.2" N, 99°10'38.3" W), siguiendo la metodología de Cantwell descrita en libro de Patología, Diagnóstico y Control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas (16). Debido a que las colonias de abejorros son significativamente menos populosas con respecto a las de la abeja melífera, se realizó el macerado de 3 abdómenes de abejorros con 2, 3 y 4 repeticiones (dependiendo del tamaño de la colonia): 2 repeticiones para colonias de 90 – 110 individuos, 3 repeticiones para colonias de 120 – 130 individuos y 4 repeticiones para colonias de 150 individuos (**Cuadro 4**). En el caso de las 2 muestras de campo, se realizó el macerado de 3 abdómenes de abejorros con 7 repeticiones de cada muestra (**Cuadro 5**).

Macerado de abdómenes. Se colocaron 3 abejorros sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de alcohol, posteriormente se separaron los abdómenes de los abejorros con unas tijeras y pinzas de disección. Los abdómenes fueron colocados y macerados en un mortero con 1ml de agua destilada/abdomen, posteriormente el macerado obtenido fue filtrado con un tamiz, y el contenido se vertió en un recipiente plástico perfectamente limpio. Para evitar contaminación cruzada, el mortero, las pinzas y tijeras se lavaron entre cada macerado con agua jabonosa y alcohol al 96 % seguido de una limpieza firme y cuidadosa con papel absorbente limpio antes de ser utilizados nuevamente.

CUADRO 4. Abejorros nativos (*B. ephippiatus*) del laboratorio de ECOSUR analizados para la detección de *Nosema* spp. mediante microscopía. Se muestra el número de macerados realizados por colonia utilizando 3 individuos por cada macerado, con 2, 3 y 4 repeticiones.

No. MUESTRA	No. ABEJORROS/ COLONIA	No. ABEJORROS/ MUESTRA	ABEJORROS ANALIZADOS (repeticiones)				TOTAL DE ABEJORROS ANALIZADOS
			MACERADO 1	MACERADO 2	MACERADO 3	MACERADO 4	
1	90	9	3	3	0	0	6
2	90	9	3	3	0	0	6
3	100	10	3	3	0	0	6
4	100	10	3	3	0	0	6
5	100	10	3	3	0	0	6
6	100	10	3	3	0	0	6
7	110	11	3	3	0	0	6
8	110	11	3	3	0	0	6
9	110	11	3	3	0	0	6
10	110	11	3	3	0	0	6
11	110	11	3	3	0	0	6
12	110	11	3	3	0	0	6
13	110	11	3	3	0	0	6
14	110	11	3	3	0	0	6
15	120	12	3	3	3	0	9
16	130	13	3	3	3	0	9
17	150	15	3	3	3	3	12
18	150	15	3	3	3	3	12
19	150	15	3	3	3	3	12
20	150	15	3	3	3	3	12
21	150	15	3	3	3	3	12
22	150	15	3	3	3	3	12
	2610	261	66	66	24	18	174

CUADRO 5. Abejorros silvestres (*B. ephippiatus*) colectados en campo, analizados para la detección de *Nosema* spp. mediante microscopía. Se muestra el número de macerados realizados por muestra utilizando 3 individuos por cada macerado, con 7 repeticiones.

No. MUESTRA	No. ABEJORROS / MUESTRA	ABEJORROS ANALIZADOS (repeticiones)							TOTAL DE ABEJORROS ANALIZADOS
		MACERADO 1	MACERADO 2	MACERADO 3	MACERADO 4	MACERADO 5	MACERADO 6	MACERADO 7	
		1	2	3	4	5	6	7	
23	25	3	3	3	3	3	3	3	21
24	25	3	3	3	3	3	3	3	21
	50	6	6	6	6	6	6	6	42

Una vez obtenido el macerado se procedió a la realización de 2 tipos de frotis:

A) Frotis por metodología de Cantwell (frescos)

B) Frotis por tinción tricrómica de Gomori

A) Preparación del frotis mediante método de Cantwell. Se puso una gota de la suspensión proveniente del macerado de los abdómenes de abejorros en una laminilla. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos sobre la gota de la suspensión y se examinó el frotis fresco bajo un microscopio óptico a un aumento de 400 X.

B) Preparación del frotis mediante tinción tricrómica de Gomori. La suspensión obtenida de los macerados se colocó en tubos de endorff de 3µl, permitiendo que reposara la suspensión por 15 minutos. Posteriormente se retiró el sobrenadante con una micropipeta, cada muestra requirió el uso de puntas de micropipeta y tubos de endorff nuevos. Una vez retirado el sobrenadante se colocó 1µl de fijador (Schaudinn) en cada muestra, se agitó ligeramente la suspensión para permitir la homogenización. La solución del macerado con el fijador se dejó reposar por 24h a temperatura ambiente antes de proceder con la tinción.

En una laminilla se realizaron frotis delgados con puntas de micropipetas nuevas, permitiendo que la muestra secase al aire por completo. Posteriormente se colocaron las soluciones de la tinción tricrómica de Gomori en vasos de Coplin prosiguiendo con la tinción en el orden y tiempos a continuación:

- Etanol 70% → 5 minutos
- Etanol 70% → 5 minutos
- Etanol yodado → 5 minutos
- Etanol 70% → 5 minutos
- Etanol 70% → 5 minutos
- Solución colorante (Tricrómica de Gomori) → 7 minutos
- Etanol ácido → Sumergidos 3-4 veces (lavados)
- Etanol 96% → Sumergidos 3-4 veces (lavados)
- Etanol absoluto → 1 minuto

- Xilol grado reactivo → 2 cambios de 2 minutos cada uno
- Montados en resina sintética (Entellan) permitiendo secar a temperatura ambiente

6.3. Microscopía

Tanto los frotis frescos (Cantwell) como los montajes obtenidos con tinción tricrómica de Gomori fueron observados con un microscopio óptico (Olympus Cx 31) a un aumento de 40 X para los frotis frescos y a 100 X (con aceite de inmersión) para los montajes de tinción. Cada laminilla se observó comenzando en el borde superior izquierdo y se avanzó un campo de visión a la vez hasta que se encontró el borde derecho de la laminilla. Cada campo de visión fue examinado en busca de esporas de *Nosema* spp. (3-4 minutos por campo de visión). Las esporas de *Nosema* spp. fueron identificadas siguiendo Fries *et al.*, (2013), Fantham y Porter 1914. La tinción tricrómica de Gomori permite diferenciar las esporas de otras estructuras similares que pudieran ser confundibles en la muestra, por lo que su uso fue necesario para confirmar que las esporas pertenecían al microsporidio *Nosema*, con esta tinción las esporas se observan con una coloración rojiza-rosada.

6.4. Análisis de los datos

Se determinó la prevalencia como el porcentaje de muestras que resultaron positivas a esporas de *Nosema* spp. de:

- 1) las 22 colonias de abejorros de ECOSUR
- 2) los ejemplares del sitio A y el sitio B de las 2 localidades de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas

Para esto se determinó como muestra positiva, aquella que, a la observación microscópica, tanto de frotis frescos como de frotis teñidos, presentara estructuras positivas a esporas de *Nosema* spp. Además, se determinó el porcentaje de detección del microsporidio como el número de macerados que resultaron positivos de acuerdo con el total de macerados realizados por colonia; comparando el resultado obtenido por metodología de Cantwell y por tinción tricrómica de Gomori.

$$\textit{Prevalencia} = \frac{\textit{Número de colonias infectadas}}{\textit{Población expuesta (susceptible)}} \times 100$$

$$\textit{Porcentaje de Detección} = \frac{\textit{Número de macerados positivos}}{\textit{Total de macerados analizados}} \times 100$$

7 RESULTADOS

7.1. Determinación de la prevalencia de *Nosema* spp. en abejorros nativos

1) Prevalencia de *Nosema* en abejorros de ECOSUR

Las 22 colonias de abejorros *B. ephippiatus* que fueron analizadas, se clasificaron con respecto al tamaño de la colonia (No. de individuos/colonia) y en base al número de macerados realizados por colonia (número de repeticiones) obteniendo así 3 grupos:

Grupo 1) 14 colonias de entre 90-110 individuos, con 2 repeticiones por colonia

Grupo 2) 2 colonias de entre 120-130 individuos con 3 repeticiones por colonia

Grupo 3) 6 colonias de 150 individuos con 4 repeticiones por colonia

Se obtuvo el porcentaje de infección (prevalencia) por *Nosema* spp. y el porcentaje de detección del microsporidio utilizando el método de Cantwell y la técnica de tinción tricrómica de Gomori.

