

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



**EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE POBLACIONES DE *Apis mellifera* DESTINADAS
PARA LA FORMACION DE NUCLEOS DE FECUNDACIÓN.**



M.C. Henry Jesús Loeza Concha

**Tesis presentada como requisito para la obtención del grado de Doctor en Ciencias
Biológico Agropecuarias en el área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias.**

Xalisco, Nayarit, Junio de 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



**EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE POBLACIONES DE *Apis mellifera* DESTINADAS
PARA LA FORMACION DE NUCLEOS DE FECUNDACIÓN.**



M.C. Henry Jesús Loeza Concha

**Tesis presentada como requisito para la obtención del grado de Doctor en Ciencias
Biológico Agropecuarias en el área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias.**

Director:

Dr. Carlos Alfredo Carmona Gasca

Co- director:

Dr. Francisco Escalera Valente

Xalisco, Nayarit, Junio de 2019

Xalisco, Nayarit., Junio de 2019

DR. J. DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO (CBAP)
P R E S E N T E

Los suscritos integrantes del Cuerpo Tutorial para asesorar la Tesis titulada: Evaluación sanitaria fenotípica de ecotipos de *Apis mellifera* y criopreservación de semen de zánganos, que presenta el C. Henry Jesús Loeza Concha para obtener el Grado de Doctor en Ciencias con opción terminal en Ciencias Zootécnicas y Veterinarias, damos nuestra aprobación para que continúe con los trámites correspondientes para la obtención de su grado.

Sin otro asunto que tratar, reciba un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dr. Carlos Alfredo Carmona Gasca
Director

Dr. Francisco Escalera Valente
Co-director

Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo
Asesor

Dr. Clemente Lemus Flores
Asesor

Dr. Fidel Ávila Ramos
Asesor

DEDICATORIAS

Con todo mi cariño y amor a mis Padres que con tanta devoción hicieron hasta lo imposible para que pudiera alcanzar mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando más lo necesite en aquellos momentos difíciles, cuando sentí que el camino se había terminado, por siempre mi amor infinito a ustedes.

A ustedes que sin dudar un instante han aplaudido mis triunfos, pero sobre todo por darme la mano en mis fracasos, por sus consejos y regaños, a ti Linyu y Cintia a las que siempre voy amar con todo mi corazón.

A mis sobrinos Naomi, Ana, Iván, Diego y Eduardo, a los cuales con esta tesis les hago saber que cuando te propones algo con tanto entusiasmo y devoción los sueños se logran cumplir.

A mis compañeros y amigos de este hermoso estado de Nayarit, que estuvieron conmigo y compartimos tantas aventuras, experiencias. Gracias a cada uno por hacer de estos tres años maravillosos.

A ti Venecia, mi compañera, amiga y apoyo incondicional, en estos últimos meses, sin tu apoyo, ánimo y amor esta travesía hubiera sido más difícil, te agradezco por tantas ayudas y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis doctoral, sino también para mi vida; eres mi inspiración y mi motivación, por lo que te dedico esta tesis con amor.

A todos y cada uno de ustedes les dedico esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Sin duda la nostalgia se hace presa de mí por aquellos momentos que hicieron traza, y por los amigos que nunca olvidaré. En última instancia me consuelo con el agradecimiento sincero, matizado por un especial cariño a:

-Al CBAP de la Universidad Autónoma de Nayarit por darme la oportunidad de realizar mis estudios doctorales.

-A CONACYT - Por todas facilidades y recursos financieros para el desarrollo de este doctorado.

-Al Director de Unidad Académica de Medicina Veterinaria de Universidad Autónoma de Nayarit, por permitirme realizar diversas investigaciones en sus instalaciones, así mismo por su apoyo incondicional y facilitarme un área para la instalación del apiario experimental.

-A mi director de tesis el Dr. Carlos Alfredo Carmona Gasca, por sus enseñanzas y por compartir sus conocimientos, por ser una guía en esta tesis doctoral, por su comprensión, apoyo, motivación, sobre todo por financiar esta investigación por medio de los fondos PRODEP para nuevos PTC, fondos PIFI 2014-2015 y fondos fundación PRODUCE Nayarit TK-1400215441.

-A los Doctores: Francisco Escalera Valente, Clemente Lemus Flores, Socorro Salgado Moreno, Álvaro Domínguez Rebolledo, y Fidel Ávila Ramos, de quienes estoy infinitamente agradecido por compartirme su tiempo, sus conocimientos y sobre todo por su paciencia, ya que fueron mis guías en este camino, gracias por su infinita dedicación, ayuda y apoyo incondicional.

-Al Sistema Producto Apícola del Estado de Nayarit y a la empresa horizonte apícola por el apoyo y financiamiento de esta tesis doctoral mediante el programa de estímulos a la investigación, Desarrollo de Tecnológico e Innovación (PEI) 2018.

Índice de Contenido

DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
Índice de figuras	viii
Índice de tablas	ix
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Hipótesis	7
2.2. Objetivo general.....	7
2.3. Objetivos Particulares	7
Capítulo 1. Seasonal variation in the prevalence of <i>Varroa</i>, <i>Nosema</i> and <i>Acarapis</i> in hives from which queen bee mating nuclei are produced.	8
Abstract	8
Introduction.....	8
Materials and methods	9
Results.....	11
Discussion.....	12
Conclusión	15
References.....	15
Capítulo 2. Identificación morfométrica de <i>Varroa destructor</i> y su plasticidad por la exposición a timol	22
Resumen.....	22
Introducción	22
Materiales y métodos	23
Resultados.....	25
Discusión	27
Conclusión	28
Referencias.....	29
Capítulo 3. Eficacia del timol sobre la presencia de <i>Varroa</i> y <i>Nosema</i> en colmenas utilizadas para formar núcleos de fecundación.	33
Resumen.....	33
Introducción	33

Materiales y métodos	34
Resultados y discusión	36
Conclusión	38
Referencias.....	38
Capítulo 4. Selección morfométrica y fenotípica de las poblaciones abejas predominantes en colmenas formadoras de núcleos de fecundación.	41
Resumen.....	41
Introducción	41
Materiales y métodos	42
Resultados.....	45
Discusión	48
Conclusión	50
Referencias.....	50
3. CONCLUSIONES	53
4. REFERENCIAS	54

Índice de figuras

Figura 1. Variables medidas: (AED) ancho del escudo dorsal, (LED) longitud del escudo dorsal, (AEG) ancho del escudo genital, (LEG) longitud del escudo genital, (AEA) ancho del escudo anal, (LEA) longitud del escudo anal.	25
--	----

Índice de tablas

Table 1. Seasonal variation in the prevalence of <i>Varroa</i> and <i>Nosema</i> in the HPNM	11
Tabla 2. Media de las variables estudiadas (μm) pertenecientes a las poblaciones de <i>Varroa destructor</i> de 5 apiarios evaluados.	26
Tabla 3. Identificación de variables discriminantes.	26
Tabla 4. Media de las variables estudiadas (μm) pertenecientes a los 8 morfotipos de <i>Varroa destructor</i>	27
Tabla 5. ANOVA de conglomerados jerárquicos k medias	27
Tabla 6. Pruebas de igualdad de las medias antes y después del tratamiento	27
Tabla 7. Efecto del tratamiento con timol sobre la cuantificación de <i>Varroa</i> y <i>Nosema</i> en colmenas formadoras de núcleos de fecundación.....	37
Tabla 8. Número y porcentaje de colonias con morfotipo africano, europeo e híbrido en los apiarios evaluados.....	46
Tabla 9. Identificación de variables discriminantes de los grupos fenotípicos	46
Tabla 10. Media de las variables estudiadas entre grupos jerárquicos	46
Tabla 11. Media de las variables estudiadas pertenecientes a los 7 fenotipos de abejas en las colmenas evaluadas.	47
Tabla 12. Media de las variables estudiadas entre apiarios.....	47

1. RESUMEN

La necesidad de contribuir en el desarrollo de una apicultura que garantice el buen desarrollo de las colmenas en el estado de Nayarit, inspiró en realizar la presente tesis doctoral, por lo que se desarrolló una investigación donde se eslabonaron dos temas fundamentales en el desarrollo de la cría de abejas reinas. El primer objetivo se basó en la evaluación sanitaria de las colmenas formadoras de núcleos de fecundación, mediante el diagnóstico de la presencia de parásitos y micromisetos. El segundo objetivo fue identificar la especie de *Varroa* encontrada en las colmenas formadoras de núcleos de fecundación, mediante el análisis morfométrico el cual se basa en la medición de algún segmento del cuerpo, utilizando principalmente los conceptos de tamaño y forma. Identificar la especie predominante de *Varroa* es de importancia debido a que se considera como el principal patógeno de mayor importancia sanitaria y económica, debido, a que es un vector de enfermedades infecciosas asociadas con trastornos del colapso de las colmenas. Con la finalidad de erradicar o reducir la presencia de este patógeno y el microsporidio *Nosema* el tercer objetivo se basó en evaluar la eficacia del timol sobre la presencia de *Varroa* y *Nosema*; el timol es un agente natural de baja toxicidad con funciones acaricidas y anti fúngicas que no afecta la productividad de las colmenas lo que puede garantizar el buen desarrollo de las reinas, así como la salud de las colmenas donde serán liberadas. En este sentido se hizo uso de otra alternativa que se basa en la identificación y selección de poblaciones resistentes a diversas enfermedades y de características productivas deseables, es decir que el cuarto objetivo se basó en evaluar las poblaciones de *Apis mellifera* predominantes mediante los parámetros morfométricos y fenotípicos de comportamiento (defensivo, higiénico, forrajero y condición de la colmena).

Siguiendo el orden de los objetivos antes mencionados, y con respecto al primero, encontramos que durante el invierno de 2016, de 148 colmenas formadoras de núcleos de fecundación muestreadas, 33.78% presentaron mono infestación por *Varroa*, 10.13% presentaron mono infección por *Nosema* y 45.27% coinfección. En el verano de 2016 de 91 colmenas evaluadas 39.56% presentaron mono infestación por *Varroa*, 5.59% mono infección por *Nosema* y 26.37% coinfección. A través de la identificación morfométrica de 150 ácaros de *Varroa* se determinó que la especie predominante fue *Varroa destructor*, no habiendo evidencia morfométrica de la

infestación por otras especies del género *Varroa*. Con el uso del timol la prevalencia de la varroasis disminuyó del 96.92% pre tratamiento al 56.92% pos tratamiento, por lo que la prevalencia redujo en un 41.27%; por el contrario, la nosemosis fue mayor en 7.4%, de un 76.92% pre tratamiento a 83.08% pos tratamiento. Atraves de la evaluación morfométrica los resultados indicaron que el 87.69% de las colmenas evaluadas presentaron un morfotipo hibrido, el 17.6% europeo y el 4.6% africano; mediante el análisis fenotípico se lograron identificar 7 fenotipos perteneciendo el 12.3% al fenotipo A, 4.61% al B, 9.23% al C, 3.07% al D, 21.53% al F, 1.53% al G, siendo el fenotipo E con 47.69% el que mejor comportamiento fenotípico presentó.

Se concluye que en las colmenas destinadas para la formación de núcleos de fecundación hay mayor presencia de *Varroa* y *Nosema* en invierno en comparación con el verano. Morfométricamente se determinó que el 100% de los ácaros evaluados pertenecieron a la especie *Varroa destructor*. En cuanto a nosemosis se determinó que *Nosema ceranae* es la especie dominante por lo que se sugiere que ha reemplazado a su congénere *Nosema apis*. El timol fue eficaz contra la presencia de *Varroa*, pero no, contra la de *Nosema*. Respecto a la selección fenotípica consideramos que el fenotipo E es el más adecuado para la selección.

2. INTRODUCCIÓN

La población de abejas domésticas o abejas de la miel descrita por Lineo en 1758 y otras especies del mismo género *Apis* han sufrido severas pérdidas en los últimos años registrando una mortalidad de alrededor de 30% cada año desde el 2007, por lo que se tienen evidencias precisas en los países desarrollados como Estados Unidos de América (USA) donde la población de abejas se ha reducido entre un 30% y 40% (Lebuhn *et al.*, 2013), y en la Unión Europea (UE) la mortalidad ha sido del 20% (Comisión Europea, 2013). Según el informe del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA, 2011), menciona que en los últimos años el problema se ha extendido a Australia, China, Japón y el Norte de África y en la rivera del Nilo, no siendo la excepción México, donde se han observado pérdidas de 0.2 millones de colmenas (SAGARPA, 2016). La muerte masiva de colonias enteras se debe a un fenómeno mundial multifactorial, por lo que se le ha atribuido a factores ambientales, químicos tales como los insecticidas (neonicotinoides clotianidina, tiametoxam e imidacloprid) (Genersch *et al.*, 2010, Cox-Foster *et al.*, 2007, de Miranda *et al.*, 2010), y diversas enfermedades causadas por agentes patógenos virales, bacterianos fúngicos y parasíticos que se han descrito hasta la actualidad en las abejas (Allen y Ball, 1996).

En la apicultura la varroasis y la nosemosis son las enfermedades consideradas de mayor importancia sanitaria y económica debido a que son vectores de enfermedades infecciosas asociadas con trastornos del colapso de colonias (Genersch *et al.*, 2010). La primera es causada por ectoparásitos que se alimentan principalmente del tejido corporal graso de la abeja (Ramsey, 2017), mermando su desarrollo, la longevidad de las castas de abejas y su capacidad productiva. La segunda es una enfermedad causada por un microsporidio que vive en las células epiteliales del intestino medio de las abejas, donde cumple su ciclo de vida (Forsgren y Fries, 2010), reduciendo la actividad productiva de las abejas durante las estaciones más frías del año (Gisder *et al.*, 2011); por lo anterior, actualmente existe la tendencia internacional de vigilar la buena salud de las abejas mediante un diagnóstico oportuno, métodos innovadores de control mediante productos naturales y la obtención de colmenas resistentes a los diferentes vectores dañinos (Invernizzi *et al.*, 2009).

Con la finalidad de erradicar la presencia de *Varroa* y *Nosema* actualmente se han utilizado diferentes tratamientos. Para el control de *Varroa* se han usado acaricidas químicos como: fluvalinato y flumetrina, los cuales contaminan los productos de las colmenas y causan la resistencia de los parásitos (Ball y Bailey, 1991, Wallner, 1999, Kanga *et al.*, 2003). En cuanto al control de la nosemosis, en la actualidad no hay productos aprobados para su control, sin embargo, los apicultores han utilizado el antibiótico fumagilina el cual está prohibido, debido al riesgo de contaminación de la miel (Martin, 2003), además que causa la mortalidad de las abejas (Fries *et al.*, 1996a, Williams *et al.*, 2008, Higes *et al.*, 2011), en este sentido, existe una constante urgencia para identificar algunos agentes naturales de baja toxicidad con funciones acaricidas y antifúngicas que no afecte la productividad de las colmenas, entre los que están el ácido fórmico, aceite esencial de timol, mentol y alcanfort (Llorente *et al.*, 1996, Espinosa-Montaña y Guzmán-Novoa, 2007b).

Otra estrategia para mejorar la salud y productividad de la colmena ha sido la selección y conservación de poblaciones de abejas locales, mediante evaluaciones morfológicas, biogeográficas, fenotípicas y moleculares; las cuales son importantes para determinar la expresión de características simples y complejas de la naturaleza de las abejas (Schuster y Cruz, 2004). En este sentido, se ha despertado el interés por descubrir las bases del comportamiento de las abejas, especialmente de las características productivas (Page Jr y Peng, 2001), las cuales son de importancia para el apicultor, debido a que el comportamiento higiénico es una característica relacionada con la resistencia a diversos patógenos, mientras que el comportamiento forrajero es una característica relacionadas con la producción de miel y el comportamiento de docilidad es de importancia para el manejo de las colmenas. Sin embargo, para que esto sea posible se requiere solucionar un número importante de problemas técnicos para aprovechar toda la información disponible de un modo eficiente, lo que permitiría la supervivencia de las poblaciones de abejas locales con características deseables asegurando así la biodiversidad (Andere *et al.*, 2011, Smith, 1991).