Mediante el método de Cantwell las colonias pertenecientes al grupo 1 presentaron una prevalencia del 50% (n=7), con una detección del 25%, para el grupo 2 se obtuvo una prevalencia del 100% (n= 2) con una detección del 66% y el grupo 3 una prevalencia del 100% (n=6) con una detección del 54% (**Cuadro 6**).

Mediante el método de tinción tricrómica de Gomori las colonias del grupo 1 presentaron una prevalencia del 80% (n=12), con una detección del 42% para el grupo 2 se obtuvo una

prevalencia del 100% (n= 2) con una detección del 83% y el grupo 3 una prevalencia del 100% (n=6) con una detección del 75% (**Cuadro 7**).

Se encontró así, que los porcentajes de infección (prevalencia) de las colonias pertenecientes al grupo 2 (120-130 individuos) fueron del 100% tanto por método de Cantwell como por tinción tricrómica de Gomori, además en este grupo se presentó un incremento en los porcentajes de detección de ambas técnicas, en comparación con los grupos 1 y 3 (**Figura 6**)

De las 22 colonias analizadas, un total de 15 colonias resultaron positivas a *Nosema* spp., de tal forma que, la prevalencia observada en el laboratorio de crianza de abejorros *B. ephippiatus* de ECOSUR es de al menos el 73% con una detección del 60% mediante el método de Cantwell y una prevalencia de al menos 93% con una detección del 70% mediante el método de tinción tricrómica de Gomori (**Cuadro 8, Figura 7, Figura 8**).

Cuadro 6. Colonias de abejorros *B. ephippiatus* analizadas para la detección de *Nosema* spp. por microscopía, utilizando el método de Cantwell. Se muestra la prevalencia y el porcentaje de detección.

Colonias (grupo)	No. colonias analizadas	No. de colonias positivas	Prevalencia por método de Cantwell (%)	No. macerados analizados	No. macerados positivos	Detección (%)
Grupo 1	14	7	50%	28	7	25%
Grupo 2	2	2	100%	6	4	66%
Grupo 3	6	6	100%	24	13	54%
	22	15		58	24	

Cuadro 7. Colonias de abejorros *B. ephippiatus* analizadas para la detección de *Nosema* spp. por microscopía, utilizando el método de tinción tricrómica de Gomori. Se muestra la prevalencia y el porcentaje de detección.

Colonias (grupo)	No. colonias analizadas	No. de colonias positivas	Prevalencia por tinción tricrómica de Gomori (%)	No. macerados analizados	No. macerados positivos	Detección (%)
Grupo 1	14	12	85%	28	12	42%
Grupo 2	2	2	100%	6	5	83%
Grupo 3	6	6	100%	24	18	75%
	22	20		58	35	

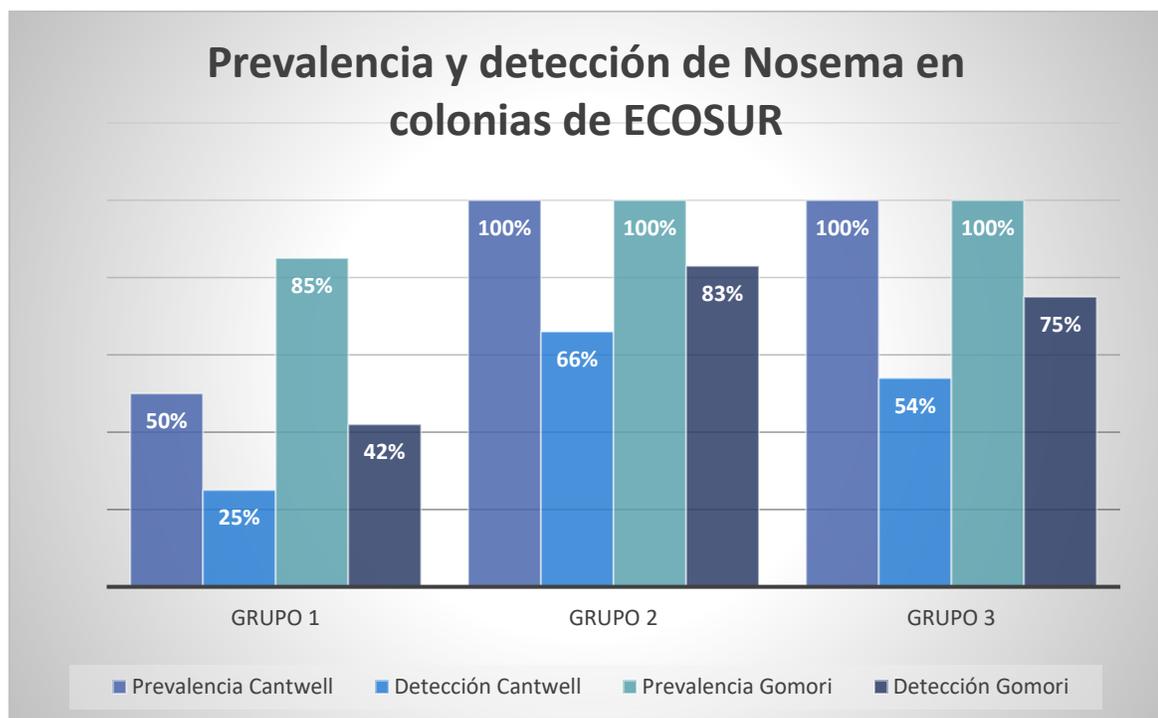


Figura 6. Porcentajes de prevalencia y detección de *Nosema* spp. de los 3 grupos de colonias analizadas mediante método de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori.

Cuadro 8. Cuadro comparativo que muestra la prevalencia detectada y el porcentaje de detección mediante método de Cantwell y mediante tinción tricrómica de Gomori de las colonias manejadas de abejorros *B. ephippiatus* de ECOSUR.

No. colonias analizadas	No. de colonias positivas a Nosema	Prevalencia por método de Cantwell (%)	Detección (%)	Prevalencia por tinción tricrómica de Gomori	Detección (%)
22	15	68%	48%	91%	67%

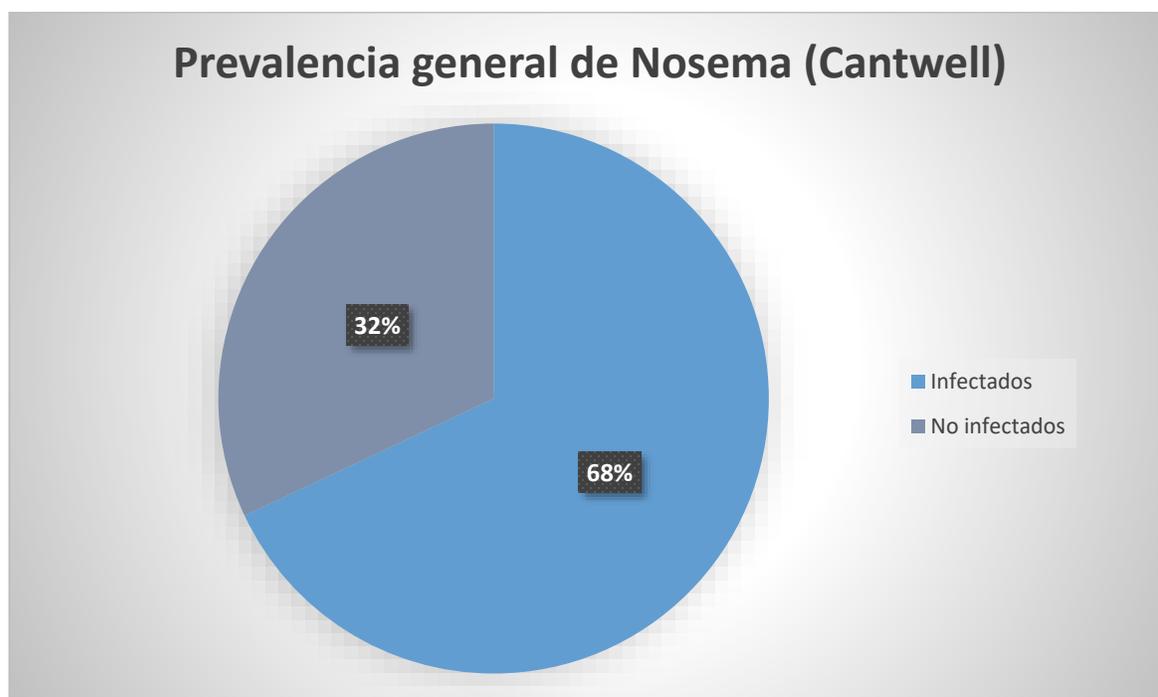


Figura 7. Prevalencia encontrada en las colonias manejadas del laboratorio de crianza de ECOSUR analizadas mediante método de Cantwell.

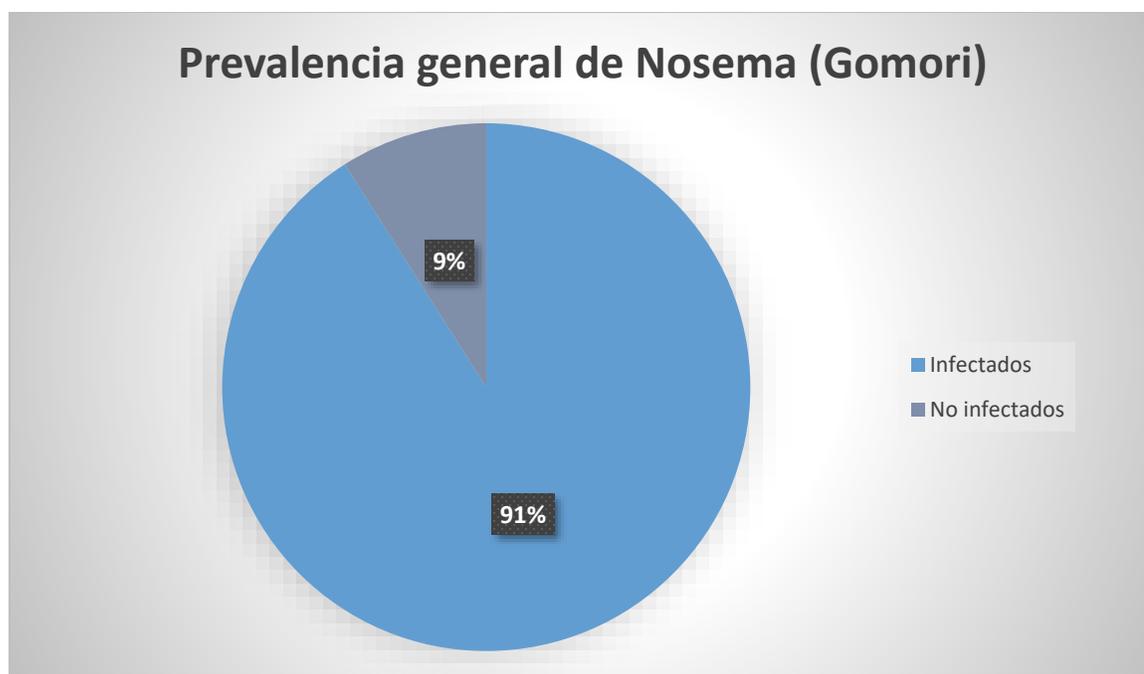


Figura 8. Prevalencia encontrada en las colonias manejadas del laboratorio de crianza de ECOSUR analizadas mediante método de tinción tricrómica de Gomori.

2) Prevalencia de Nosema en abejorros silvestres colectados en campo

De los 50 abejorros silvestres colectados en campo, un total de 42 abejorros *B. ephippiatus* fueron analizados mediante método de Cantwell y mediante tinción tricrómica de Gomori; se determinó la prevalencia por sitio de muestreo, así como el porcentaje de detección con base al número de macerados (repeticiones) que resultaron positivos. Tanto el sitio A como el sitio B (Carretera Internacional- Periférico Norte Poniente, respectivamente) presentaron una prevalencia de al menos el 29% con igual porcentaje de detección mediante método de Cantwell y una prevalencia de al menos el 43% con igual porcentaje de detección en el sitio A, y del 100% con mismo porcentaje de detección en el sitio B mediante método de tinción tricrómica de Gomori (**Cuadro 9-A, B**).

Se muestran los porcentajes de infección y detección obtenidos de cada zona mediante las dos técnicas utilizadas (**Figura 9**).

Cuadro 9. Prevalencia detectada en los abejorros silvestres colectados en dos sitios del municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. **(A)** prevalencia y porcentaje de detección obtenidos mediante método de Cantwell y **(B)** prevalencia y porcentaje de detección obtenidos mediante tinción tricrómica de Gomori.

A

Muestra	No. individuos por muestra	No. individuos analizados	No. individuos positivos	Prevalencia por método de Cantwell (%)	No. macerados analizados	No. macerados positivos	Detección (%)
A	25	21	6	29%	7	6	29%
B	25	21	6	29%	7	6	29%
	50	42	12		14	12	

B

Muestra	No. individuos por muestra	No. individuos analizados	No. individuos positivos	Prevalencia por tinción tricrómica de Gomori (%)	No. macerados analizados	No. macerados positivos	Detección (%)
A	25	21	9	43%	7	9	43%
B	25	21	21	100%	7	21	100%
	50	42	30		14	30	

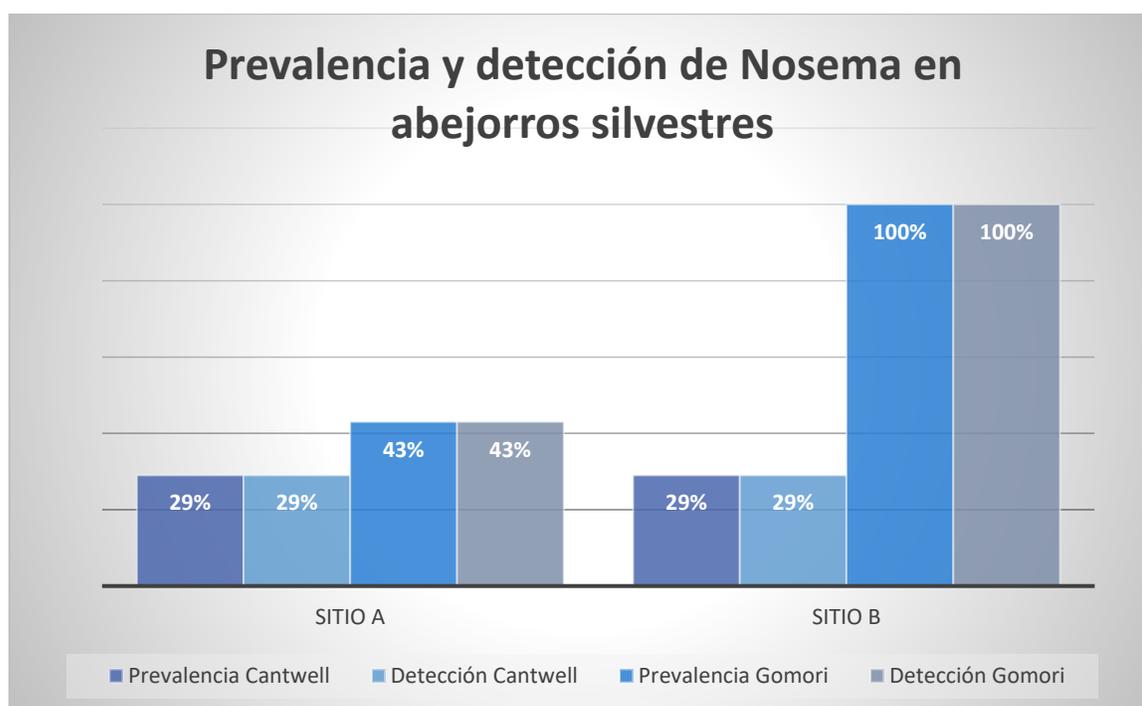


Figura 9. Porcentajes de prevalencia y detección de *Nosema* spp. en los abejorros silvestres analizados mediante método de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori.