En este sentido el mejoramiento de las poblaciones de abejas radica en promover el desarrollo de verdaderos ecotipos en los distintos ambientes ecológicos creando una importante diversidad genética, lo que es fuente de riqueza invaluable para el trabajo de selección (Cobey *et al.*, 2012); por lo que vale la pena estudiar el comportamiento de las colmenas, sin olvidar, que se hace

referencia a combinaciones génicas y a conjuntos de poblaciones genéticamente diferenciadas, las cuales pueden cambiar drásticamente de una generación a otra simplemente por azar debido a la deriva génica (Primack, 2006); es decir, que hacer únicamente uso de la genética no es suficiente para mantener la biodiversidad por un tiempo indefinido, por lo que el eslabonamiento de diferentes disciplinas como la parasitología, genética, reproducción y criobiología juegan un papel importante para la conservación de especies en peligro.

Actualmente existen diversos métodos para reproducir las poblaciones de abejas *A. mellifera*, como la inseminación instrumental (Collins *et al.*, 2004, Cobey *et al.*, 2013), la cual es fundamental en los programas de mejoramiento genético, ya que permite la inseminación de reinas altamente productivas con zánganos de colmenas con características productivas deseadas. No obstante, para que la inseminación instrumental sea eficiente es necesario que el semen que se utiliza sea de calidad, ya que es un componente crítico para lograr resultados favorables (Cobey, 2007), sin embargo y a pesar de su importancia este tema es poco estudiado. Actualmente solo existen alrededor de 15 publicaciones en revistas científicas sobre el impacto inherente a las células espermáticas, donde investigadores como Nur *et al.* (2012), Hopkins y Herr (2010) y Taylor *et al.* (2009), han descrito variaciones en la estimación de la concentración, motilidad, viabilidad e integridad de la membrana espermática. Estas variaciones son atribuidas no solo a errores metodológicos, sino también a una posible variación entre zánganos, por su composición fenotípica y su origen genético (Koeniger *et al.*, 2005).

El intercambio de material genético entre diferentes poblaciones es necesario para el desarrollo de un eficiente programa de mejoramiento genético. Sin embargo, cumplir dicho objetivo es sumamente complicado debido al estrés provocado en las poblaciones, a los riesgos sanitarios y al elevado costo de traslado. En este sentido, las biotecnologías reproductivas han aportado soluciones alternativas para facilitar el manejo de poblaciones de especies en peligro como es el desarrollo de bancos de recursos genéticos mediante la criopreservación (Holt *et al.*, 1996, Wildt *et al.*, 1997, Wildt y Wemmer, 1999). La ventaja principal de dichos bancos es que permiten mantener la variabilidad genética de una especie en forma casi indefinida. Así pues, el semen de los zánganos que se almacena en estos bancos se puede utilizar durante muchos años, lo que reduce considerablemente la necesidad de encontrar zánganos maduros en tiempo de escasez, permitiendo el uso de inseminación instrumental en cualquier época del año. A pesar

de que estas herramientas están disponibles en mamíferos, con alto valor genético o en peligro de extinción, la criopreservación de semen de zánganos aun presenta muchas carencias metodológicas (Roldan *et al.*, 1992, Taylor *et al.*, 2009).

2.1. Hipótesis

La evaluación fenotípica de poblaciones de *Apis mellifera* permitirá seleccionar colmenas altamente productivas para incluirlas en programas de mejoramiento genético.

2.2. Objetivo general

Seleccionar mediante análisis fenotípico las poblaciones de *Apis mellifera* sobresalientes en colmenas destinadas para la formación de núcleos de fecundación.

2.3. Objetivos Particulares

1. Diagnosticar varriasis, nosemosis y acariosis en las colmenas destinadas para la formación de núcleos de fecundación.
2. Evaluar el efecto *in situ* del timol sobre la plasticidad morfométrica de *Varroa*.
3. Probar el impacto del tratamiento con timol sobre la presencia de varriosis y nosemosis.
4. Caracterizar las poblaciones de *Apis mellifera* mediante los parámetros morfométricos y fenotípicos de comportamiento (defensivo, higiénico, forrajero y condición de la colmena).

Capítulo 1. Seasonal variation in the prevalence of *Varroa*, *Nosema* and *Acarapis* in hives from which queen bee mating nuclei are produced.

Abstract

The presence of pathogens in fecundation hives represents a source of infection for queen bees. The objective of this investigation was to determine the prevalence of *Varroa*, *Nosema*, and *Acarapis* in hives for the production of mating nuclei (HPMN). 239 samples of adult bees of 17 apiaries of a queen bee breeding system were analyzed during the winter and summer of 2016 were analyzed. The prevalence of *Varroa* and *Nosema* were higher in winter (79.1% and 55.4%, respectively) than in summer (65.9% and 33.0%, respectively). However, *Acarapis* was not found. *Varroa* infestation was 2.55 ± 0.82 mites/100 bees, and *Nosema* $145 \pm 24 \times 10^3$ spores/bee (Standard deviation of the mean). The probability of finding *Nosema*, in the presence of *Varroa*, was 3.8 and 1.1 times higher in winter than in summer, respectively. We, therefore, conclude that HPMN have a higher incidence of *Varroosis* and nosemosis during winter and nosemosis increases in the presence of *Varroosis*. We, on the other hand, consider acariosis, absent in the region of study.

Keywords: infection, bee, diseases, apiculture, pathogen.

Introduction

The breeding of queen bees is a primordial activity for the apiculture in the entire world because the desired future characteristics of the hive depend on the queen bee, such as: docility, hygienic behavior, reproductive behavior and disease resistance (Rosero and David, 2006). The entire process of development and fecundation of the queen bee depends on the formation of fecundation hives that are created from donor hives from which frames with disease-free brood and adult bees are obtained constantly (Arroyo *et al.*, 2002). These HPMN must be disease-free because if not they can be a predisposing factor to the presence of diseases in queen bees which, in turn, may introduce diseases into the hives for honey production (HHP) where they are freed (Amiri *et al.*, 2017).

Diverse diseases caused by pathogen such as: virus, bacteria, fungi, and parasites, have been described in bees and some of them have a mayor sanitary and economic importance in

apiculture. *Varroa* is an ectoparasite, which feeds from the hemolymph from both larvae and adult bees, affecting their development, lifespan, and reproductive capacity. This disease is considered as one of the main threats to apiculture in the world being a vector of infectious diseases associated with the Colony Collapse Disorder (Genersch *et al.*, 2010).

Nosema is a microsporidian that lives in the epithelial cells of bees' mid intestine where its life cycle is completed. It disseminates through the fecal matter infecting the youngest bees, which are in charge of hive cell maintenance (Forsgren and Fries, 2010). Queen bees can become infected through sexual transmission (Yue *et al.*, 2006, Roberts *et al.*, 2015). This disease reduces the general activity during the coldest seasons of the year, when the levels of *Nosema* increase, due to the confinement of the bees (Gisder *et al.*, 2011).

Acarapis woodi is a tarsonemid mite, which inhabits the prothoracic trachea of the bees (Hood and McCreadie, 2001). This parasitism reduces the breathing capacity of bees thereby increasing the susceptibility to other diseases (Otis and Scott-dupree, 1992, Garrido-Bailón *et al.*, 2012, Maeda and Sakamoto, 2016). Its prevalence is greater during the colder months and its presence, combined with *Nosema* and *Varroa*, increases the death rate in the colonies. (Koch and Schmid-Hempel, 2011).

Due to the importance of the queen bees to the future of the hives, the diagnostic and surveillance of the diseases must be carefully carried out, above all in the breeding systems of queen bees to avoid dissemination of the diseases through the selling of broodstock (Genersch *et al.*, 2010, Brodschneider *et al.*, 2010, Tarpay *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2016, Amiri *et al.*, 2017). Therefore, the objective of this investigation was to quantify the presence of *Varroa*, *Nosema*, and *Acarapis* in the HPMN.

Materials and methods

The investigation took place in Tepic, Nayarit, México, located at 21° 51' y 21° 24' north latitude, 104° 34' y 105° 05' west longitude at 915 meters above sea level. In the zone, the warm sub-humid climate predominates with rains in the summer and the semi-warm sub-humid climate with rains in the winter. The average annual precipitation is of 1,121 mm and the average temperature is of 21.1 °C (Zepeda, 2005).

91 and 148 HPMN were sampled in the summer and winter of 2016, respectively. The 148 hives sampled in winter included the 91 hives sampled in summer. The hives presented the following characteristics: Seven spaces between frames filled with adult bees, queen with posture and two frames with honey and pollen. Each HPMN was provided periodically with pollen substitute and stimulation syrup 1:1. Samples were taken from to diagnose the presence and infestation level of *Varroa*, *Nosema*, and *Acarapis*. For each hive, approximately 300 bees were collected, between the third and fourth frames of the breeding chamber, and preserved in a 75% ethanol solution until needed for analysis. *Varroa* infestation level was calculated using the modified methodology of De Jong *et al.* (1982), which consisted of shaking the plastic jars with the bees at 60 oscillations/minute for 10 minutes. The content was then placed in a conical recipient with a 3 mm sieve mesh, and the sample completely covered with a 75% ethanol solution, stirred with a crystal wand to remove the mites at the bottom of the cone, finally, the solution was sifted through a white cloth, and the number of *Varroa* mites were counted.

The diagnosis of *Nosema* consisted of crushing 25 abdomens of adult bees in 25 ml of distilled water. They were filtered on 0.2 mm sieves. A drop was taken from the filtrate, placed on a slide and observed, under an optical microscope, at a magnification of 400 X. If the sample was positive, a counting took place with the Neubauer Chamber (Cantwell, 1970).

To determine the presence of *Acarapis*, 20 bees, stored in 75% ethanol solution, were used. Held by the abdomen, a transversal cut was made through the mesothorax, between the first and second pair of legs, to expose the thoracic ring. This was placed on a slide in cranio-caudal position and a drop of 10% lactic acid solution added. After 24 hrs, the tracheas were observed, through an optical microscope, at a magnification of 400 X (Bailey, 1985).

The prevalence was determined by multiplying the number of hives with the presence of the pathogen (*Varroa* or *Nosema*) by 100 and dividing by the total of hives evaluated per period. (Moreno-Altamirano *et al.*, 2000).

The level of *Varroa* infestation was determined by the formula: (number mites/ number of bees observed)* 100 (De Jong *et al.*, 1982); while for *Nosema*, it was determined by (number of spores /80)*4 million (Cantwell, 1970).

A Chi square-test was carried out to determine prevalence differences between both diseases, and Student t-test for different level of infestation on winter and summer was conducted. A Pearson correlation test was performed on levels of *Varroa* infestation and *Nosema* infection in each season on the same HPNM as paired samples. Finally, the Odds Ratio (OR) was used to determine if the presence of *Nosema* is affected by the presence of *Varroa*. The analysis was made using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software version 20.0 (IBM, 2011).

Results

During the winter 148 HPNM were sampled, 50 (33.78%) presented *Varroa* only, 15 (10.13%) presented *Nosema* only and the co-infected were 67 (45.27%). In the same sense, in summer 91 HPNM were sampled, 36 (39.56%) had a single *Varroa* infestation, 6 (5.59%) presented single *Nosema* infection and co-infected were 24 (26.37%). In winter, the prevalence of *Varroa* and *Nosema* were higher than in summer ($p=0.025$ and $p=0.001$ respectively) according to Chi square-test (Table 1). In the same sense, in winter the infestation level of *Varroa* and the infestation level of *Nosema* were significantly higher than summer ($p=0.003$ and $p=0.008$ respectively), according to Student's t-test (Table 1). There was a positive correlation ($p=0.034$) between the presence of *Varroa* and *Nosema* in winter, but there was not correlation between *Varroa* and *Nosema* in summer ($p=0.912$). The Odds Ratio showed a 3.8 higher probability of finding *Nosema* in presence of *Varroa* in the winter in comparison to the 1.1 probability in the summer.

Table 1. Seasonal variation in the prevalence of *Varroa* and *Nosema* in the HPNM

Period	TH	<i>Varroa</i>		<i>Nosema</i>	
		Prevalence	VRHI	Prevalence	NRHI
Winter	148	79.1% a	2.55 ± 0.82 a	55.4% a	$145 \times 10^3 \pm 24 \times 10^3$ a
Summer	91	65.9% b	1.31 ± 0.49 b	33.00% b	$67 \times 10^3 \pm 14 \times 10^3$ b

TH= Total of Hives; VRHI= *Varroa* Range of the Hive Infestation (mite/100 bees); NRHI= *Nosema* Range of the Hive Infestation (spores/bee), a, b different literals indicate significant statistical difference ($p \leq 0.05$).

Discussion

Studies that describe the presence and quantify diseases in HPMN have not been published yet. In the production system of queen bees in Mexico, this type of hive is subjected to the continuous extraction of breeding frames and adult bees to create the mating nuclei. This intensive management translated as a constant loss between the population of worker bees, breeding, and food reserves; which, along with the constant change of frames between one hive to another, the pillage, the stress generated by constant manipulation, and the low floral availability, cause the predisposition to diseases (Amiri *et al.*, 2017).

In this investigation the prevalence of *Varroa* in the apiaries used for HPMN was higher during the winter (79.1%) in contrast with the summer (65.9%) having similar prevalence in hives destined to the production of honey with similar weather conditions where the prevalence was 63.6% and an infestation rate was 2.89 ± 0.79 mites/100 bees in a sub-humid tropical climate (Martínez Puc *et al.*, 2011); in warm sub-humid, semi-dry, semi-warm and warm climates, the prevalence was from 63.0% up to 100.0% with infestations of 5.02 ± 0.03 a 3.51 ± 0.03 mite/100 bees (Medina Flores *et al.*, 2014b). On the other hand, Martínez-Césareo *et al.*, (2016) reported a prevalence of 100% in HHP with 0.5 to 22.1 mite/100 bees infestation rate in a warm sub-humid climate; Soroker *et al.* (2011) and Rahimi *et al.* (2014) report lower prevalence in HHP, which goes from 5% to 32% in regions with: warm, desert, and mild climates, therefore *Varroa* in the HPMN is presented in similar conditions to those reported in the HHP.

In contrast with our results where the prevalence was higher in the winter, it is reported that in a sub-humid and humid climate the presence of *Varroa* is higher in the summer (Hinojosa and Gonzalez, 2004), and in another investigation it was observed that the prevalence of *Varroa* was higher in the fall (Garrido *et al.*, 2003). Nevertheless, in warm climates, the levels of *Varroasis* dropped at the beginning of the summer, Guzmán-Novoa *et al.* (2010) and Medina-Flores *et al.* (2014a) mention that the infestation of *Varroa* is higher in warm seasons. In this case, the prevalence of *Varroa* can be directly connected to the meteorological variability and the abundance of food, which varies considerably because of the seasonal conditions of each of the geographic zones, and can determine the growth of the population of *Varroa*.