7.2. Análisis microscópico de las muestras mediante Método de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori.

Las muestras analizadas al microsporidio de campo brillante permitieron detectar la presencia de esporas, mismas que tenían propiedad de fluorescencia con alto índice de refracción y formas desde ovaladas a alargadas que son los parámetros básicos de verificación (**Figura 10 J-M**). Sin embargo, las muestras presentaron en su mayoría una baja o nula cantidad de esporas de *Nosema*, por lo que los frotis analizados requirieron una labor aún más exhaustiva para su observación y diagnóstico.

Las muestras que fueron teñidas (tinción tricrómica de Gomori), presentaron la tinción característica de la espora, observándolas con una coloración rojiza-rosada propia de la tinción realizada; se pudieron observar esporas de diversas formas desde redondeadas a alargadas. Además, en la gran mayoría de las muestras se observaron esporas dispersas, y sólo en algunas se observaron esporas aglomeradas (**Figura 11 N-Q**).

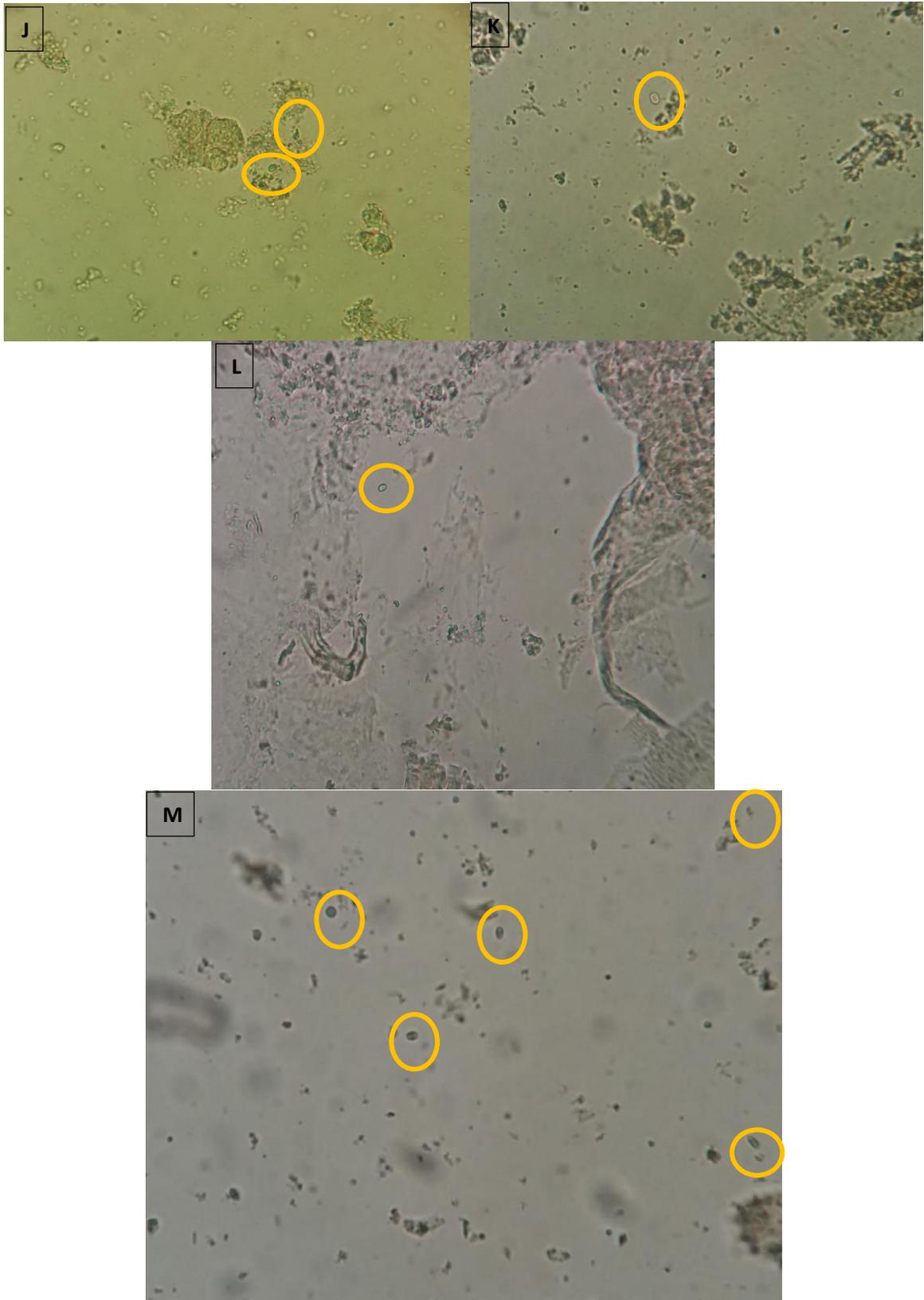


Figura 10. (J-M) Micrografías de esporas de *Nosema* spp. (círculos naranjas), de frotis frescos obtenidos del macerado de abdómenes de abejorros *B. ephippiatus* analizadas mediante microscopía siguiendo la metodología de Cantwell.

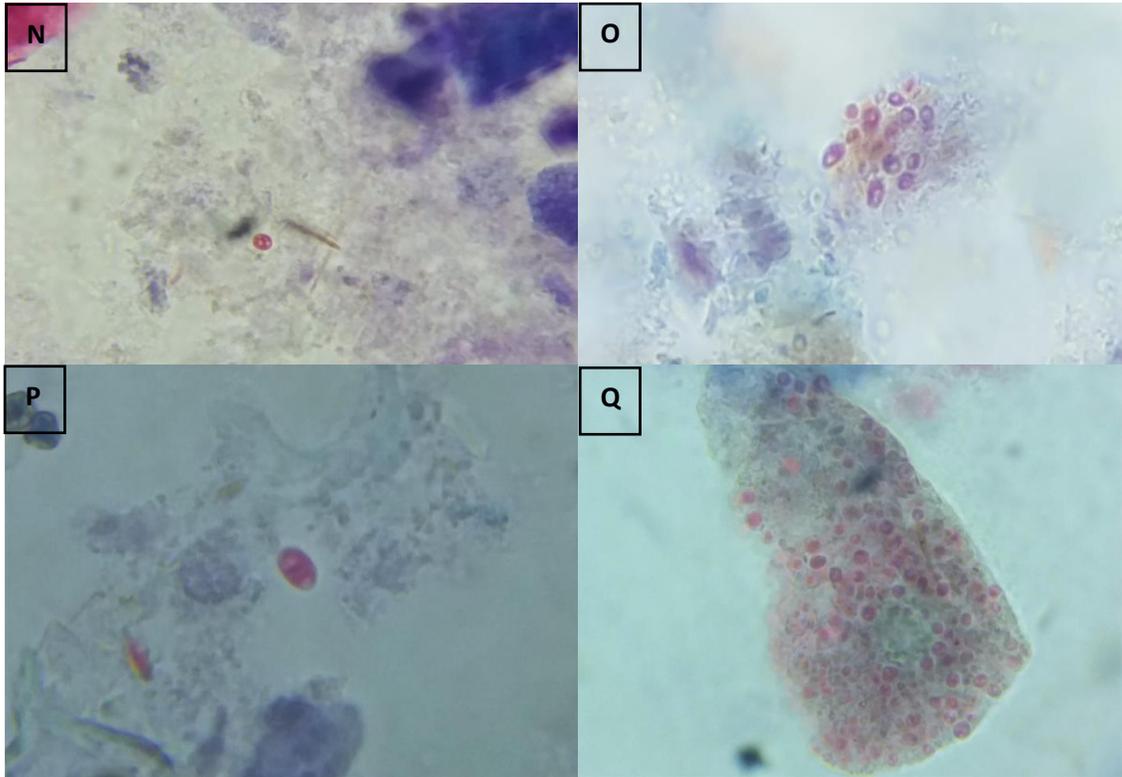


Figura 11. Micrografías de esporas de *Nosema* spp. de los montajes obtenidos de abdómenes de abejorros *B. ephippiatus* analizados mediante tinción tricrómica de Gomori en donde se observan esporas de *Nosema* spp. teñidas de rosa-rojizo. **N y P)** Espora de *Nosema* aislada/dispersa. **O y Q)** Esporas de *Nosema* aglomeradas.

8 DISCUSIÓN

En este estudio se pudo documentar la prevalencia del microsporidio *Nosema* spp. tanto en las colonias manejadas de abejorros *B. ephippiatus* del laboratorio de ECOSUR, así como en las muestras colectadas de abejorros silvestres pertenecientes a dos localidades del municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. El principal resultado obtenido en este estudio es que las colonias de abejorros de ECOSUR presentan una prevalencia importante, encontrando en los 3 grupos analizados una prevalencia de por lo menos el 50% (metodología de Cantwell y tinción tricrómica de Gomori), alcanzando prevalencias de hasta el 80 y 100%. Esto confirma la hipótesis planteada, con lo que se asume que las condiciones que se mantienen dentro del laboratorio de crianza son un factor que influye en las altas prevalencias de estos abejorros, esto sucede por diversos factores como:

- 1) la transmisión del microsporidio a la descendencia, a través de reinas infectadas que han sido colectadas en campo para la fundación de colonias, como ha sido sugerido en los trabajos realizados por Cordes (2010) quien menciona que una de las principales formas de transmisión de *Nosema* en abejorros es mediante reinas infectadas que han hibernado y posteriormente transmiten la enfermedad en la colonia (24).
- 2) la infección de los individuos de la colonia (reinas, obreras y machos) mediante la ingestión de esporas presentes en el polen contaminado (proveniente de colmenas de abejas melíferas infectadas). Los estudios realizados por Graystock et al., (2016) demostraron la presencia de diversos parásitos viables en el polen proveniente de colonias de abejas melíferas (72).
- 3) inadecuada desinfección del material de manejo, con lo que podría suscitar a la infección entre colonias dentro del laboratorio. Las buenas prácticas de manejo y medidas sanitarias se han establecido principalmente en abejas melíferas, para la prevención y control de enfermedades; tal como se menciona en el libro de patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades de las abejas melíferas (78).
- 4) el encierro prolongado de individuos dentro de la colonia, que facilita la propagación y perpetúa el ciclo infeccioso del patógeno, como sucede en colonias de abejas melíferas,

donde se considera que la manifestación de la enfermedad se incrementa tras largos periodos de encierro (climas adversos) lo que obliga a las abejas a permanecer más tiempo dentro de la colmena y defecar dentro de ella, perpetuando e incrementando la transmisión del microsporidio (78).

Con respecto a los datos obtenidos en los abejorros silvestres; se obtuvo una prevalencia de por lo menos el 20% alcanzando hasta el 100%; sin embargo, el haber analizado a los abejorros silvestres de manera grupal (como se hizo con los abejorros de laboratorio) pudo ocasionar falsos positivos en los resultados, dado que no se analizaron los individuos independientemente, otro factor que pudo ser influyente en estos resultados es la fecha de captura, que se realizó en el mes de agosto (temporada de lluvias) por lo que la estacionalidad pudo ser factor importante en el ciclo biológico del microsporidio que como se ha mencionado anteriormente largos periodos de confinamiento propician que la manifestación de la Nosemosis se eleve considerablemente. Los resultados obtenidos en este trabajo son contrastantes con respecto a los obtenidos por Gallot-Lavallée (2016), de un total de 3,285 abejorros silvestres analizados para la detección de patógenos en varios estados de la República mexicana, encontraron una prevalencia del microsporidio *Nosema* spp. del 7.7%, identificando a las especies *N. bombi* y *N. ceranae* mayoritariamente. Específicamente para el estado de Chiapas se muestrearon 11 sitios con un total de 291 abejorros de los cuales 12 individuos resultaron positivos a *Nosema* (4.1%). Con lo que la prevalencia observada en este trabajo no corresponde a aquella obtenida por Gallot-Lavallée, para el estado de Chiapas, aunque algunos estados sí presentaron prevalencias que alcanzaron el 48%, estados con importantes zonas de invernaderos en donde se utilizan abejorros exóticos para la polinización de cultivos; mismos que pueden ser responsables de que se presenten niveles más altos de infección, aunque dichos patrones no han sido comprobados. Resulta importante continuar con estudios sobre la presencia de patógenos en abejorros silvestres de México y poder documentar si es que existen patrones de derrame de enfermedades y en qué estados de la República, para implementar medidas que garanticen la conservación de estas especies.

Cabe destacar que la mayoría de las muestras analizadas (con excepción de 2 muestras del laboratorio y las muestras de campo) presentaron una baja o nula cantidad de esporas, lo que puede sugerir que el tamaño de la muestra analizada fuera insuficiente para detectar al

patógeno en niveles bajos de infección, como lo menciona el libro de guía estadística para la investigación en abejas melíferas (112). La baja cantidad de esporas fue un factor importante al momento de analizar las muestras al microscopio, ya que debido a esto se duplicó la labor realizada en este proceso, con lo que resultó más exhaustiva su comprobación y diagnóstico; por lo que el uso de técnicas moleculares para el diagnóstico fiable de *Nosema*, así como su identificación es requerido.

Por otro lado, las técnicas realizadas para el análisis microscópico permitieron comparar la eficiencia entre cada una de ellas, con lo que se pudo demostrar que la técnica de tinción tricrómica de Gomori utilizada para la detección de esporas, presenta una marcada diferencia en el resultado y diagnóstico; aunque se requieren realizar más trabajos para concluir si estas diferencias son estadísticamente significativas. Esto es importante más aún cuando no se cuenta con métodos moleculares que son certeros en la detección del microsporidio; por lo que se sugiere el uso de tinciones para el diagnóstico de *Nosema* mediante microscopía, como se ha podido documentar en los métodos realizados por Fries et al., (2013) en donde se tienen metodologías estandarizadas de las tinciones utilizadas para la detección de *Nosema* spp. específicamente para la abeja melífera (104,106,107), por lo que es recomendable hacer uso de técnicas complementarias o recurrir a métodos moleculares o computarizados para su correcto diagnóstico, ya que el resultado puede llegar a ser muy subjetivo cuando se utiliza únicamente la microscopía de luz, siendo el técnico o personal capacitado encargado de realizar dichos estudios, y un resultado acertado puede depender de la experiencia del personal.

Riesgos potenciales

El manejo de especies nativas de abejorros que presenten una considerable prevalencia de algún patógeno pone en riesgo su posible comercialización, por el hecho de ser vectores de enfermedades que puedan ser derramados a especies de abejorros silvestres, como ocurre con las especies de abejorros manejados a nivel mundial, como se ha demostrado por diversos autores, la presencia de patógenos en colonias manejadas y su posible propagación a especies silvestres (23,66,73). Con lo que la transmisión de enfermedades entre abejorros manejados

y silvestres se perpetúa, repercutiendo de manera importante en la ecología, salud y bienestar de las poblaciones nativas.

Manejo responsable de colonias de abejorros

Este estudio permitió conocer cómo se encuentran las colonias de abejorros nativos que son criados en laboratorio, con el fin de obtener datos que puedan ser de utilidad para implementar medidas de sanidad en el ámbito bombícola, y poder contribuir al manejo adecuado de abejorros nativos, ya que es de vital importancia mantener colonias de abejorros manejados libres de patógenos que como ya se mencionó, representan un riesgo importante y son factor calve en la disminución de las poblaciones de abejorros silvestres que se presentan a nivel mundial.

El manejo de abejorros para su comercialización debe mantener las mejores prácticas desde su crianza hasta su utilización en la polinización de los diversos cultivos de interés; con el fin de mantener colonias de abejorros libres de patógenos, sugiriendo para la crianza de abejorros algunas medidas como las que ya se han descrito para el manejo de colmenas de las abejas melíferas como son: la esterilización del equipo de manejo, revisión periódica de colonias, muestreos aleatorios para la detección de enfermedades, eliminación/ sacrificio de colonias que resulten positivas a enfermedades altamente virulentas, flujos de aire (positivo-negativo) dentro de las instalaciones para evitar la fuga/entrada de individuos, esterilización del alimento provisto para cubrir sus necesidades proteicas (polen), disminuir/eliminar la captura de reinas en campo que puedan ser hospederos de enfermedades, si se mantienen colonias después de la obtención de sexuos controlar su disposición y correcta eliminación al final de su ciclo y finalmente la correcta eliminación y/o esterilización de cajas de desarrollo (colonias) que resulten positivas a Nosema o a algún otro patógeno de alta virulencia. Haciendo hincapié en la importancia que tiene el diagnóstico de enfermedades, en el caso particular de Nosema, enfermedad que se ha identificado ser cada vez más virulenta, asociada con otros factores estresantes y que causan detrimentos en la salud de los abejorros, por lo que su control es vital para conservar especies tan importantes como lo son los abejorros y su diversidad.