The presence of *Nosema* has increased as well as the severity of the infection in hives in great part of the world (Tapia-González *et al.*, 2017), meaning that the presence of this parasite in HHP has been found in diverse regions and populations of bees, confirming its presence in a great diversity of climates and countries such as: France, Italy, Germany, Denmark, Finland, Sweden, Serbia, Greece, Vietnam, New Zealand, United States, Argentina, Brazil, Spain, México, Canada and Israel (Chen *et al.*, 2009, Martínez-Cesáreo *et al.*, 2016, Guzman-Novoa *et al.*, 2011, Soroker *et al.*, 2011, Little *et al.*, 2015, Bermejo and Fernández, 1997); it can even be noted that the presence of *Nosema* is not particular of domestic bees, been found in wild swarms (Martínez Puc *et al.*, 2011). In the same sense, the cases tend to increase in zones with greater rain fall (Medina-Flores *et al.*, 2014a). In this investigation the prevalence of *Nosema* in HPMN was higher in the winter (55.4%) vs., the summer (33.0%). Nevertheless the infestation rate was below virulent levels according to the Cantwell scale (1970). The presence of *Nosema* increases bee's death rate and the hives loss being that it deeply impacts the physiology, behavior, aptitudes, and longevity of the bees (Holt *et al.*, 2013).

The prevalence of nosemosis in HPMN was similar to the results found in HHP, where prevalence of 55.1% were found in warm sub-humid climates (Bermejo and Fernández, 1997), 67.5% in warm sub-humid and warm dry (Calderón and Sánchez, 2011), 81.8% in the sub-humid tropic (Martínez Puc *et al.*, 2011), 78.2% in the sub-humid and humid climates (Hinojosa and Gonzalez, 2004), 72.5% in temperate zones (Tiranti *et al.*, 2017), 64.0%, 91.5%, 70.0% 30.0%, 35.0% and 30.0% in warm subtropical and semiarid regions (Pacini *et al.*, 2016), and inferior to the 2.3% in semi-warm, semi-dry, and warm sub-humid zones (Medina-Flores *et al.*, 2014a). In contrast, different prevalence have been found in different seasons of the year, there being reports of a higher prevalence during spring vs., summer (Hinojosa and Gonzalez, 2004, Pacini *et al.*, 2016) and in summer vs., Fall (Guerrero-Molina *et al.*, 2016). This prevalence variability is due to the fact that *Nosema* spores are resistant to the environment and can remain viable for up to one year (Forsgren and Fries, 2010), in this sense the prevalence of *Nosema* in hives varies depending on climate, type of confinement, and natural resources present in the investigation area.

The highest presence of nosemosis can be as result of artificial feeding effect, and the increase in rainfall; the first, increased the ingestion of food and by consequence the defecation within

the hive, and the second, limits the exit of bees, which increments the horizontal transmission (Tiranti *et al.*, 2017). This explains the pattern in the winter HPMN, since the conditions that promotes the presence of microsporidia such as: rainfall, high humidity levels, low temperatures, the lack of flowering, and fecal contamination, are constant in this season.

In this investigation, presence of the tracheal mite *Acarapis* was not found in the HPMN, for which the results match to those found in HHP in other tropical zones (Martínez Puc *et al.*, 2011, Martínez-Cesáreo *et al.*, 2016) and are superior in HHP in other regions with mild humid climates (1.8%) (Calderón and Sánchez, 2011). In warm and tempered climates in the middle east with 13.0%, 5.5% and 4.4%, 1.0%, (Rahimi *et al.*, 2013, Shakib and Mehdi, 2016, Khezri and Moharami, 2017). It is possible that in regions with tropical climate, *Acarapis* will not be able to develop efficiently, possibly because of the minimal variation in temperature between different seasons. Another possibility is bee's genetic resistance to mite (Danka R.G. and Villa J.D. 2000) which is related to the hygienic behavior and preening (Pettis and Pankiw, 1998, Danka and Villa, 2003) or to the inadaptability of the tracheal mite to this region. The last report of elevated infestation was registered during the period 1985 to 1986 in the Northeast of Mexico where infestations were found with 46.0% and 17.6% in dry, semidry and warm sub-humid climates (Eischen, 1987), which could explain the partially low or null presence.

The co-infection of different pathogens in the HPMN has not been reported. But it is well known that in the HHP the co-infections of *Varroa*, *Nosema*, and *Acarapis* are a common event. In this interaction, *Varroa* diminishes the quantity of hemolymph, reduces the permeability of the mid intestinal wall, causes a drop in hemocytes number, and blocks the proteins metabolism (Gilliam and Shimanuki, 1967, Peroutka and Čihar, 1978, Domatskaya, 1980, Bermejo and Fernández, 1997, Antúnez *et al.*, 2009, Fries *et al.*, 2015). In this population study, in HPMN acariosis was not found. But a positive correlation between *Varroa* and *Nosema* was found, which quite possibly increases the susceptibility of the host to other pathogens infection, such as: viruses, bacteria, and fungi. Furthermore, the association between both pathogens is considered the main cause of high death rate in HHP (Cox-Foster *et al.*, 2007, Currie *et al.*, 2010). Predisposing factors study as well as their impact and repercussion in the presence of diseases in the HPMN must be clarified.

Conclusión

The HPMN have a higher incidence of *Varroasis* and nosemosis during winter and nosemosis increases in the presence of *Varroasis*, on the other hand, consider acariosis absent in the region of study.

References

- Amiri, E., Strand, M. K., Rueppell, O. and Tarpy, D. R. 2017. Queen quality and the impact of honey bee diseases on queen health: potential for interactions between two major threats to colony health. *Insects*, 8, 48.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. and Higes, M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11, 2284-2290.
- Arroyo, U., Nieto, J. G. and J, L Cajero Avelar, S. 2002. Cría de abejas reina. SAGARPA, México, DF (México) Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana, México, DF (México) IICA, México, DF (México). 181-184. 294.
- Bailey, L. 1985. *Acarapis woodi*: a modern appraisal. *Bee World*, 66, 99-104.
- Bermejo, F. O. and Fernández, P. G. 1997. *Nosema* disease in the honey bee (*Apis mellifera* L) infested with *Varroa* mites in southern Spain. *Apido.ogie*, 28, 105-112.
- Brodtschneider, R., Moosbeckhofer, R. and Crailsheim, K. 2010. Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *Journal of Apicultural Research*, 49, 23-30.
- Calderón, R. A. and Sánchez, L. A. 2011. Diagnóstico de enfermedades en colmenas de abejas africanizadas en Costa Rica: prevalencia y distribución de setiembre a noviembre del 2007. *Agronomía Costarricense*, 35, 49-60.
- Cantwell, G.E. 1970 Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal*, 110, 222-223.

- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M. and Pettis, J. S. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101, 204-9.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M. and Geiser, D. M. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318, 283-287.
- Currie, R. W., Pernal, S. F. and Guzmán-Novoa, E. 2010. Honey bee colony losses in Canada. *Journal of Apicultural Research*, 49, 104-106.
- Danka R.G. and Villa J.D. 2000. A survey of tracheal mite resistance levels in US commercial queen breeder colonies, *American Bee Journal*. 140, 405-407.
- Danka, R. G. and Villa, J. D. 2003. Autogrooming by resistant honey bees challenged with individual tracheal mites. *Apidologie*, 34, 591-596.
- De Jong, D., De Jong, P. and Goncalves, L. 1982. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21, 165-167.
- De Miranda, J. R., Cordoni, G. and Budge, G. 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 Suppl 1, 30-47.
- Domatskaya, T. 1980. Properties of the haemolymph of bees infested with *Varroa jacobsoni*. *Veterinariya, Moscow, USSR*.11, 43-47
- Eischen, F. A. 1987. Overwintering performance of honey bee colonies heavily infested with *Acarapis woodi* (Rennie). *Apidologie*, 18, 293-304.
- Forsgren, E. and Fries, I. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, 170, 212-7.
- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D. P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R. J., Tanner, G., Webster,

- T. C. and Williams, G. R. 2015. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1-28.
- Garrido-Bailón, E., Bartolomé, C., Prieto, L., Botías, C., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Martín-Hernández, R. and Higes, M. 2012. The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental Parasitology*, 132, 530-536.
- Garrido, C., Rosenkranz, P., Paxton, R. J. and Gonçalves, L. S. 2003. Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie*, 34, 535-541.
- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W. and GisDER, S. 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41, 332-352.
- Gilliam, M. and Shimanuki, H. 1967. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9, 387-389.
- Gisder, S., Mockel, N., Linde, A. and Genersch, E. 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology*, 13, 404-13.
- Guerrero-Molina, C., Correa-Benítez, A., Hamiduzzaman, M. M. and Guzman-Novoa, E. 2016. *Nosema ceranae* is an old resident of honey bee (*Apis mellifera*) colonies in México, causing infection levels of one million spores per bee or higher during summer and fall. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141, 38-40.
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P. G. and Correa-Benítez, A. 2010. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, 41, 443-450.
- Guzmán-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Arechavaleta-Velasco, M. E., Koleoglu, G., Valizadeh, P. and Correa-Benítez, A. 2011. *Nosema ceranae* has parasitized Africanized honey bees in México since at least 2004. *Journal of Apicultural Research*, 50, 167-169.

- Hinojosa, A. and Gonzalez, D. 2004. Prevalencia de parásitos en *Apis mellifera L* en colmenares del secano costero e interior de la VI Región, Chile. *Parásitología Latinoamericana*, 59, 137-141.
- Holt, H. L., Aronstein, K. A. and Grozinger, C. M. 2013. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 14, 799.
- Hood, W. M. and McCreddie, J. W. 2001. Field tests of the *Varroa* Treatment Device using formic acid to control *Varroa destructor* and *Acarapis woodi*. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 18, 87-96.
- SPSS, I. B. M. (2011). IBM SPSS statistics for Windows, version 20.0. New York: IBM Corp, 440.
- Khezri, M. and Moharami, M. 2017. The Incidence of *Acarapis woodi* and *Varroa destructor* in Kurdistan Apiaries, Iran. *Animal and Veterinary Sciences*, 5, 97.
- Koch, H. and Schmid-Hempel, P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 19288-19292.
- Little, C. M., Shutler, D. and Williams, G. R. 2015. Associations among *Nosema* spp. fungi, *Varroa destructor* mites, and chemical treatments in honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 54, 378-385.
- Liu, Z., Chen, C., Niu, Q., Qi, W., Yuan, C., Su, S., Liu, S., Zhang, Y., Zhang, X. and Ji, T. 2016. Survey results of honey bee (*Apis mellifera*) colony losses in China 2010–2013. *Journal of Apicultural Research*, 55, 29-37.
- Maeda, T. and Sakamoto, Y. 2016. Tracheal mites, *Acarapis woodi*, greatly increase overwinter mortality in colonies of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*. *Apidologie*, 47, 762-770.
- Martínez-Cesáreo, M., Rosas-Córdoba, J., Prieto-Merlos, D., Carmona-Gasca, A., Peña-Parra, B. and Ávila-Ramos, F. 2016. Presencia de *Varroa destructor*, *Nosema apis* y *Acarapis woodi* en abejas (*Apis mellifera*) de la región oriente del Estado de México. *Abanico Veterinario*, 6, 30-38.

- Martínez Puc, J. F., Medina Medina, L. A. and Catzín Ventura, G. A. 2011. Frecuencia de *Varroa destructor*, *Nosema apis* y *Acarapis woodi* en colonias manejadas y enjambres silvestres de abejas (*Apis mellifera*) en Mérida, Yucatán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2, 25-38.
- Medina-Flores, C., Guzmán-Novoa, E., HamiduzzamaN, M., Aréchiga-Flores, C. and López-Carlos, M. 2014a. Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in México. *Genetics and Molecular Research*, 13, 7282-7293.
- Medina-Flores, C. A., Guzmán-Novoa, E., Espinosa-Montaño, L. G., Uribe-Rubio, J. L., Gutiérrez-Luna, R. and Gutiérrez-Piña, F. J. 2014b. Frequency of *Varroa* and *Nosema* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies in the state of Zacatecas, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XX, 159-167.
- Moreno-Altamirano, A., López-Moreno, S. and Corcho-Berdugo, A. 2000. Principales medidas en epidemiología. *Salud Pública de México*, 42, 337-348.
- Otis, G. W. and Scott-Dupree, C. D. 1992. Effects of *Acarapis woodi* on overwintered colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in New York. *Journal of Economic Entomology*, 85, 40-46.
- Pacini, A., Mira, A., Molineri, A., Giacobino, A., Cagnolo, N. B., AignassE, A., Zago, L., IzaguirrE, M., Merke, J. and Orellano, E. 2016. Distribution and prevalence of *Nosema apis* and *N. ceranae* in temperate and subtropical eco-regions of Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141, 34-37.
- Peroutka, M. and Čihar, R. 1978. The effect of pteridines on the developmental cycle of the protozoan: *Nosema apis* Z. *Apidologie*, 9, 291-304.
- Pettis, J. S. and Pankiw, T. 1998. Grooming behavior by *Apis mellifera* L. in the presence of *Acarapis woodi* (Rennie) (Acari: Tarsonemidae). *Apidologie*, 29, 241-253.
- Rahimi, A., Mahdavi, V. and Asadi, M. 2013. Study of the *Acarapis woodi* and apiaries infected with mites in Mazandaran and Kordistan. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3, 792-795.

- Rahimi, A., Mirmoayedi, A., and Khanjani, M. 2014. Dispersion type of *Varroa* mite (Acari, Varroidae) among the bee hives in Kurdistan province, Iran. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3, 255-259.
- Roberts, K. E., Evison, S. E. F., Baer, B., and Hughes, W. O. H. 2015. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports*, 5, 10982.
- Rosero, T. and David, S. 2006. Selección de colmenas según características de alta producción de miel en los departamentos de Copán, El Paraíso, La Paz y Ocotepeque. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012.
- Shakib, V. and Mehdi, E. S. 2016. Unprecedented first record of infestation level *Acarapis woodi* (Rennie) and overwintering ability in Savojbolagh regions of Alborz province in Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4, 1-13.
- Soroker, V., Hetzroni, A., Yakobson, B., DAvid, D., David, A., Voet, H., Slabezki, Y., Efrat, H., Levski, S., Kamer, Y., Klinberg, E., Zioni, N., Inbar, S. and Chejanovsky, N. 2011. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*, 42, 192-199.
- Tapia-González, J. M., Alcazar-Oceguera, G., Macías-Macías, J. O., Contreras-Escareño, F., Tapia-Rivera, J. C., Chavoya-Moreno, F. J. and Martínez-González, J. C. 2017. Nosemosis en abejas melíferas y su relación con factores ambientales en Jalisco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8, 325.
- Tarpy, D. R., Lengerich, E. J. and Pettis, J. S. 2013. Idiopathic brood disease syndrome and queen events as precursors of colony mortality in migratory beekeeping operations in the eastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 108, 225-233.
- Tiranti, K., Melegatti, P., Ingrassia, M., Julian, A., Degioanni, A., Aime, F., and Larriestra, A. 2018. Prevalencia de enfermedades en abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en Apiarios del Sur de la Provincia de Córdoba. *Veterinaria*. 35, 362.

Yue, C., Schröder, M., Bienefeld, K. and Genersch, E. 2006. Detection of viral sequences in semen of honey bees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 105-108.

Zepeda, R. V. 2005. Las regiones climáticas de México 1.2.2. México: Instituto de Geografía UNAM.2, 65.