9 CONCLUSIONES

1. Este trabajo permitió conocer la prevalencia de la enfermedad asociada a *Nosema* spp. en los abejorros nativos *B. ephippiatus* criados en cautiverio del laboratorio de ECOSUR y de dos localidades del Municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas.
2. Es el primer trabajo que permite validar el uso de una muestra pequeña (3 abdómenes), resultando factible para el diagnóstico de la enfermedad asociada a *Nosema* spp.
3. La técnica de tinción tricrómica de Gomori permitió determinar con mayor certeza la presencia de esporas, es recomendable para diagnosticar de manera certera la enfermedad sobre todo en colonias que presentan una baja esporulación; sin embargo, es una técnica laboriosa que requiere más tiempo para su realización, además de que el uso de reactivos de tinción representa un costo mayor en comparación con la técnica de Cantwell.
4. Las técnicas microscópicas son útiles para el diagnóstico de Nosemosis en abejorros, sin embargo, se recomienda el uso complementario de técnicas moleculares complementarias, para la identificación y diagnóstico de la enfermedad.
5. Se comprobó que el uso de una muestra pequeña es útil para el diagnóstico de la enfermedad, dado el tamaño de las poblaciones de colonias de abejorros, se requieren estudios posteriores en donde se estandarice el tamaño de la muestra, para el diagnóstico de *Nosema* spp.
6. Las prevalencias obtenidas en las colonias de abejorros manejados de ECOSUR son altas, y aunque no fue estudio de este trabajo, el manejo y las medidas de sanidad en el laboratorio de crianza pueden ser objeto de estudio para trabajos posteriores, con el fin de reducir los porcentajes de prevalencia y mantener colonias con estatus libres de parásitos en este caso asociados al microsporidio *Nosema* spp.

10 REFERENCIAS

1. Díaz S, Settele J, Brondízio E.S, Ngo H. T, Guèze M, Agard J, et al. Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. [Internet]. 2019. Available from: www.ipbes.net
2. Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2007;274(1608):303–13.
3. Camacho Valdez V, Ruiz Luna A. Marco conceptual y clasificación de los servicios ecosistémicos [Internet]. 2012. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/235985361>
4. Corredor Camargo ES, Fonseca Carreño JA, Páez Barón EM. Los servicios ecosistémicos de regulación: tendencias e impacto en el bienestar humano. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2012 May 15;3(1):77.
5. Rose T, Kremen C, Thrupp A, Gemmill-Herren B, Graub B, Azzu N, et al. Mainstreaming of biodiversity and ecosystems services with a focus on pollination. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*; 2016. 53 p.
6. Pantoja Alberto, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Principios y avances sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe. *FAO*; 2014.
7. Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. Vol. 540, *Nature*. Nature Publishing Group; 2016. p. 220–9.
8. Garibaldi LA, Muchhala N, Motzke I, Bravo-Monroy L, Olschewski R, Klein AM. Services from Plant-Pollinator Interactions in the Neotropics. 2011.

9. Guzmán Díaz MÁ, Balboa Aguilar CC, Vandame R, Albores González ML, González Acereto JÁ. Manejo de las abejas nativas sin aguijón en México - SIBE [Internet]. 2011 [cited 2020 Nov 29]. Available from: <https://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000024638>
10. Hoffman F. Biodiversity and pollination: flowering plants and flower-visiting insects in agricultural and semi-natural landscapes. Haren, the Netherlands.; 2005.
11. Meeus I, Smagghe G, Eraerts M. Safe-Guarding Bee Diversity and Food Provisioning. Reference Module in Food Science. 2017 Jan 1.
12. IPBES. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. [Internet]. Potts SG, Imperatriz-Fonseca VL, Ngo HT, editors. 2016. 552 p. Available from: www.ipbes.net
13. Michener CD. The Bees of the World. 2nd ed. Baltimore; 2007.
14. Koetz A. Ecology, Behaviour and Control of *Apis cerana* with a Focus on Relevance to the Australian Incursion. *Insects*. 2013 Oct 21;4(4):558–92.
15. Oldroyd BP, Nanork P. Conservation of Asian honeybees. *Apidologie*. 2009 May;40(3):296–312.
16. Velthuis HW, Doorn A van. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*. 2006; 37:421–51.
17. Boyle NK, Pitts-Singer TL. Assessing blue orchard bee (*Osmia lignaria*) propagation and pollination services in the presence of honeybees (*Apis mellifera*) in Utah tart cherries. *PeerJ*. 2019;2019(9).
18. Muhyideen Tella L. Pollination activity of stingless bees (Meliponini) in Agro-forest Zone. Academia.edu [Internet]. [cited 2020 Nov 22]. Available from: https://www.academia.edu/6030069/Pollination_activity_of_stingless_bees_Meliponini_in_Agro_forest_Zone

19. Peterson SS, Artz DR. Production of Solitary Bees for Pollination in the United States. *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*. 2014 Jan 1;653–81.
20. The Eastern Carpenter Bee: Beneficial Pollinator or Unwelcome Houseguest [Internet]. [cited 2020 Dec 1]. Available from: <https://extension.psu.edu/the-eastern-carpenter-bee-beneficial-pollinator-or-unwelcome-houseguest>
21. Torres-Ruiz A, Jones RW, Barajas RA. Present and potential use of bees as managed pollinators in Mexico. Vol. 38, *Southwestern Entomologist*. 2013. p. 133–47.
22. Vanbergen AJ, Garratt MP, Vanbergen AJ, Baude M, Biesmeijer JC, Britton NF, et al. Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. Vol. 11, *Frontiers in Ecology and the Environment*. Wiley Blackwell; 2013. p. 251–9.
23. Graystock P, Blane EJ, McFrederick QS, Goulson D, Hughes WOH. Do managed bees drive parasite spread and emergence in wild bees? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2016 Apr 1;5(1):64–75.
24. Cordes N. The role of pathogens in the decline of North American bumble bees with a focus on the microsporidium *Nosema bombi* [Internet]. [Illinois]: University of Illinois; 2010. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/43919379>
25. Kremen C, Williams NM, Thorp RW. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification [Internet]. 2002. Available from: www.pnas.org.
26. Cane J. Global warming, advancing bloom and evidence for pollinator plasticity from long-term bee emergence monitoring. *Insects*. 2021 May 1;12(5).
27. Vides-Borrell E, Porter-Bolland L, Ferguson BG, Gasselin P, Vaca R, Valle-Mora J, et al. Polycultures, pastures and monocultures: Effects of land use intensity on wild bee diversity in tropical landscapes of southeastern Mexico. *Biological Conservation*. 2019 Aug 1; 236:269–80.
28. Murray TE, Coffey MF, Kehoe E, Horgan FG. Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biological Conservation*. 2013 Mar; 159:269–76.

29. Dorneles AL, Rosa-Fontana A de S, dos Santos CF, Blochtein B. Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. *Environmental Pollution*. 2021 Mar 1; 272:116414.
30. Melathopoulos A, Ovinge L, Veiga PW, Castillo C, Ostermann D, Hoover S. Viruses of managed alfalfa leafcutting bees (*Megachille rotundata* Fabricus) and honeybees (*Apis mellifera* L.) in Western Canada: Incidence, impacts, and prospects of cross-species viral transmission. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2017 Jun 1; 146:24–30.
31. Fisogni A, Hautekèete N, Piquot Y, Brun M, Vanappelghem C, Michez D, et al. Urbanization drives an early spring for plants but not for pollinators. *Oikos*. 2020 Nov 1;129(11):1681–91.
32. Bauer DM, Sue Wing I. The macroeconomic cost of catastrophic pollinator declines. *Ecological Economics*. 2016 Jun 1; 126:1–13.
33. Martínez-López O, Koch JB, Martínez-Morales MA, Navarrete-Gutiérrez D, Enríquez E, Vandame R. Reduction in the potential distribution of bumble bees (Apidae: *Bombus*) in Mesoamerica under different climate change scenarios: Conservation implications. *Global Change Biology*. 2021 May 1;27(9):1772–87.
34. Arbulo N. Nosemaceranae en los abejorros nativos *Bombus atratus* y *B. bellicosus*. [Montevideo]: PEDECIBA; 2015.
35. Owen RE. Rearing Bumble Bees for Research and Profit: Practical and Ethical Considerations. In: *Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research*. InTech; 2016.
36. Hefetz A, Grozinger CM. Hormonal Regulation of Behavioral and Phenotypic Plasticity in Bumblebees. In: *Hormones, Brain and Behavior: Third Edition*. Elsevier; 2017. p. 453–64.
37. Abrahamovich AH, Díaz NB, Morrone JJ. Distributional patterns of the neotropical and andean species of the genus *bombus* (Hymenoptera: Apidae). Vol. 20, *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.). 2004.
38. Brasero N, Vandame R, Sagot P, Martinet B, Valterová I, Rasmont P. Thoracobombus from Mexico: a description of the male species-specific cephalic labial gland secretions. *Apidologie* [Internet]. 2019;50(2):183–94. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0629-4>

39. Abrahamovich AH, Díaz NB. Abejorros sociales de la Región Neotropical (Hymenoptera: Apidae). Vol. 3, Biota Colombiana. Colombia; 2002.
40. Vandame R, Pineda E, Sagot P, Mérida J, Vergara C, Martínez O, et al. Diversidad y conservación de los abejorros de Mesoamérica. ResearchGate. 2017;
41. Hines HM. Historical biogeography, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). Systematic Biology. 2008 Feb;57(1):58–75.
42. Williams P, Jepsen S. Bumblebee Specialist Group Report 2019.
43. Williams P, Jepsen S. Bumblebee Specialist Group Report 2020.
44. Torres-Ruiz A, Jones RW. Comparison of the efficiency of the bumble bees *Bombus impatiens* and *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae) as pollinators of tomato in greenhouses. Journal of Economic Entomology. 2012 Dec;105(6):1871–7.
45. Magaña Magaña MA, Tavera Cortés ME, Salazar Barrientos LL, Sanginés García JR. Productividad de la apicultura en México y su impacto sobre la rentabilidad. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2016; 7:1103–15.
46. Length P, Ranta E, Lundberg H, Ranta HL, Lundberg E, Ranta E. Resource partitioning in Bumblebees: the significance of differences in proboscis length. Vol. 35, Source: Oikos. Copenhagen; 1980.
47. Herbertsson L, Lindström SAM, Rundlöf M, Bommarco R, Smith HG. Competition between managed honeybees and wild bumblebees depends on landscape context. Basic and Applied Ecology. 2016 Nov 1;17(7):609–16.
48. Owen RE. Applications of Morphometrics to the Hymenoptera, Particularly Bumble Bees (*Bombus*, Apidae) [Internet]. Canada; 2012. Available from: www.intechopen.com
49. Martínez de Castro Dubernard A, Martínez López O, Castro Siller A, Argüello Nájera O, Vergara Briceño CH, Vandame R. Manual de crianza y manejo de abejorros nativos de Mesoamérica. San Cristóbal de las Casas; 2019.
50. Pinilla-Gallego MS, Nates-Parra G. Visitantes florales y polinizadores en poblaciones silvestres de agraz (*Vaccinium meridionale*) del bosque andino colombiano. Revista Colombiana de Entomología. 2015;112–9.

51. Torres Ruiz A. Abejorros nativos de México como polinizadores manejados. 2013.
52. Falcão BF, Schlindwein C, Stehmann JR. Pollen release mechanisms and androecium structure in *Solanum* (Solanaceae): Does anther morphology predict pollination strategy? *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 2016 Sep 1; 224:211–7.
53. ENA. Encuesta Nacional Agropecuaria. 2019.
54. Producción de jitomate en invernadero | Delegación SADER Ciudad de México | Gobierno | gob.mx [Internet]. [cited 2020 Dec 6]. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/cdmx/articulos/produccion-de-jitomate-en-invernadero?idiom=es>
55. FIRA. Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial, tomate rojo. 2019.
56. SAGARPA. Jitomate Mexicano, planeación agrícola nacional. 2017.
57. Vergara CH, Fonseca-Buendía P. Pollination of greenhouse tomatoes by the Mexican bumblebee *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Pollination Ecology* [Internet]. 2012;7(4):27–30. Available from: http://www.conasamexico.org.mx/conasa/docs_17a_reunion/c
58. López Fabila AY. El manejo y comercio de abejorros para la polinización de cultivos en México, un análisis desde la ecología política. 2017.
59. Gallot-Lavallée M, Schmid-Hempel R, Vandame R, Vergara CH, Schmid-Hempel P. Large scale patterns of abundance and distribution of parasites in Mexican bumblebees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2016 Jan 1; 133:73–82.
60. Yoon HJ, Park IG, Lee KY, Kim MA, Jin BR. Interspecific Hybridization of the Imported Bumblebee *B. terrestris* and the Korean Native Bumblebee *Bombus hypocrita sapporoensis*. *Entomological Research* [Internet]. 2011 Nov [cited 2022 Jan 10];41(6):292–292. Available from: https://www.researchgate.net/publication/262823065_Interspecific_Hybridization_of_the_Imported_Bumblebee

61. Crean Asociación Mexicana de Criadores de Abejorros, para mejorar polinización de cultivos agrícolas | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx [Internet]. [cited 2020 Dec 26]. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crean-asociacion-mexicana-de-criadores-de-abejorros-para-mejorar-polinizacion-de-cultivos-agricolas>
62. Fuentes-Montemayor E, Madrid A. Biología de *Bombus ephippiatus* Say (Hymenoptera, Apidae) [Internet]. ResearchGate. [Puebla]; 2003. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/37612579>
63. Duennes MA, Petranek C, de Bonilla EPD, Mérida-Rivas J, Martínez-López O, Sagot P, et al. Population genetics and geometric morphometrics of the *Bombus ephippiatus* species complex with implications for its use as a commercial pollinator. *Conservation Genetics*. 2017 Jun 1;18(3):553–72.
64. Schmid-Hempel P. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: Addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. Vol. 88, *Naturwissenschaften*. 2001. p. 147–58.
65. Wilson K, Knell R, Boots M, Koch-Osborne J. Group living and investment in immune defence: an interspecific analysis. Vol. 72, *Journal of Animal Ecology*. 2003.
66. Colla SR, Otterstatter MC, Gegear RJ, Thomson JD. Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological Conservation*. 2006 May;129(4):461–7.
67. Shafer ABA, Williams GR, Shutler D, Rogers REL, Stewart DT. Cophylogeny of nosema (Microsporidia: Nosematidae) and bees (Hymenoptera: Apidae) suggests both cospeciation and a host-switch. *Journal of Parasitology*. 2009 Feb;95(1):198–203.
68. Techer MA, K Roberts JM, Cartwright RA, Mikheyev AS, Reed Cartwright csiroau A, Mikheyev alexandermikheyev AS. The first steps toward a global pandemic: Reconstructing the demographic history of parasite host switches in its native range.
69. Argun Karsli B, Gürel F. Identification of Some Important Bumblebee (*Bombus terrestris* L.) Parasites by molecular methods. *Uludag Bee Journal* Novemer. 2014;14(2):88–98.