Capítulo 2. Identificación morfométrica de *Varroa destructor* y su plasticidad por la exposición a timol

Resumen

Actualmente existen cuatro especies de *Varroa* identificadas en todo el mundo, las cuales presentan una alta variabilidad interespecífica e intraespecífica. El objetivo de esta investigación fue identificar la especie predominante de *Varroa* y el efecto del timol sobre la plasticidad del ácaro. Para determinar la especie y el efecto del timol sobre la plasticidad del ácaro se analizaron morfométricamente 150 especímenes de 65 colmenas y 54 de 17 colmenas expuestas a timol por 28 días. De acuerdo a las medidas morfométricas, los ácaros fueron identificados como *Varroa destructor*, no habiendo evidencia morfométrica de la infestación por otras especies del género *Varroa*. Las poblaciones de ácaros difieren entre apiarios ($P \leq 0.05$), por lo que las variables ancho del escudo genital ($P=0.013$), largo del escudo genital ($P=0.002$) y ancho del escudo anal ($P=0.026$) fueron más variantes. Se encontraron 8 morfotipos, observándose diferencias entre las medias de largo del escudo genital por efecto del timol ($P \leq 0.05$). Se concluye que *Varroa destructor* expuesta al timol presenta una variabilidad morfométrica intraespecífica por la adaptación a la presión de selección impuesta por el acaricida.

Palabras claves: morfometría, patógeno, acaricida.

Introducción

La *Varroasis* es la principal enfermedad parasitaria que afecta a la abeja (*Apis mellifera*) a nivel mundial, esta enfermedad es causada por lo menos por cuatro especies identificadas: *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Varroa underwoodi*, *Varroa rindereri* y *Varroa destructor* (Oudemans, 1904, Delfinado-Baker y Aggarwal, 1987, De Guzman y Delfinado-Baker, 1996, Anderson y Trueman, 2000), estas cuatro especies de *Varroa* afectan directamente a las crías de *A. mellifera* en las etapas más sensibles de su desarrollo ontogenético, alimentándose principalmente de la hemolinfa de su huésped causando la pérdida de peso, disminución del rendimiento de vuelo, aumento de búsqueda prematura de alimento, disminución de la capacidad de aprendizaje, disminución de la tasa de retorno y reducción de la vida promedio de las abejas, además que presentan una función patogénica de muchas enfermedades virales asociadas con trastornos del

colapso de colonias, por estas causas negativas se consideradas como la enfermedad más destructiva de las abejas melíferas (De Jong *et al.*, 1982, Duay *et al.*, 2003, Kralj y Fuchs, 2006, Cox-Foster *et al.*, 2007, de Miranda *et al.*, 2010).

Elucidar el potencial de la variabilidad genética y fenotípica relacionada con el proceso de distribución mundial dio lugar a una serie de estudios sobre la diferenciación morfológica intraespecífica del parásito (Delfinado-Baker y Houck, 1989, De Guzman y Delfinado-Baker, 1996). La plasticidad del ácaro *Varroa* está influenciada por la variabilidad geográfica, las condiciones climáticas naturales y también con las distintas especies hospederas (Boudagga *et al.*, 2003, Maggi *et al.*, 2009, Akinwande *et al.*, 2012, Badejo *et al.*, 2013, Aude *et al.*, 2016, Dadgostar y Nozari, 2018), en este sentido, se ha demostrado que existe una gran plasticidad fenotípica dentro de la misma población de ácaros en diferentes especies de abejas en todo el mundo (Akimov *et al.*, 2004), esta plasticidad se define clásicamente como el ajuste fenotípico de un organismo al entorno, es decir, a la adaptación mediante cambios morfológicos, fisiológicos y de comportamiento de los individuos permitiendo el mantenimiento de la aptitud individual y por lo tanto, conduce a la persistencia de la población y la especie (Pigliucci, 2005, Nussey *et al.*, 2007).

A pesar que se conocen los diferentes genotipos de *Varroa* poco se sabe sobre las características epigenéticas y las diferencias fenotípicas de las poblaciones de *Varroa* que afectan a las abejas melíferas en esta región, en este sentido, es necesario el uso de técnicas de discriminación morfométricas (Delfinado-Baker y Houck, 1989), las cuales se basan en el análisis de mediciones de algún segmento del cuerpo y que utiliza principalmente los conceptos de tamaño y forma (López *et al.*, 2002). En este sentido, mediante análisis morfométrico se identificó la especie de *Varroa* predominante y si su plasticidad varía después del tratamiento con timol.

Materiales y métodos

Ubicación del área experimental. La investigación se realizó en el municipio de Tepic, Nayarit, México ubicado a 21° 51' y 21° 24' latitud norte, 104° 34' y 105° 05' longitud oeste a 915 m.s.n.m. En la zona predomina el clima cálido subhúmedo con lluvias en verano y el semicálido subhúmedo con lluvias en invierno, la precipitación promedio anual es de 1,121 mm y la temperatura promedio es de 21.1 °C (Fernández-Eguiarte *et al.*, 2010).

Obtención de muestras. Se recolectaron aproximadamente 300 abejas que se localizaban entre el tercer y cuarto bastidor de la cámara de cría, dichas abejas se colocaron en recipientes con alcohol al 70%. Las muestras se colectaron en el día cero (previo a la primera aplicación del timol) y al final del tratamiento al día 28. La obtención de los especímenes de *Varroa* se realizó utilizando la metodología de De Jong *et al.* (1982), en el Laboratorio de Biología funcional de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit.

Unidades experimentales. Para determinar las especies de *Varroa* y la variabilidad morfométrica se analizaron 150 especímenes de *Varroa* de 65 colmenas y para determinar el efecto de timol sobre la plasticidad de *Varroa* se tomaron 54 especímenes de 17 colmenas con presencia del ácaro antes y después de la aplicación del timol. Las colmenas presentaron las siguientes características: siete espacios entre bastidores llenos de abejas adultas, reina con postura y un bastidor de miel con polen, dichas colmenas fueron provenientes de 5 apiarios destinados para la formación de núcleos de fecundación de abejas reinas.

Procesamiento de ácaros. Los ácaros de *Varroa* se procesaron para su observación siguiendo las técnicas descritas por Krantz (1978) y Maggi *et al.* (2009). Cada ácaro se colocó en ácido láctico al 50% durante 2 horas a 100 °C, posteriormente los ácaros se almacenaron en alcohol al 50% v/v hasta su observación. Los caracteres morfométricos se midieron usando un microscopio estereoscópico con un micrómetro ocular a 20X.

Morfometría. Se midieron seis variables (Figura 1) en cada uno de los especímenes: ancho del escudo dorsal (AED), longitud del escudo dorsal (LED), ancho del escudo genital (AEG), longitud del escudo genital (LEG), ancho del escudo anal (AEA) y longitud del escudo anal (LEA).

Preparación del timol. Se utilizó timol cristal previamente pulverizado con una pureza del 99.0%. El tratamiento consistió en la mezcla 8 gr de timol y 32 gr de azúcar glas para obtener una concentración del 20%.

Aplicación del tratamiento. Para la aplicación se prepararon paquetes con 40 gr de la mezcla las cuales fueron esparcidos en cuadros de papel de 20 x 20 cm sobre la cámara de cría. El tratamiento se aplicó en 3 ocasiones con intervalos de 7 días.

Análisis estadístico. Para determinar las diferencias morfométricas de *Varroa* entre los apiarios se realizó una comparación de medias con una prueba de ANOVA de un factor, las variables que tuvieron diferencias significativas se sometieron a un segundo análisis de comparación múltiple post hoc mediante una comparación de medias de Tukey. Se realizó un análisis de correlación entre las variables en estudio. Para relacionar la plasticidad con el tratamiento a base de timol se realizó una correlación de Pearson. Para determinar los morfotipos se realizó un análisis de conglomerados K medias. Para ello, se utilizó el Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20. 0 (IBM, 2011).

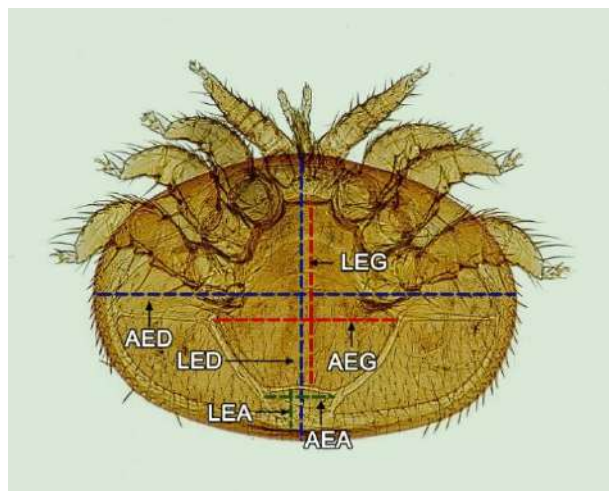


Figura 1. Variables medidas: (AED) ancho del escudo dorsal, (LED) longitud del escudo dorsal, (AEG) ancho del escudo genital, (LEG) longitud del escudo genital, (AEA) ancho del escudo anal, (LEA) longitud del escudo anal.

Resultados

De acuerdo a (Anderson y Trueman, 2000) se determinó que la especie predominante en esta región es *Varroa destructor* con promedios del AED ($1688.40 \pm 33.46 \mu\text{m}$) y LED ($1128.10 \pm 25.76 \mu\text{m}$). Las poblaciones de ácaros difirieron ($P \leq 0.05$) entre apiarios (Tabla 2), por lo que se encontró que las variables AEG ($P=0.013$), LEG ($P=0.002$) y AEG ($P=0.026$) fueron más discriminantes en comparación AED ($P=0.086$), LED ($P=0.16$) y el LEA ($P=0.34$). La variable LEG fue la que presento una correlación ($P \leq 0.05$) con todas las variables estudiadas, sin embargo, su correlación fue mayor en relación a las variables AED y AEG (Tabla 3).

Tabla 2. Media de las variables estudiadas (μm) pertenecientes a las poblaciones de *Varroa destructor* de 5 apiarios evaluados.

Apiario	AED	LED	AEG	LEG	AEA	LEA
1	1696 a	1140 a	721 a	593 a	276 ab	129 a
2	1684 a	1118 a	718 ab	575 ab	286 a	132 a
3	1666 a	1119 a	679 b	557 b	271 b	125 a
4	1691 a	1138 a	715 ab	594 ac	283 ab	134 a
5	1705 a	1125 a	725 ac	595 ac	286 ac	131 a

(AED) ancho del escudo dorsal, (LED) longitud del escudo dorsal, (AEG) ancho del escudo genital, (LEG) longitud del escudo genital, (AEA) ancho del escudo anal y (LEA) longitud del escudo anal.

Tabla 3. Identificación de variables discriminantes.

Variable	F	Sig.
AED	2.181	.086
LED	1.706	.165
AEG	3.569	.013
LEG	4.946	.002
AEA	3.039	.026
LEA	1.143	.348

(AED) ancho del escudo dorsal, (LED) longitud del escudo dorsal, (AEG) ancho del escudo genital, (LEG) longitud del escudo genital, (AEA) ancho del escudo anal y (LEA) longitud del escudo anal.

Se identificaron ocho morfotipos. El morfotipo A se estableció en ácaros recolectados en el apiario 1; el morfotipo B se encontró en ácaros pertenecientes a los apiarios 1, 2; 4 y 5, el morfotipo C, F y H se encontró en ácaros de los 5 apiarios; el morfotipo D se estableció en ácaros del apiario 3, el morfotipo E se encontró en ácaros de los apiario 1, 2, 4 y 5; el morfotipo G se encontró en ácaros de los apiarios 2 y 3. La media de cada variable estudiada perteneciente a los ocho morfotipos de *V. destructor* y los resultados de ANOVA se muestra en la (Tabla 4 y 5). Mediante un análisis de igualdad (Tabla 6) se encontró una correlación ($P \leq 0.05$) entre el tratamiento y las variables AED ($P=0.065$) y LEG ($P=0.002$).

Tabla 4. Media de las variables estudiadas (μm) pertenecientes a los 8 morfotipos de *Varroa destructor*.

MORFOTIPOS	AED	LED	AEG	LES	AEA	LEA
A	1583	1042	533	483	267	108
B	1707	1147	738	589	290	139
C	1699	1146	683	569	281	137
D	1692	1092	642	583	258	125
E	1708	1134	718	613	276	131
F	1653	1115	707	589	281	124
G	1629	1142	717	533	263	117
H	1700	1109	725	565	282	127

(AED) ancho del escudo dorsal, (LED) longitud del escudo dorsal, (AEG) ancho del escudo genital, (LEG) longitud del escudo genital, (AEA) ancho del escudo anal y (LEA) longitud del escudo anal.

Tabla 5. ANOVA de conglomerados jerárquicos k medias

Variable	Media	F	Sig.
AED	5673.763	15.000	.000
LED	2958.600	10.197	.000
AEG	7459.992	32.075	.000
LEG	4172.858	19.927	.000
AEA	372.733	2.415	.035
LEA	369.098	4.720	.001

(AED) ancho del escudo dorsal, (LED) longitud del escudo dorsal, (AEG) ancho del escudo genital, (LEG) longitud del escudo genital, (AEA) ancho del escudo anal y (LEA) longitud del escudo anal.

Tabla 6. Pruebas de igualdad de las medias antes y después del tratamiento

Variables	Lambda de Wilks	F	Sig.
AED	.904	3.631	.065
LED	.988	.412	.525
AEG	.944	2.010	.165
LEG	.745	11.615	.002
AEA	.941	2.115	.155
LEA	1.000	.000	1.000

(AED) ancho del escudo dorsal, (LED) longitud del escudo dorsal, (AEG) ancho del escudo genital, (LEG) longitud del escudo genital, (AEA) ancho del escudo anal y (LEA) longitud del escudo anal.

Discusión

Los resultados encontrados en esta investigación corresponden a la especie de *Varroa destructor* puesto que las variables AED y LED son similares pero inferiores a los encontrados en diferentes partes del mundo (Anderson y Trueman, 2000, Zhang, 2000, Boudagga *et al.*, 2003, Maggi *et al.*, 2009, Kelomey *et al.*, 2016), sin embargo, nuestros resultados coinciden con el promedio general descrito para este ácaro (Anderson *et al.*, 2000), estas diferencias morfométricas se deben a la interacción entre el parásito y su huésped, se ha observado que cuando el hospedador tiene variación corporal, el parásito también cambia esta condición

(Giménez Martínez *et al.*, 2017), es decir, que las variaciones morfométricas del ácaro depende del linaje de *Apis mellifera* que *Varroa destructor* parasita, en este sentido, George y Nascimento *et al.* (2004) han demostrado que la biomasa del parásito está controlada por la tasa metabólica del hospedador, de igual manera el tamaño de las celdas de los panales afecta el tamaño corporal del hospedador y en consecuencia el tamaño de los ácaros (Borsuk *et al.*, 2012).

Los estudios de plasticidad de *Varroa* han encontrado variaciones morfométricas en grandes regiones y países como Irán, Argentina, y Ucrania encontrando has 17 morfotipos por estudio (Anderson y Trueman, 2000, Maggi *et al.*, 2009, Dadgostar y Nozari, 2018), sin embargo, en un grupo de colmenas de productores locales se encontraron 8 morfotipos, lo que significa una gran variabilidad morfométrica en una población de abejas estrechamente relacionadas, por lo que consideramos que esta variación depende de los regímenes de selección dentro de los hábitats, la migración, las diferentes épocas de reproducción de las abejas y a las posibles mutaciones que el ácaro pudiera presentar en el tiempo (Carroll *et al.*, 2007).

La plasticidad fenotípica se observó claramente después de 28 días de haber aplicado un acaricida natural, por lo que pudimos observar una reducción significativa en el AED y LEG, de manera que coincidimos con Maggi *et al.* (2009) quien ha informado de la plasticidad morfométrica de *Varroa destructor* en diferentes regiones de Sudamérica. Esta plasticidad morfométrica se ha documentado en otras especies donde han encontrado una asociación entre el tamaño corporal y la susceptibilidad a los medicamentos (Bridges y Semlitsch, 2001, Oliveira *et al.*, 2007, Yarahmadi *et al.*, 2009), en este sentido, las capacidades de los parásitos para ajustar su fenotipo a un plaguicida es considerada como una estrategia de adaptación a la intensa presión de selección impuesta por el miticida causando respuestas plásticas en la alometría corporal u ontogenética (Wu *et al.*, 2003).

Conclusión

El 100% de los ácaros evaluados pertenecen a la especie *V. destructor*. Se encontraron 8 morfotipos claramente diferenciados, lo que nos permitió comprender la variabilidad morfométrica intraespecífica de *V. destructor* en poblaciones de *A. mellifera* geográficamente relacionadas. Se observó una plasticidad positiva correlacionada entre el acaricida y la disminución de LEG, entonces, la plasticidad pos tratamiento es resultado de la adaptación

debido a la presión de selección impuesta por el acaricida, teniendo indicios de que el acaro *se* adapta mediante su variabilidad morfológica a las condiciones adversas para su sobrevivencia y a las colonias de abejas que parasitan.

Referencias

Akimov I, Benedyk S, Zaloznaya L. 2004. Complex analysis of morphological characters of Gamasid mite *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidae). *Journal of Zoology*. 38(5): 57–66. ISSN: 0084-5604

Akinwande KL, Badejo MA, Ogbogu SS. 2012. Incidence of the Korean haplotype of *Varroa destructor* in southwest Nigeria. *Journal of Apicultural Research*. 51:369-370. ISSN: 0021-8839

Anderson D, Trueman J. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and applied acarology*. 24:165-189. ISSN: 0168-8162

AUDE K.E, Armand P, Francois A, Charlemagne G, Georg G, Manuelle T, Lamine BM. 2016. Morphometric characterization of parasite *Varroa sp.* of bee *Apis mellifera L.* in Benin. *European Scientific Journal*. 12(33):221-234. ISSN: 1857-7431.DOI: 10.19044/esj.2016.v12n33p221

Badejo M, Ogbogu S, Akinwande KL. 2013. Morphometrics and parasitic load of *Varroa* mites (Acari: varroidae) on colonies of *Apis mellifera adansonii* (Hymenoptera: apidae) in south Western Nigeria. *Russian Acarological Journal*. 21:17-26. ISSN: 0132-8077

Bosuk G, Olszewski K, Strachecka A, Paleolog J, Kasperek K. 2012. Genetic and morphometric variation of the *Varroa destructor* developing in standard and small comb cells. *Veterinary Medical Science and Practice (Medycyna Weterynaryjna)*. 68:599-602. <http://www.medycynawet.edu.pl/231-summary-2012/summary-2012-10/4223-summary-med-weter-68-10-599-602-2012>

Boudagga H, Barbouche N, Laârif A, Hamouda, MHB. 2003. Morphological identification of the *Varroa* species (Acari: Varroidae) colonizing Tunisian apiaries.

Systematic and Applied Ácarology. *Systematic y Applied Acarology Society*. 8(1): 97-100. ISSN: 1362-1971. DOI: 10.11158/saa.8.1.12

Bridges CM, Semlitsch RD. 2001. Genetic variation in insecticide tolerance in a population of southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*): implications for amphibian conservation. *The American Society of Ichthyologists and Herpetologists*. 1(1):7-13. ISSN: 0045-8511. DOI: 10.1643/0045-8511(2001)001[0007:GVHITI]2.0.CO;2.

Carroll SP, Hendry AP, Reznick DN, Fox CW. 2007. Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology*. 21:387-393. ISSN: 1365-2435. DOI:10.1111/j.1365-2435.2007.01289.x.

Cox DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318:283-287. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1146498.

Dadgostar S, Nozari J. 2018. Classical and geometric morphometric methods reveal differences between specimens of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) from seven provinces of Iran. *Persian Journal of Ácarology*. 7(1):51-60. ISSN:2251-8169. DOI: 10.22073/pja.v1i1.32063.

De Guzman L, Delfinado M. 1996. A new species of *Varroa* (*Acari: Varroidae*) associated with *Apis koschevnikovi* (*Apidae: Hymenoptera*) in Borneo. *International Journal of Acarology*. 22: 23-27. ISSN: 0164-7954. DOI: 10.1080/01647959608684077.

De jong D, De Jong P, Goncalves L. 1982. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*. 21:165-167. ISSN: 0021-8839. DOI: 10.1080/00218839.1982.11100535.

De Miranda J. R, Cordoni G, Budge G. 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1:30-47. ISSN: 0022-2011 DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.014

Delfinado M, Aggarwal K. 1987. A new *Varroa* (*Acari: Varroidae*) from the nest of *Apis cerana* (*Apidae*). *International Journal of Acarology*. 13:233-237. ISSN: 0164-7954. DOI: 10.1080/01647958708683777.

- Delfinado M, Houck M. 1989. Geographic variation in *Varroa jacobsoni* (Acari, Varroidae): application of multivariate morphometric techniques. *Apidologie*. 20:345-358. ISSN:0044-8435.
- Duay P, De Jong D, Engels W. 2003. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*. 34:61-65. ISSN: 0044-8435. DOI: 10.1051/apido:2002052.
- Fernández A, Zavala J, Romero R. 2010. Atlas climático digital de México. *Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM*. Available online:<http://atlasclimatico.unam.mx/atlas/kml>
- George M, Munoz G, Marquet PA, Poulin R. 2004. Testing the energetic equivalence rule with helminth endoparasites of vertebrates. *Ecology Letters*. 7:527-531. ISSN: 1461-0248. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2004.00609.x.
- Giménez P, Mendoza Y, Invenizzi C, Fuselli S, Alonso Salces R, Fernández P, Maggi M. 2017. Morphometric correlation between *Apis mellifera* morphotypes (*Hymenoptera*) and *Varroa destructor* (Acari) from Uruguay. *Journal of Apicultural Research*. 56:122-129. ISSN: 0021-8839. DOI: 10.1080/00218839.2017.1287998.
- Kelomey E, Paraiso A, Azonwade F, Gbemavo C, Goergen G, Tamo M, Baba-Moussa, L. 2016. Morphometric characterization of parasite *Varroa sp.* of bee *Apis mellifera L.* in Benin. *European science journal*. 12(33):221-234. issn: 1857-7881. doi: 10.19044/esj.2016.v12n33p221.
- Kralj J, Fuchs S. 2006. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*. 37:577-587. ISSN: 0044-8435. DOI: 10.1051/apido:2006040.
- Krantz G. 1978. *A manual of acarology*. –Oregon State University Book Store. Inc. Corvallis. 509 p. ISBN: 0882460641, 9780882460642.
- López E, Acosta N, González N, Fernández M, Ferreira E, Rojas De Arias A. 2002. Diferencias morfométricas en poblaciones de *Triatoma infestans* provenientes de las regiones Oriental y Occidental del Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 1:51-57. ISSN: 1812-9528.

- Maggi M.D, Sardella NH, Ruffinengo SR, Eguaras MJ. 2009. Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parásitology research*. 105:1629-1636. ISSN: 0932-0113. DOI: 10.1007/s00436-009-1605-8.
- Nussey D, Wilson A, Brommer J. 2007. The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *Journal of evolutionary biology*. 20:831-844. ISSN: 1420-9101. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2007.01300.x.
- Oliveira E.E, Guedes RNC, Totola MR, De Marco Jr P. 2007. Competition between insecticide-susceptible and-resistant populations of the *Maize weevil*, *Sitophilus zeamais*. *Chemosphere. Europe PMC*. 69:17-24. ISSN: 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.04.077.
- Oudemans A.C. 1904. On a new genus and species of parasitic acari. *Notes from the Leyden Museum*.24:216-222. ISSN: 1872-9231. Disponible en: <http://www.repository.naturalis.nl/document/551518>.
- Pigliucci M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology y Evolution*. 20:481-486. ISSN: 0169-5347. DOI: 10.1016/j.tree.2005.06.001.
- Van Tienderen PH. 1991. Evolution of generalists and specialists in spatially heterogeneous environments. *Evolution: International Journal of Organic Evolutio*. 45:1317-1331. ISSN: 1558-5646. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1991.tb02638.x.
- Wu R, Ma CX, Lou XY, Casella G. 2003. Molecular dissection of allometry, ontogeny, and plasticity: a genomic view of developmental biology. *Bioscience*. 53:1041-1047. ISSN: 0096-7645. DOI: 10.1641/0006-3568(2003)053[1041:MDOAOA]2.0.CO;2.
- Yarahmadi F, Moassadegh M, Soleymannejadian E, Saber M, Shishehbor P. 2009. Assessment of acute toxicity of abamectin, spinosad and chlorpyrifos to Thrips tabaci Lindeman (*Thysanoptera: Thripidae*) on sweet pepper by using two bioassay techniques. *Asian Journal of Biological Sciences*. 2:81-87. ISSN: 1996-3351. DOI: 10.3923/ajbs.2009.81.87
- Zhang Z.Q. 2000. Notes on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) parasitic on honeybees in New Zealand. *Systematic and Applied Ácarology Special Publications*. 5:9-14. ISSN: 1461-1183. DOI: 10.11158/saasp.5.1.2

Capítulo 3. Eficacia del timol sobre la presencia de *Varroa* y *Nosema* en colmenas utilizadas para formar núcleos de fecundación.

Resumen

Actualmente existe la necesidad de utilizar productos alternativos de origen natural que no afecten negativamente la productividad de las colmenas y que reduzcan la presencia de diversos patógenos. El timol es considerado como el producto natural más utilizado para el tratamiento de la varroasis en todo el mundo y potencialmente eficaz como nosemicida. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar el impacto del timol sobre el control de la varroasis y nosemosis en colmenas para la formación de núcleos de fecundación de abejas reina (*Apis mellifera*). Se utilizaron 65 colmenas en las cuales se cuantificó el nivel de infestación para *Varroa*, nivel de infección para *Nosema* y las prevalencia de ambas enfermedades en la población antes y después del tratamiento, basado en 4 aplicaciones de timol al 20% en azúcar glass con intervalo de 7 días. La prevalencia de la varroasis disminuyó al igual que el nivel de infestación pos tratamiento ($p \leq 0.05$). Por el contrario, la prevalencia de la nosemosis ($p \geq 0.05$) y el nivel de infección de *Nosema* fueron mayores después del tratamiento ($p \leq 0.05$). Se concluye que en las colmenas para la formación de núcleos de fecundación de abejas reina el timol es eficaz contra varroasis pero no contra nosemosis.

Palabras clave: Patógenos, abeja, varricida, prevalencia.

Introducción

La varroasis es considerada como la enfermedad de mayor amenaza para la apicultura, ya que provoca la muerte de las colmenas infestadas dentro de los 2 a 4 años de iniciada la infestación, en este contexto ningún otro patógeno ha tenido un impacto durante tanto tiempo en la apicultura (Le Conte *et al.*, 2010). La nosemosis es causada por los hongos *Nosema apis* o *Nosema ceranae*. Estos son microsporidios que se reproducen rápidamente dentro de las células intestinales ejerciendo un estrés energético severo en las abejas (Williams *et al.*, 2014, Ravoet *et al.*, 2013); esto afecta negativamente la productividad, supervivencia, longevidad y suprime el sistema inmunitario aumentando la vulnerabilidad de las abejas para padecer otras enfermedades (Higes *et al.*, 2008, Alaux *et al.*, 2010). Varroasis y nosemosis son consideradas

las enfermedades con mayor repercusión en las colmenas productoras de miel, información de estas dos enfermedades en otros fines productivos y el efecto del tratamiento no se han descrito.

El timol es un acaricida derivado del tomillo, es una sustancia natural de bajo impacto ambiental, baja toxicidad y no produce resistencia de la *Varroa* a los acaricidas (Adamczyk *et al.*, 2005, Montano y Guzman-Novoa, 2007), permitiendo su uso para el control de *Varroa* en la apicultura orgánica, según el reglamento de la Unión Europea No. 834/2007 (Unión Europea, 2007). Por estas razones, el timol se utiliza en concentraciones que van desde 9 g hasta 32.12 g por colmena (Floris *et al.*, 2004, Bulacio Cagnolo *et al.*, 2010, Espinosa-Montaño y Guzmán-Novoa, 2007a). Siendo el varricida natural más utilizado en la apicultura los apicultores de la región utilizan el timol en forma empírica al 20% para el tratamiento contra varroasis (Imdorf *et al.*, 1995). Además que el timol suprime el desarrollo de la vesícula de *Nosema* en las orugas de *Helicoverpa armígera* (Rice, 2001) e inhibe el crecimiento de bacterias y hongos patógenos (Viollon y Chaumont, 1994, Juven *et al.*, 1994, Mahmoud, 1999), en este sentido, el timol ha sido utilizado en laboratorio como tratamiento exitoso contra *Nosema* (Van den Heever *et al.*, 2016, Maistrello *et al.*, 2008, Costa *et al.*, 2010). Entonces, puede ser una alternativa en el control de ambas enfermedades (varroasis y nosemosis) en vida libre.

Los núcleos de fecundación tienen la función primordial de albergar a las reinas vírgenes durante el periodo de apareamiento, entonces las colmenas formadoras de núcleos de fecundación influyen en la salud de las colmenas donde las reinas serán liberadas. Sin embargo, el diagnóstico y el control de *Varroa* y *Nosema* es una práctica común en la apicultura pues influyen en la rentabilidad de las colmenas, pero hasta donde sabemos no existen reportes que cuantifiquen y traten las dos enfermedades en las colmenas que son utilizadas para la formación de núcleos de fecundación (CFNF). Por lo que es nuestra intención evaluar el tratamiento convencional 1:5 (timol y azúcar glass) sobre la presencia de *Varroa* y *Nosema* en las CFNF.

Materiales y métodos

Ubicación del área experimental. La investigación se realizó en el municipio de Tepic, Nayarit, México ubicado a 21° 51' y 21° 24' latitud norte, 104° 34' y 105° 05' longitud oeste a 915 metros sobre el nivel del mar. En la zona predomina el clima cálido subhúmedo con lluvias

en verano y el semicálido subhúmedo con lluvias en invierno, la precipitación promedio anual es de 1,121 mm y la temperatura promedio es de 21.1°C (Fernández-Eguiarte *et al.*, 2010).

Unidades experimentales. Se muestrearon 5 apiarios con un total de 65 CFNF. Nosotros definimos a estas colmenas como aquellas cuya principal función es el donar bastidores con cría y abejas jóvenes, con la finalidad de poblar colmenas para la fecundación de abejas reinas vírgenes. Las CFNF están sometidas a la constante pérdida de población, por lo que no se utilizan para la producción de miel, polen, propóleos o jalea real, en este sentido, mantener la salud de estas colmenas garantizar el buen desarrollo de las reinas que son criadas en los núcleos de fecundación.

Preparación y aplicación del timol. Se utilizó timol cristal previamente pulverizado con una pureza del 99.0 %. El tratamiento consistió en la mezcla de timol y de azúcar glass 1:5. Para la aplicación se prepararon paquetes con 40 g de la mezcla los cuales fueron esparcidos en cuadros de papel de 20 x 20 cm sobre la cámara de cría. El tratamiento se aplicó en 4 ocasiones con intervalos de 7 días.