70. Living With Environmental Change. How are pests and diseases affecting bee pollinators? 2015; Available from: www.lwec.org.uk
71. Melathopoulos A, Ovinge L, Veiga PW, Castillo C, Ostermann D, Hoover S. Viruses of managed alfalfa leafcutting bees (*Megachille rotundata* Fabricus) and honeybees (*Apis mellifera* L.) in Western Canada: Incidence, impacts, and prospects of cross-species viral transmission. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2017 Jun 1; 146:24–30.
72. Graystock P, Jones JC, Pamminer T, Parkinson JF, Norman V, Blane EJ, et al. Hygienic food to reduce pathogen risk to bumblebees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2016 May 1; 136:68–73.
73. Murray TE, Coffey MF, Kehoe E, Horgan FG. Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biological Conservation*. 2013 Mar; 159:269–76.
74. Teixeira ÉW, Guimarães-Cestaro L, Alves MLTMF, Message D, Martins MF, Luz CFP da, et al. Spores of *Paenibacillus larvae*, *Ascosphaera apis*, *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in bee products supervised by the Brazilian Federal Inspection Service. *Revista Brasileira de Entomologia*. 2018 Jul 1;62(3):188–94.
75. Vdvra J, Larsson JIR. Structure of the Microsporidia. In: Wittner M, editor. *The Microsporidia and Microsporidiosis* [Internet]. Washington, D.C.; 1999. Available from: www.asmscience.org
76. Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Vol. 56, *Annual Review of Microbiology*. 2002. p. 93–116.
77. Fries I, de Ruijter A, Paxton RJ, da Silva AJ, Slemenda SB, Pieniazek NJ. Molecular characterization of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of Apicultural Research*. 2001;40(3–4):91–6.
78. Guzmán Novoa E, Correa Benítez A, Zozaya Rubio A, Espinosa Montaña L, Prieto Merlos D, Reyes Cuayahuitl M, et al. *Patología, Diagnóstico y Control de las Principales Enfermedades y Plagas de las Abejas Melíferas*. 2da Edición. Guzmán Novoa E, Correa Benítez A, editores. México, D.F.; 2015.

79. Solter LF. Microsporidia (Phylum Microsporida). In: Capinera JL, editor. Encyclopedia of Entomology. Springer; 2008. p. 2380–3.
80. Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundensen-Rindal D, et al. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honeybee, *Apis mellifera*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 2009 Mar;56(2):142–7.
81. Sánchez Collado JG, Higes M, Barrio L, Martín-Hernández R. Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. Parasitology Research. 2014;113(5):1695–701.
82. Kashyap D, Mishra S, Jaiswal K. Occurrence of Microsporidia in Hymenopterans. International Journal of Scientific Research and Reviews. 2019(2):3899–905.
83. Solter LF. Managed pollinator coordinated agricultural project - Microsporidia: friend, foe (and intriguing creatures). G. Balint, Antala B, Carty C, Mabieme JMA, Amar IB, Kaplanova A, editors. American Bee Journal [Internet]. 2010 [cited 2021 Feb 19];150(December 2010):1147--1150. Available from: <https://experts.illinois.edu/en/publications/managed-pollinator-coordinated-agricultural-project-microsporidia>
84. Davidson EW. History of insect pathology. In: Insect Pathology. Elsevier Inc.; 2012. p. 13–28.
85. Dunn AM, Smith JE. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. 2001.
86. James RR, Li Z. From silkworms to bees: Diseases of beneficial insects. In: Insect Pathology. Elsevier Inc.; 2012. p. 425–59.
87. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniasek NJ. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). European Journal of Protistology. 1996 Aug 30;32(3):356–65.
88. Almasri H, Tavares DA, Diogon M, Pioz M, Alamil M, Sené D, et al. Physiological effects of the interaction between *Nosema ceranae* and sequential and overlapping exposure to

- glyphosate and difenoconazole in the honeybee *Apis mellifera*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021 Jul 1;217.
89. Gómez-Moracho T, Durand T, Lihoreau M. The gut parasite *Nosema ceranae* impairs olfactory learning in bumblebees. *bioRxiv* [Internet]. 2021 [cited 2021 Feb 27]; Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.05.04.442599>
90. Fantham HB, Porter A. The morphology, biology and economic importance of *Nosema bombi* n.sp., Parasitic in Various Humble Bees (*Bombus* spp. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1914 Dec 15;8(3):623–38.
91. Imhoof B, Schmid-Hempel P. Colony success of the bumble bee, *Bombus terrestris*, in relation to infections by two protozoan parasites, *Crithidia bombi* and *Nosema bombi*. *Insectes Sociaux*. 1999;46(3):233–8.
92. Fries I, de Ruijter A, Paxton RJ, da Silva AJ, Slemenda SB, Pieniasek NJ. Molecular characterization of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of Apicultural Research*. 2001;40(3–4):91–6.
93. Otti O, Schmid-Hempel P. *Nosema bombi*: A pollinator parasite with detrimental fitness effects. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2007 Oct 1;96(2):118–24.
94. van der Steen JJM. Infection and transmission of *Nosema bombi* in *Bombus terrestris* colonies and its effect on hibernation, mating and colony founding. *Apidologie*. 2008 Mar;39(2):273–82.
95. Tripodi AD, Cibils-Stewart X, McCornack BP, Szalanski AL. *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) and trypanosomatid prevalence in spring bumble bee queens (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) in Kansas. *J Kans Entomol Soc*. 2014;87(2):225–33.
96. Whittington R, Winston ML. Effects of *Nosema bombi* and its treatment fumagillin on bumble bee (*Bombus occidentalis*) colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2003 Sep 1;84(1):54–8.
97. Brown MJF. Microsporidia: An Emerging Threat to Bumblebees? Vol. 33, *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 754–62.

98. Graystock P, Yates K, Darvill B, Goulson D, Hughes WOH. Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2013 Oct;114(2):114–9.
99. Li J, Chen W, Wu J, Peng W, An J, Schmid-Hempel P, et al. Diversity of nosema associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China. *International Journal for Parasitology*. 2012 Jan;42(1):49–61.
100. Shykoff JA, Schmid-Hempel P. Incidence and effects of four parasites in natural populations of bumble bees in Switzerland. *Apidologie* [Internet]. 1991 [cited 2021 Feb 27];22(2):117–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19910204>
101. McMahon DP, Wilfert L, Paxton RJ, Brown MJF. Emerging Viruses in Bees: From Molecules to Ecology. *Advances in Virus Research*. 2018 Jan 1; 101:251–91.
102. Meeus I, Brown MJF, de Graaf DC, Smaghe G. Effects of Invasive Parasites on Bumble Bee Declines. Vol. 25, *Conservation Biology*. 2011. p. 662–71.
103. Hicks BJ, Pilgrim BL, Perry E, Marshall HD. Observations of native bumble bees inside of commercial colonies of *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) and the potential for pathogen spillover. *Canadian Entomologist*. 2018 Aug 1;150(4):520–31.
104. Fries I, Chauzat MP, Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, et al. Standard methods for Nosema research. Vol. 52, *Journal of Apicultural Research*. 2013.
105. Sokolova YY, Sokolov IM, Carlton CE. Identification of Nosema bombi Fantham and Porter 1914 (Microsporidia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010 Jan;103(1):71–3.
106. Garcia LShore, Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract: approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. 111 p.
107. TRICHROME STAIN SET [Internet]. Remel Lenexa, KS. Available from: www.remel.com
108. Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz MC, Linde A, Genersch E. Five-year cohort study of nosema spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology*. 2010 May;76(9):3032–8.

109. Larsson JIR. Cytological variation and pathogenicity of the bumble bee parasite *Nosema bombi* (Microspora, Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2007 Jan;94(1):1–11.
110. Bravo J, Carbonell V, Valdebenito JT, Figueroa C, Valdovinos CE, Martín-Hernández R, et al. Identification of *Nosema ceranae* in the Valparaíso District, Chile [Internet]. Vol. 46, *Arch Med Vet*. 2014. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov
111. Vavilova V, Sormacheva I, Woyciechowski M, Eremeeva N, Fet V, Strachecka A, et al. Distribution and diversity of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in the natural populations of bumblebees (*Bombus* spp.) from West Siberia. *Parasitology Research*. 2015 Sep 18;114(9):3373–83.
112. Human H, Brodschneider R, Dietemann V, Dively G, Ellis JD, Forsgren E, et al. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. Vol. 52, *Journal of Apicultural Research*. 2013.
113. Patricio Nicolas C, Mauro German C, Sergio Damián A, Paola Verónica B, Hector Luis V. Identificación automática de nosemosis en imágenes microscópicas.
114. Blaker EA, Strange JP, James RR, Monroy FP, Cobb NS. PCR reveals high prevalence of non/low sporulating *Nosema bombi* (microsporidia) infections in bumble bees (*Bombus*) in Northern Arizona. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2014 Nov 1; 123:25–33.
115. Klee J, Tek Tay W, Paxton RJ. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2006 Feb;91(2):98–104.
116. Rutrecht ST, Brown MJF. Within colony dynamics of *Nosema bombi* infections: Disease establishment, epidemiology and potential vertical transmission. *Apidologie*. 2008 Sep;39(5):504–14.
117. Traver BE, Fell RD. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011 May 1;107(1):43–9.