Obtención de muestras y procesamiento en laboratorio. Se recolectaron aproximadamente 300 abejas por colmena tomadas entre el tercer y cuarto bastidor de la cámara de cría, se colocaron en recipientes con alcohol al 70%. Las muestras se colectaron en el día 0 al principio del tratamiento y día 28, 7 días después del último tratamiento. La cuantificación de varroas se realizó por la técnica de De Jong *et al.* (1982) y el nivel de infestación de *Varroa* se determinó dividiendo el número de ácaros encontrados entre el número de abejas observadas y el resultado multiplicado por 100. La visualización de *Nosemas* fue realizada por la técnica de Cantwell y el nivel de infección de *Nosema* se determinó dividiendo la cantidad de esporas observadas entre 80 y se multiplicó por 4 millones (Cantwell, 1970).

Prevalencia y eficacia del tratamiento. La prevalencia de ambas enfermedades se determinó multiplicando el número de colmenas con presencia del patógeno (*Varroa* o *Nosema*) por 100 y dividido entre el total de colmenas evaluadas (Moreno-Altamirano *et al.*, 2000). El porcentaje de eficacia se determinó mediante la resta del total de patógenos encontrados inicialmente menos el total de patógenos encontrados después del tratamiento dividido entre el total de

patógenos encontrados inicialmente y multiplicado por 100 (Moreno-Altamirano *et al.*, 2000). El índice de aumento se determinó mediante la resta del índice final menos índice inicial dividido entre índice final y multiplicado por 100 (Llorente *et al.*, 1996)

Análisis estadístico. Para determinar las diferencias entre los niveles de *Varroa* y *Nosema* antes y después de la aplicación de timol se realizó mediante una comparación de medias con la prueba t-Student. Se utilizó el Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20.00 (IBM, 2011).

Resultados y discusión

La efectividad del timol contra *Varroa* ha sido demostrada por autores como Llorente *et al.* (1996) quienes utilizando 10 g de timol por colmena tuvieron el 92.2% de eficacia, Montano y Guzman-Novoa (2007) utilizaron 12.5 g obtuvieron 92.1% de eficacia, así mismo, Bulacio Cagnolo *et al.* (2010) obtuvieron un 82.0% de eficacia con 32.12 g por colmena. En el mismo sentido, de acuerdo a una prueba t-Student, los resultados del presente experimento muestran que utilizando 8 g de timol por colmena, la eficacia contra *Varroa* pos tratamiento fue de 85.07%, de 809 a 120 ácaros de *Varroa* totales ($p \leq 0.05$) y el nivel de infestación de *Varroa* presentó una disminución pos aplicación de timol de 6.06 ± 0.68 a 0.84 ± 0.14 ácaros/100 abejas ($p \leq 0.05$). Del mismo modo, la prueba t-Student indicó una disminución significativa de la prevalencia de la varroosis en las colmenas evaluadas del 96.92% pre tratamiento al 56.92% pos tratamiento reduciendo la prevalencia en un 41.27% ($p \leq 0.05$) (Tabla 9). Consideramos que la aplicación de 8 g de timol en base sólida, es tan eficiente para el control de la varroosis como las preparaciones en gel y jarabe utilizadas en otros trabajos (Montano y Guzman-Novoa, 2007, Llorente *et al.*, 1996, Bulacio Cagnolo *et al.*, 2010).

Contrario a la efectividad del timol contra la varroosis, la prevalencia de la nosemosis fue mayor en 7.4%, de un 76.92% pre tratamiento a 83.08% pos tratamiento ($p \geq 0.05$), así mismo, el nivel de infección de *Nosema* aumentó de $23.5 \pm 38.0 \times 10^3$ a $73.4 \pm 11.0 \times 10^4$ esporas/abeja, por lo que se observó un incremento de 67.92% ($p \leq 0.05$) (Tabla 9). En este sentido el timol no demostró ser efectivo en el control de la nosemosis, así mismo, el aumento del nivel de infección no fue en números suficientes para observar la enfermedad clínica en las colmenas. De acuerdo a las

referencias consultadas, no existe evidencia en la literatura que sustente la eficacia del timol como tratamiento contra *Nosema* en vida libre.

Tabla 7. Efecto del tratamiento con timol sobre la cuantificación de *Varroa* y *Nosema* en colmenas formadoras de núcleos de fecundación.

Periodo	Varroa				Nosema		
	TC	C+	PV (%)	NIVC	C+	PN (%)	NINC
Pre tratamiento	65	63	96.92a	6.06 ± 0.68a	50	76.92a	23.5 ± 38.0 x10 ³ a
Pos tratamiento	65	34	56.92b	0.84 ± 0.14b	54	83.08a	73.4 ± 11.0 x10 ⁴ b

TC: Total de colmenas; C+: Colmenas positivas; PV: Prevalencia de *Varroa*; PN: Prevalencia de *Nosema*; NIVC: Nivel de infestación de *Varroa* por colmena; NINC: Nivel de infección de *Nosema* por colmena; (**a**, **b**) Literales diferentes por columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En condiciones controladas de laboratorio, donde las abejas inoculadas fueron mantenidas bajo la ingesta de timol periódicamente, los resultados indicaron que el timol redujo en un 40% la cantidad de *Nosema* con concentraciones de 4, 40, 400 μM (Van den Heever *et al.*, 2016), así mismo, se han observado efectos similares con concentraciones de timol de 0,12 mg/g, encontrándose 8.8% después de 25 días pos tratamiento (Maistrello *et al.*, 2008), del mismo modo Costa *et al.* (2010) indica que cuando se alimenta a las abejas parasitadas con *Nosema* y se les alimenta con timol a una concentración de 0.1 mg/g ya sea en jarabe o caramelo la infección se reduce un 50%.

Los resultados obtenidos fueron contradictorios, pues en el presente estudio se utilizaron cantidades superiores (1,331 mM) de timol a lo reportado, encontrando un incremento de la enfermedad en las colmenas, posiblemente, por las condiciones en que Van den Heever *et al.* (2016), Maistrello *et al.* (2008) y Costa *et al.* (2010), realizaron sus investigaciones mientras que esta investigación se realizó a nivel de campo en condiciones naturales permitiendo la entrada y salida de las abejas, la obtención de alimentos *ad libitum* y el intercambio de secreciones entre las abejas obreras, razones por las que los resultados en vida libre difieren, pues existen factores que permitieron el mantenimiento y desarrollo de *Nosema*. se cree que después del tratamiento contra *Varroa* mediante el uso de timol las condiciones de las abejas mejoraron, aumentando la cantidad de hemocitos y mejorando el metabolismo de las proteínas

de la hemolinfa (Le Conte *et al.*, 2010) y como consecuencia se favorece el desarrollo de *Nosema*, es posible que en experimentos controlados no se pueda observar este fenómeno, debido a la limitación por una dieta específica y controlada, lo que posiblemente limita el crecimiento del hongo dentro de los hospedadores.

Si se tratan las abejas con timol, la cantidad de *Varroa* disminuye y no hay competencia entre patógenos por los nutrientes, aumenta la condición corporal de las abejas y entonces *Nosema* prolifera (Williams, 2009). De lo anterior se puede hipotetizar que el incremento de la prevalencia nosemosis y el nivel de infección de *Nosema* después del uso del timol fue un efecto secundario por la disminución de la presencia de *Varroa*. La ineficacia del timol contra la nosemosis también está soportada por trabajos previos donde se concluyó que el timol no es limitante para el desarrollo de *Nosema* al incorporarse 15 mM y 30 mM de timol en la dieta de orugas, obteniendo un decremento del 53,8% y 59.2% de *Nosema vespula* respectivamente (Rice, 2001).

Conclusión

Se concluye que el timol es eficaz contra varroosis pero no contra nosemosis en colmenas a nivel de campo y en condiciones naturales.

Referencias

adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P. and Herrera, A. 2005. Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-*Varroa* treatments. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 10085-10090.

Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L. P. and Le Conte, Y. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 12, 774-782.

Bulacio Cagnolo, N., Basualdo, M. and Eguaras, M. 2010. Actividad Varroocida del timol en colonias de *Apis mellifera L.* de la provincia de Santa Fe. *InVet*, 12, 85-90.

Cantwell, G. 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *Amer Bee J.*

- Costa, C., Lodesani, M. and Maistrello, L. 2010. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie*, 41, 141-150.
- De Jong, D., De Jong, P. and Goncalves, L. 1982. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21, 165-167.
- Espinosa-Montaña, L. G. and Guzmán-Novoa, E. 2007. Effectiveness of two natural miticides, formic acid and thymol, for control of the mite *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.) in Villa Guerrero, Mexico. *Veterinaria Mexico*, 38, 9-19.
- Fernández-Eguiarte, A., Zavala-Hidalgo, J. and Romero-Centeno, R. 2010. Atlas climático digital de México. *Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM*. Available online: <http://atlasclimatico.unam.mx/atlas/kml>.
- Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V. L. and Angioni, A. 2004. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. *Journal of economic entomology*, 97, 187-191.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P. and Meana, A. 2008. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J Invertebr Pathol*, 97, 76-8.
- Imdorf, A., Bogdanov, S., Kilchenmann, V. and Maquelin, C. 1995. Apilife VAR: a new varroacide with thymol as the main ingredient. *Bee World*, 76, 77-83.
- Juven, B., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology*, 76, 626-631.
- Le Conte, Y., Ellis, M. and Ritter, W. 2010. *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41, 353-363.
- Llorente, J., Higes, M. and Suárez, M. Tratamientos con productos naturales contra *Varroa jacobsonii*. Estudio comparativo de varios compuestos: timol, mentol, alcanfor. Actas del II Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica, Pamplona, 1996.

- Mahmoud, A. L. 1999. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants. *Letters in applied microbiology*, 29, 334-336.
- Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G., Caldon, M., Mutinelli, F. and Granato, A. 2008. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 39, 436-445.
- Montano, L. and Guzman-Novoa, E. 2007. Effectiveness of two natural miticides, formic acid and thymol, for control of the mite *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.) in Villa Guerrero, Mexico. *Veterinaria Mexico*, 38, 9.
- Moreno-Altamirano, A., López-Moreno, S. and Corcho-Berdugo, A. 2000. Principales medidas en epidemiología. *Salud pública de México*, 42, 337-348.
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G. And De Graaf, D. C. 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One*, 8, e72443.
- Rice, R. N. 2001. BARTON ACT 2600 PO Box 4776 KINGSTON ACT 2604.
- Unión Europea, N. 2007. Reglamento de la Unión Europea (CE) No. 834/2007 sobre la producción y etiquetado de los productos ecológicos. Diario Oficial de la Unión Europea.
- Van Den Heever, J. P., Thompson, T. S., Otto, S. J., Curtis, J. M., Ibrahim, A. and Pernal, S. F. 2016. Evaluation of Fumagilin-B® and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie*, 47, 617-630.
- Viollon, C. and Chaumont, J.-P. 1994. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 128, 151-153.
- Williams, B. A. 2009. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular microbiology*, 11, 1551-1560.
- Williams, G. R., Shutler, D., Burgher-Maclellan, K. L. and Rogers, R. E. 2014. Infra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS One*, 9, e99465.

Capítulo 4. Selección morfométrica y fenotípica de las poblaciones abejas predominantes en colmenas formadoras de núcleos de fecundación.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un esquema para seleccionar morfotipos basado en la cuantificación mejores características deseables de las colmenas. Se evaluaron 67 colmenas a las cuales se les identificaron los morfotipos de abejas, cuatro comportamientos productivos de las abejas (comportamiento higiénico, defensivo, forrajero y condición de la colmena) y la tasa de infestación de *Varroa*, los cuales fueron evaluados en 4 ocasiones con un intervalo de 7 días. Los resultados indicaron que el 87.69 % de las colmenas evaluadas presentaron un morfotipo híbrido, 17.6 % europeo y el 4.6 % africano. No se encontró correlación entre los morfotipos y los comportamientos ($p \geq 0.05$), por lo que de acuerdo a su comportamiento se encontraron 7 fenotipos perteneciendo el 12.3% al fenotipo A, 4.61 % al B, 9.23 % C, 3.07 % al D, 21.53 % al F, 1.53 % al G, siendo el fenotipo E el más predominante con 47.69%. Se concluye que existe una variación fenotípica en las poblaciones evaluadas, por lo que consideramos que el fenotipo E es el más adecuado para la selección ya que presentó un bajo porcentaje de comportamiento defensivo, un alto comportamiento higiénico y una baja tasa de infestación de *Varroa*.

Introducción

En la actualidad en México existen cerca de 45 mil productores (SAGARPA, 2016), los cuales tienen la necesidad de adquirir abejas reinas, por lo menos una vez al año. El cambio de abejas reinas se incrementó desde que aparecieron las abejas africanizadas (Javier y Euán, 2011); la importancia del cambio de abejas reinas longevas por jóvenes, radica en aumentar la producción de miel, ya que las abejas reinas jóvenes tienden a ser más fértiles, incrementando la población de abejas obreras y por ende la capacidad de una colmena para introducir néctar, lo que se ve reflejado en el volumen de producción de miel (Corbella y Guerrero, 1992; Collins, 2004).

El cambio de abejas reinas es un proceso crítico dentro de la producción de miel, ya que de ello depende la productividad de las colmenas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2013). Los criadores de abejas reinas carecen de las tecnologías para seleccionar, reproducir e identificar las características del

comportamiento esenciales para el manejo y desarrollo de las colmenas, es por esto, que los criadores optan por la obtención de reinas de otros países o estados de la república, lo que conlleva la introducción de nuevos especímenes (Agropecuarias, 2010). Dichos especímenes no logran adaptarse a las condiciones naturales donde son introducidas, lo que propicia variación en sus características morfológicas, fisiológicas y de comportamiento, dando lugar a distintas subespecies o ecotipos de abejas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2013).

La cría de abejas reinas es una actividad primordial para la apicultura en todo el mundo, pues de ellas dependen las características como el comportamiento higiénico, forrajero y defensivo de las futuras generaciones (Rosero y David, 2006). Estas características son de importancia para el apicultor, debido a que la primera está relacionada con la resistencia a diversos patógenos, la segunda con la producción de miel y la última relacionada con el manejo de las colmenas (Andere *et al.*, 2011, Smith, 1991). En este sentido, la selección y conservación de poblaciones de abejas locales, mediante evaluaciones morfológicas, biogeográficas, fenotípicas, sanitarias y moleculares son de importancia para determinar la expresión de las características simples y complejas de la naturaleza de las abejas (Schuster y Cruz, 2004), por lo que es fundamental cuantificar las características deseables a seleccionar (Page Jr y Peng, 2001).

El mejoramiento de la productividad de las poblaciones de abejas radica en promover el desarrollo de verdaderos ecotipos en los distintos ambientes ecológicos, creando una importante diversidad genética, lo que es fuente de riqueza invaluable para el trabajo de selección (Cobey *et al.*, 2012). Es por ello, seleccionar poblaciones de abejas mediante estudios morfométricos, fenotípicos y sanitarios, nos permitirá obtener colmenas mejor adaptadas y altamente productivas. El objetivo de esta investigación fue identificar el morfotipo predominante y fenotipo con mejores índices de productividad.

Materiales y métodos

Localización y fuente de la información. La presente investigación se realizó en el municipio de Tepic, Nayarit, el cual se ubica a 21° 51' y 21° 24', de latitud norte y 104° 34' y 105° 05' de longitud oeste y a 915 metros sobre el nivel del mar. En el municipio predominan dos tipos de clima; el cálido subhúmedo con lluvias en verano y el semicálido subhúmedo con lluvias en invierno. Se observa que en promedio la temperatura en verano es alrededor de 24.0 °C y el más

frio en invierno con temperaturas promediando 17.8 °C. La precipitación promedio anual es de 1,121 mm y la temperatura promedio es de 21.1 °C (Fernández-Eguiarte *et al.*, 2010)

Tamaño de la muestra. Se evaluaron 65 colmenas al azar, lo que correspondió a una proporción del 30% de un total de 300 colmenas destinadas para un sistema de cría de reinas con un ajuste a la pérdida del 10%, un nivel de confianza del 95% y una precisión del 10%.

Toma de muestras. Se obtuvieron muestras de entre 200 y 300 abejas adultas en recipientes de plástico con alcohol al 96%, dichas muestras fueron resguardadas en un congelador a -20°C hasta su uso; el diagnóstico sanitario y morfométrico se determinaron en el Laboratorio de Parasitología y el Laboratorio de Biología Funcional ambos de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nayarit.

Parámetros de evaluación. A cada una de las colmenas se les identificaron el morfotipo de abejas (M) y se les evaluaron parámetros fenotípicos como: el comportamiento higiénico (CH), forrajero (CF), defensivo (CD) y su Condición (CC) y la tasa de infestación de *Varroa*, cada uno de estos parámetros del comportamiento fueron evaluados en 4 ocasiones con un intervalo de 7 días.

Micrometría de las abejas. Para determinar el tipo morfológico de las abejas (morfotipo) se utilizó el Sistema Rápido de Identificación de la Abeja Africana (FABIS, por sus siglas en inglés) (Sylvester y Rinderer, 1987). Por colonia se diseccionó el ala anterior derecha de 10 abejas obreras; las alas se montaron entre dos porta objetos de cristal y se observaron en un microscopio estereoscópico con un ocular micrométrico a una escala 1:1.153. Para el establecimiento de los morfotipos la longitud del ala se multiplicó por 1.153, se calculó el promedio por colmena y finalmente las colonias con un promedio por encima de 9.001 mm se clasificaron como europeas, mientras que aquellas con un promedio por debajo de 8.968 mm se clasificaron como africanizadas y las colonias con promedios entre 8.968 y 9.001 mm se consideraron híbridas.

Criterios fenotípicos. De acuerdo a su importancia los comportamientos fenotípicos se calificaron con un índice de 100%. Por lo que para el CD y CH se le dio un valor 40% a cada uno y para CF y CC un 10% a cada uno.

Comportamiento higiénico. Mediante un cortador circular de siete centímetros de diámetro se marcó el panal para delimitar el área de perforación, posteriormente se sacrificaron las crías con un alfiler al centro del opérculo hasta el fondo de la celda y se tomó nota de cuantas se sacrificaron en dicha zona. A las 24 horas de la perforación se realizó la lectura. El porcentaje de higiene se evaluó mediante la siguiente fórmula: este parámetro se determinó mediante la división del número de celdas limpiadas entre el total de celdas pinchadas y dividido entre 100.

Comportamiento defensivo. El comportamiento defensivo de la abeja se realizó empleando el método de la bandera descrito por (Collins y Kubasek, 1982) con modificaciones por lo que no se hizo uso del isopentil acetato. Las banderas de 5x5 cm se colocaron delante de las piqueras, se agitaron suavemente hasta que se obtuvo la primera picada momento en el que inició el conteo del tiempo (60 segundos), al finalizar el tiempo las banderas fueron colocadas en bolsas de papel las cuales eran rotuladas con el número de la colmena. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Biología Funcional donde se contabilizaron los agujijones.

Comportamiento forrajero. La ganancia de peso, se realizó mediante la identificación de un panal de almacenaje de miel el cual fue marcado y pesado durante cuatro semanas, procurando que sea el mismo horario de pesaje, se estimó el promedio de introducción de néctar, esta metodología nos permitió cuantificar la capacidad de producción de una colmena. La introducción de néctar se determinó dividiendo el peso total obtenido entre en número de veces que se muestreo.

Condición de la colmena. Se midió mediante el número de panales funcionales dentro de la colmena, en este sentido las colmenas se clasificaron por el número de cuadros cubiertos por abejas (considerando ambas caras del cuadro), este parámetro nos permitió estimar la fortaleza de las colmenas. (Cobey *et al.*, 2013), por lo que se le asignó la categoría 1 (Buena) a las colmenas que tuvieron más 7 bastidores funcionales, 2 (Regular) de 4 a 7 bastidores funcionales y 3 (Mala) a las colmenas con menos de 4 bastidores funcionales.

Diagnóstico *Varroa*. La tasa de infestación de *Varroa* se determinó de acuerdo a la técnica de De Jong *et al.* (1982), donde el conteo total de ácaros dividido entre el número de abejas analizadas y multiplicado por 100.

Análisis estadístico. Para determinar las diferencias fenotípicas entre los apiarios se realizó una comparación de medias con una prueba de ANOVA de un factor. Se realizó un análisis de correlación entre las variables en estudio mediante una correlación de Pearson. Para determinar los fenotipos se realizó un análisis de conglomerados K medias y conglomerados jerárquicos. Para ello, se utilizó el Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20.0 (IBM, 2011).

Resultados

Del total de colmenas evaluadas en la presente investigación el 13.4% presentaron una alta agresividad, 23.9% agresividad, 28.3% mediana agresividad, 29.8% docilidad y únicamente el 8.9% presento una alta docilidad. El 3% de la población presento baja higiene, 1.5% regular higiene, 23.9% mediana higiene, 29.8% higiene, 41.8% alta higiene, observándose que las abejas predominantes presentan un comportamiento higiénico considerable. El 14.9% de las colmenas evaluadas presentaron una baja producción, 44.7% presentaron una regular productividad, 26.8% una mediana productividad, 10.4% productivas y únicamente el 2% presentaron una alta productividad. El 14.0% de las colmenas evaluadas presentaron una mala condición es decir menos de 4 bastidores cubiertos con abejas, 68.0% presentaron una condición regular por lo tanto tenían entre 4 y 7 bastidores y solamente 18.0% presentaron una alta condición por lo que tenían más de 7 bastidores con abejas. Se encontró que el 97.2 de las colmenas evaluadas presentaban la presencia de *Varroa*.

De acuerdo al método de FABIS 87.69% de las colmenas evaluadas presentaron un morfotipo híbrido, el 7.6% de morfotipo europeo y únicamente el 4.6% presentaron morfotipo africano. Se encontró que el morfotipo híbrido fue el más predominante en el área de estudio y el morfotipo africano únicamente se encontró en el apiario 3 y 5, el morfotipo europeo se encontró en todos los apiarios (Tabla 10).

Tabla 8. Número y porcentaje de colonias con morfotipo africano, europeo e híbrido en los apiarios evaluados

Fenotipo	1	2	3	4	5
Africano	----	----	(2) 12.50%	----	(1) 6.67%
Híbrido	(1) 83.33%	(16) 94.12%	(13) 81.25%	(10) 90.91%	(13) 86.67%
Europeo	(5) 16.67%	(1) 5.88%	(1) 6.25%	(1) 9.09%	(1) 6.67%

De acuerdo al comportamiento fenotípico las poblaciones de abejas se agruparon, por lo que identificamos que las variables CF y M no representaron discriminación ($p \geq 0.05$), en comparación con las demás variables (Tabla 11). En cuanto a los grupos jerárquicos, si se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las variables CC, CD, CH, pero no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre las variables CF, M (Tabla 12).

Tabla 9. Identificación de variables discriminantes de los grupos fenotípicos

Variables	F	Sig.
CC	2.293	.047
CD	20.042	.000
CH	39.203	.000
TIV	7.214	.000
M	1.084	.383
CF	1.643	.152

CC: Condición de la colmena, CD: Comportamiento defensivo, CF: Comportamiento forrajero, CH: Comportamiento higiénico, TIV: Tasa de infestación de *Varroa*, M: Morfotipo.

Tabla 10. Media de las variables estudiadas entre grupos jerárquicos

Variables	Fenotipos						
	A	B	C	D	E	F	G
N	8	3	6	2	31	14	1
TIV (V/C)	6.98 ± 1.14 a	16.53 ± 2.27 b	7.17 ± 2.51 a	5.16 ± 2.17 a	4.09 ± 0.68 a	5.90 ± 1.41 a	25.14 ± 0.00 c
CC (%)	7.71 ± 0.42 a	5.92 ± 1.44 ab	8.76 ± 0.58 a	9.16 ± 0.83 c	8.40 ± 0.22 ac	8.31 ± 0.39 ac	6.11 ± 0.00 ab
CD (%)	10.00 ± 1.30 a	37.33 ± 2.66 c	12.00 ± 1.78 a	28.00 ± 4.00 b	22.96 ± 1.09 b	30.85 ± 1.64 bc	40.00 ± 0.00 c
CF (%)	4.50 ± 0.90 a	2.66 ± 0.66 b	5.00 ± 0.85 a	7.00 ± 1.00 c	5.03 ± 0.30 a	5.14 ± 0.50 a	2.00 ± 0.00 b
CH (%)	37.00 ± 1.46 a	37.33 ± 2.66 a	22.66 ± 1.33 b	8.00 ± 0.00 c	37.42 ± 0.68 a	26.28 ± 1.00 b	24.00 ± 0.00 b
M	1.75 ± 0.16 a	2.00 ± 0.00 a	2.00 ± 0.00 a	2.00 ± 0.00 a	2.09 ± 0.07 a	2.07 ± 0.07 a	2.00 ± 0.00 a

N: Numero de colmenas pertenecientes al grupo jerárquicos, CC: Condición de la colmena, CD: Comportamiento defensivo, CF: Comportamiento forrajero, CH: Comportamiento higiénico, TIV: Tasa de infestación de *Varroa*, V/C: varroas por colmena M: Morfotipo (1: Africano, 2: Híbrido, 3: Europeo), VC: *Varroa* por colmena, **a, b** Literales diferentes por fila indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

Se encontraron 7 fenotipos de los cuales el 12.3% pertenecieron al fenotipo A, 4.61% al fenotipo B, 9.23% al fenotipo C, 3.07% al fenotipo D, 21.53% al fenotipo F, siendo el fenotipo E el más predominante con 47.69% y el fenotipo G con menor presencia con el 1.53%. Se determinó que el morfotipo E es el que mejores características fenotípicas presentaron (Tabla 13).

Tabla 11. Media de las variables estudiadas pertenecientes a los 7 fenotipos de abejas en las colmenas evaluadas.

FENOTIPO	N.COLMENAS	CC (%)	CD (%)	CF (%)	CH (%)	TIV (V/C)
A	8 (12.3%)	7	8	2	40	11
B	3 (4.61%)	8	40	4	40	19
C	6 (9.23%)	7	8	4	16	6
D	2 (3.07)	10	24	6	8	3
E	31 (47.69%)	10	24	6	40	2
F	14 (21.53%)	9	32	4	24	10
G	1(1.53%)	6	40	2	24	25

C C: Condición de la colmena, CD: Comportamiento defensivo, CF: Comportamiento forrajero, CH: Comportamiento higiénico, TIV: Tasa de infestación de *Varroa* V/C: varroas por colmena

Finalmente no se encontraron diferencias ($p \geq 0.05$) entre los comportamientos fenotípicos en relación con los apiarios.

Tabla 12. Media de las variables estudiadas entre apiarios.

Apiario	CC (10%)	CD (40%)	CF (10%)	CH (40%)	TIV (VC)
1	8.7±0.5 a	32.0 ±2.9 a	6.0±0.51 a	25.3±1.3 a	4.9±2.0 a
2	8.3±0.4 a	21.6±2.1 a	5.6±0.62 a	32.4±1.6 a	7.1±1.4 a
3	8.4±0.2 a	23.0±2.3 a	4.8±0.44 a	31.5±3 a	6.5±1.3 a
4	8.0±0.3 a	25.4±3.2 a	4.3±0.52 a	34.1±1.8 a	5.3±2.0 a
5	7.7±0.4 a	19.7±2.3 a	4.0±0.27 a	35.2±1.3 a	5.2±51.2 a

C C: Condición de la colmena, CD: Comportamiento defensivo, CF: Comportamiento forrajero, CH: Comportamiento higiénico, TIV: Tasa de infestación de *Varroa* V/C: varroas por colmena, **a, b** Literales diferentes por columna indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

Mediante la correlación de Pearson se encontró una correlación negativa ($p \leq 0.05$) entre el CH y la presencia de *Varroa*. Por otro lado no encontramos correlación entre el CH y el CD sucediendo lo mismo con el CF y el CD ($p \geq 0.05$).

Discusión

En diferentes investigaciones en México se han encontrado porcentajes altos del morfotipo africano con valores que van de 91.49% en Mexicali, 67.65% en Ensenada (Alaniz-Gutiérrez *et al.*, 2016), 44.0% en Baja California (Zamora *et al.*, 2008), 42.4% en regiones del norte de México (Medina Flores *et al.*, 2015), así mismo, se observó que en Zacatecas existe una frecuencia similar de morfotipos africanos de un 22.5% y en Baja California Sur de 21.0% (Rubio *et al.*, 2003a), en este sentido, se ha observado que ha incrementado el proceso de introgresión de genes africanizados en las poblaciones de abejas en el país.

En este estudio se encontró la presencia del morfotipo híbrido lo que provocó que el 13.4% de la población evaluada presentara una alta agresividad, 23.9% agresividad, 28.3% mediana agresividad, 29.8% docilidad y únicamente el 8.9% presentó una alta docilidad, en este sentido creemos que hay un alto índice de introgresión del morfotipo africano lo que pudo ser por vía paterna, principalmente a través del apareamiento entre reinas vírgenes y zánganos de origen africano producidos por colonias silvestres (Clarke *et al.*, 2002). Este proceso de africanización de las colonias explica por qué en esta investigación se clasificaron más colonias híbridas por medio del análisis morfométrico. En contraste, este trabajo es comparado con otros trabajos realizados en Yucatán y Tabasco (Contreras-Ramírez *et al.*, 2016, Esquivel Rojas *et al.* 2015), donde observaron que menos del 50% de las colonias evaluadas presentaron bajo CD. En este mismo sentido, Salamanca Grosso, (2009) encontró en Medellín, Colombia y Rojas *et al.* (2015) en Güemes, Tamaulipas resultados similares a los que se reporta en este trabajo.

La africanización en los apiarios estudiados tiene consecuencias directas en la productividad, debido a que los apicultores abandonan la actividad o reducen su número de colmenas por la dificultad para encontrar sitios apropiados para ubicar sus apiarios, además que tener abejas agresivas aumenta los costos de producción porque obliga a los apicultores a ubicar sus apiarios en sitios más remotos, con el consecuente aumento en los costos de transportación y de mano de obra, en este sentido Rubio *et al.* (2003b) indican que los costos también aumentan por concepto del uso de equipo de protección adicional. Sin duda, el comportamiento altamente defensivo es la característica más indeseable de las abejas africanizadas.

Los principales mecanismos primarios de la resistencia de las abejas melíferas ante ciertas enfermedades de origen bacteriano, parasitario y fúngico es el denominado comportamiento higiénico (Rothenbuhler, 1964), el cual se puede definir como la habilidad que tienen las abejas obreras para detectar, desopercular y remover las crías enfermas desde la cámara de cría hacia el exterior de la colmena (Gilliam *et al.*, 1983), en esta investigación se observó que el 41.8% de las colmenas evaluadas presentaron alta higiene, 29.8% higiene, 23.9% mediana higiene, 1.5% regular higiene y el 3% baja higiene, es decir, que las abejas predominantes en la región presentan un comportamiento higiénico considerable en comparación con un estudio realizado en Venezuela con colmenas africanas donde encontraron que el 17.0% de las colonias presentaron una leve manifestación del CH con valores promedio menores al 75.0%, mientras que el 24.0% de las colonias presentaron un CH moderado con una tasa de remoción de pupas muertas entre 75.0 y 95.0 % Principal *et al.* (2008).

El bajo CF de las colmenas se vio reflejado en la baja productividad de las colmenas, lo que pudo ser afectado por la CC ya que el 68.0% de la población presentaron una CC regular es decir que tenían entre 4 y 7 bastidores; otro factor que pudo influir en el desarrollo de las colmenas fue la presencia de parásitos, ya que el 97.2% de las colmenas tuvieron la presencia de *Varroa*, estos resultados se contraponen a los obtenidos por Cobey *et al.* (2012), por lo que menciona que ha mayores valores en el comportamiento higiénico reducen la incidencia de enfermedades, sin embargo, en esta investigación a pesar que se encontró que únicamente el 3.0% de las colmenas con un bajo CH se encontró una alta presencia de *Varroa*. En este sentido consideramos que la baja productividad se debió a factores externos como el mal manejo de las colmenas y la alta presencia de patógenos se debió al intercambio de bastidores infestados de una colmena a otra o de un apiario a otro.

A pesar que se ha sugerido que la resistencia a enfermedades y el CD son aspectos del vigor básico de las abejas las cuales podrían estar correlacionados (Collins y Rinderer, 1991), en nuestra investigación no encontramos correlación entre el CD y los niveles de infestación de *Varroa*, del mismo modo, no se encontró una correlación entre el CD y el CH concordando con los resultados obtenidos por Andere *et al.* (2011) y diferentes a los encontrados por Rothenbuhler (1964) donde observó que la línea Brown utilizada por él para los estudios

iniciales de CH presentaba una mayor CD, sin embargo, en cuanto la correlación entre el CD y CF coincidimos con los resultados obtenidos por Rubio *et al.* (2002) donde no encontraron ninguna relación entre el CD y la producción de miel.

En base a lo anterior la selección fenotípica nos proporciona fuertes evidencias de que la identificación de poblaciones de abejas mediante características higiénicas, defensivas, forrajeras y con resistencia a enfermedades, incrementa la posibilidad de encontrar ecotipos mejor adaptados a los diferentes ambientes donde se desarrollan, posibilitando así la formación de colmenas con características deseadas mediante retrocruzamientos, por lo que se pudiera reducir la introgresión de genotipos poco deseados, de este modo se puede contribuir a la disminución del CF y al aumento del CH, lo que mejoraría las condiciones de las colmenas, lo que se pudiera reflejar en el incremento de la producción de miel de las poblaciones de abejas.

Conclusión

Se determinó que el morfotipo híbrido es el predominante en los apiarios de estudio, se encontraron 7 fenotipos, por lo que consideramos que el morfotipo E es el más adecuado para la selección ya que presenta un bajo porcentaje de CD, una un alto CH y una baja tasa de infestación de *Varroa*.

Referencias

- Agropecuarias, C. 2010. Situación actual y perspectivas de la apicultura en México, 199. *recurso electrónico* www.infoasercar.gob.mx/claridades/revistas/199/ca199-3.pdf consultado el, 14, 3-34.
- Alaniz-Gutiérrez, L., Torres-Salado, N., Ail-Catzim, C. E. and Velazco-López, J. L. 2016. Frecuencia de morfotipos africanizados y europeos de *Apis mellifera* en Ensenada y Mexicali, Baja California. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3, 421-426.
- Andere, C. I., Monteavaro, C., Palacio, M. A., Catena, M., Rodríguez, E. M. and Collins, A. M. 2011. *Apis mellifera* semen: bacterial contamination and susceptibility to antibiotics. *Apidologie*, 42, 551-559.

- Cobey, S., Sheppard, W. S. and Tarpy, D. R. 2012. Status of breeding practices and genetic diversity in domestic US honey bees. *Honey bee colony health: challenges and sustainable solutions*. CRC Press, Boca Raton, 25-36.
- Collins, A. M. 2004. Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *Journal of apicultural research*, 43, 167-171.
- Collins, A. M. and Kubasek, K. J. 1982. Field test of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony defensive behavior. *Annals of the Entomological Society of America*, 75, 383-387.
- Corbella, E. and Guerrero, A. 1992. Recambio de abejas reina: organización y manejo de un apiario de fecundación e introducción de reinas fecundadas. *INIA Boletín de Divulgación*.
- De Jong, D., De Jong, P. and Goncalves, L. 1982. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21, 165-167.
- Fernández-Eguiarte, A., Zavala-Hidalgo, J. and Romero-Centeno, R. 2010. Atlas climático digital de México. *Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM*. Available online: <http://atlasclimatico.unam.mx/atlas/kml>.
- Guzmán-Novoa, E., Benítez, A. C., Montañón, L. G. E. and Novoa, G. G. 2013. Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México Colonization, impact and control of Africanized honey bees in Mexico. *Veterinaria México*, 44, 149-178.
- Javier, C. D. A. F. J. and Euán, Q. 2011. Las abejas reinas en los sistemas apícolas.
- Medina Flores, C. A., Guzmán Novoa, E., Hamiduzzaman, M., Aguilera Soto, J., Carlos, L. and Marco, A. 2015. Africanización de colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en tres regiones climáticas del norte de México. *Veterinaria México OA*, 2, 1-9.
- Page Jr, R. E. and Peng, C. Y.-S. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*, 36, 695-711.
- Principal, J., Barrios, C. J., Puzzar, S., García De La Rosa, S. B. and Fuselli, S. R. 2008. Comportamiento higiénico de las abejas africanizadas (*Apis mellifera scutellata* Lepeletier) en apiarios del estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 26, 167-173.

Rosero, T. and David, S. 2006. *Selección de colmenas según características de alta producción de miel en los departamentos de Copán, El Paraíso, La Paz y Ocotepeque*. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012.

Rothenbuhler, W. C. 1964. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F 1 and backcross generations to disease-killed brood. *American Zoologist*, 4, 111-123.

Rubio, J. L. U., Guzmán Novoa, E., Hunt, G. J., Benítez, A. C. and Rubio, J. A. Z. 2003a. Efecto de la africanización sobre la producción de miel, comportamiento defensivo y tamaño de las abejas melíferas (*Apis mellifera L.*) en el altiplano mexicano. *Veterinaria México*, 34, 47-59.

Rubio, J. L. U., Guzmán Novoa, E., Hunt, G. J., Benítez, A. C. and Rubio, J. A. Z. 2003b. The effect of africanization on honey production, defensive behavior and size of honeybees (*Apis mellifera L.*) in the mexican high plateau. *Veterinaria Mexico*, 34, 47-59.

Schuster, I. and Cruz, C. D. 2004. *Estadística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados*, Universidad Federal de Viçosa.

Smith, D. R. 1991. Mitochondrial DNA and honey bee biogeography. *Diversity in the genus Apis*, 131-176.

Sylvester, H. and Rinderer, T. 1987. Fast Africanized bee identification system (FABIS) manual. *American bee journal (USA)*.

Zamora, O., Dominguez, R., Alaniz-Gutierrez, L. and Quezada-Euán, J. J. G. 2008. Frequency of european and african-derived morphotypes and haplotypes in colonies of honey bees (*Apis mellifera*) from NW México. *Apidologie*, 39, 388-396.

3. CONCLUSIONES

Se concluye que en las colmenas destinadas para la formación de núcleos de fecundación tienen mayor presencia de varroasis y nosemosis en invierno encontrándose en los rangos obtenidos en colmenas destinadas para la producción de miel se encontró una correlación positiva entre *Varroa* y *Nosema* por lo que se observó un incremento de la nosemosis en presencia de *Varroa* y la acariosis se consideró como una enfermedad exótica en la región de estudio. En cuanto a los varroas se determinó que el 100% de los ácaros evaluados pertenecen a la especie *V. destructor*. Se encontraron 8 morfotipos de claramente diferenciados, lo que nos permitió comprender la variabilidad morfométrica intraespecífica de *V. destructor* en poblaciones de *A. mellifera* geográficamente relacionadas. Se observó una plasticidad positiva correlacionada entre el acaricida y la disminución del largo del escudo genital, entonces la plasticidad post tratamiento es resultado de la adaptación debida a la presión de selección impuesta por el acaricida, teniendo indicios de que el acaro se adapta mediante su variabilidad morfológica a las condiciones adversas para su sobrevivencia y a las colonias de abejas que parasitan. El uso de timol fue eficaz contra la presencia de *Varroa*, aunque no contra la de *Nosema*; esta última se vio incrementada probablemente debido a la disminución de *Varroa*. El aumento de *Nosema* no fue en números suficientes para desarrollar la enfermedad clínica por lo que no influyó de forma negativa en el peso abdominal de las abejas. Respecto a la selección se determinó que existe una variación fenotípica en las poblaciones evaluadas, por lo que se encontraron 7 fenotipos, por lo que consideramos que el morfotipo E es el más adecuado para la selección ya que presentó un bajo porcentaje de CD, un alto CH y una baja tasa de infestación de *Varroa*.

4. REFERENCIAS

- Adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P. & Herrera, A. 2005. Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-*Varroa* treatments. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 10085-10090.
- ADINSOFT, S. 2010. XLSTAT-software, version 10. Addinsoft, Paris, France.
- AGARWAL, A., VIRK, G., ONG, C. & DU PLESSIS, S. S. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, 32, 1-17.
- AGROPECUARIAS, C. 2010. Situación actual y perspectivas de la apicultura en México, 199. recurso electrónico www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/199/ca199-3.pdf consultado el, 14, 3-34.
- Akimov, I. A., Benedyk, S. V. & Zaloznaya, L. M. 2004. Complex analysis of morphological characters of Gamasid mite *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidae).
- Akinwande, K. L., Badejo, M. A. & Ogbogu, S. S. 2012. Incidence of the Korean haplotype of *Varroa destructor* in southwest Nigeria. *Journal of Apicultural Research*, 51, 369-370.
- Alaniz-Gutiérrez, L., Torres-Salado, N., Ail-Catzim, C. E. & Velazco-López, J. L. 2016. Frecuencia de morfotipos africanizados y europeos de *Apis mellifera* en Ensenada y Mexicali, Baja California. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3, 421-426.
- Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L. P. & Le Conte, Y. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 12, 774-782.
- Allen, M. & Ball, B. 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee world*, 77, 141-162.
- Andere, C. I., Monteavaro, C., Palacio, M. A., Catena, M., Rodríguez, E. M. & Collins, A. M. 2011. *Apis mellifera* semen: bacterial contamination and susceptibility to antibiotics. *Apidologie*, 42, 551-559.

- Anderson, D. & Trueman, J. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & applied acarology*, 24, 165-189.
- Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Nuru, A., Khan, K. A. & Alattal, Y. 2017. Geographical distribution and molecular detection of *Nosema ceranae* from indigenous honey bees of Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 24, 983-991.
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. & Higes, M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol*, 11, 2284-90.
- Aude, K. E., Armand, P., Francois, A., Charlemagne, G., Georg, G., Manuelle, T. & Lamine, B.-M. 2016. Morphometric characterization of parasite *Varroa* sp. of bee *Apis mellifera* L. in Benin. *European Scientific Journal*, ESJ, 12.
- Badejo, M., Ogbogu, S. & Akinwande, K. L. 2013. Morphometrics and parasitic load of *Varroa* mites (acari: varroidae) on colonies of *Apis mellifera adansonii* (Hymenoptera: apidae) in south western nigeria. *Acarina. Русский акарологический журнал*, 21, 17-26.
- Bailey, L. & Ball, B. V. 1991. *Honey Bee Pathology*. London: Academic Press, 193.
- Ball, B. & Bailey, L. 1991. Viruses of honey bees. *Atlas of Invertebrate Viruses*, 525-551.
- Benavides, F. G., Arraez, V., Nolasco, A., Jiménez, L., Bordes, P. & Bolumar, F. 1987. Diagnóstico estándar para validar las causas de muerte certificadas. *Gaceta Sanitaria*, 1, 12-15.
- Bilodeau, A. L., Waldbieser, G. C., Terhune, J. S., Wise, D. J. & Wolters, W. R. 2003. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay of the Bacterium *Edwardsiella ictaluri* in Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15, 80-86.
- Boom, R., Sol, C., Salimans, M., Jansen, C., Wertheim-Van Dillen, P. & Van Der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, 28, 495-503.
- Borsuk, G., Olszewski, K., Strachecka, A., Paleolog, J. & Kasperek, K. 2012. Genetic and morphometric variation of the *Varroa destructor* developing in standard and small comb cells. *Vet. Med.–Science and Practice*, 68, 599-602.

- Boudagga, H., Barbouche, N., Laârif, A. & Hamouda, M. H. B. 2003. Morphological identification of the *Varroa* species (Acari: Varroidae) colonizing Tunisian apiaries. *Systematic and Applied Acarology*, 8, 97-100.
- Bourgeois, A. L., Rinderer, T. E., Beaman, L. D. & Danka, R. G. 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *J Invertebr Pathol*, 103, 53-8.
- Bravo-Grau, S. & Cruz, J. P. 2015. Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista chilena de radiología*, 21, 158-164.
- Bridges, C. M. & Semlitsch, R. D. 2001. Genetic variation in insecticide tolerance in a population of southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*): implications for amphibian conservation. *Copeia*, 2001, 7-13.
- BULACIO CAGNOLO, N., BASUALDO, M. & EGUARAS, M. 2010. Actividad Varroocida del timol en colonias de *Apis mellifera* L. de la provincia de Santa Fe. *InVet*, 12, 85-90.
- Cabello López, J. B. & Pozo Rodríguez, F. 1997. Métodos de investigación en cardiología clínica (X) Estudios de evaluación de las pruebas diagnósticas en cardiología. *Revista Española de Cardiología*, 50, 507-519.
- Cantwell, G. 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *Amer Bee J*.
- Carletto, J., Blanchard, P., Gauthier, A., Schurr, F., Chauzat, M.-P. & Ribière, M. 2013. Improving molecular discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of invertebrate pathology*, 113, 52-55.
- Carroll, S. P., Hendry, A. P., Reznick, D. N. & Fox, C. W. 2007. Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology*, 21, 387-393.
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B. & Pettis, J. S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of invertebrate pathology*, 97, 186-188.
- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M. & Pettis, J. S. 2009a. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J Invertebr Pathol*, 101, 204-9.

- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D. & Pettis, J. S. 2009b. Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera* L. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56, 142-147.
- Cobey, S., Sheppard, W. S. & Tarpy, D. R. 2012. Status of breeding practices and genetic diversity in domestic US honey bees. *Honey bee colony health: challenges and sustainable solutions*. CRC Press, Boca Raton, 25-36.
- Cobey, S. W. 2007. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38, 390-410.
- Cobey, S. W., Tarpy, D. R. & Woyke, J. 2013. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1-18.
- Collins, A. M. 2000. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie*, 31, 421-429.
- Collins, A. M. 2004. Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *Journal of apicultural research*, 43, 167-171.
- Collins, A. M. & Kubasek, K. J. 1982. Field test of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony defensive behavior. *Annals of the Entomological Society of America*, 75, 383-387.
- Copley, T., Chen, H., Giovenazzo, P., Houle, E. & Jabaji, S. 2012. Prevalence and seasonality of *Nosema* species in Québec honey bees. *The Canadian Entomologist*, 144, 577-588.
- Corbella, E. & Guerrero, A. 1992. Recambio de abejas reina: organización y manejo de un apiario de fecundación e introducción de reinas fecundadas. *INIA Boletín de Divulgación*.
- Costa, C., Lodesani, M. & Maistrello, L. 2010. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie*, 41, 141-150.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M. & Geiser, D. M. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318, 283-287.

- Crockett, E. L. 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *American Zoologist*, 38, 291-304.
- Dadgostar, S. & Nozari, J. 2018. Classical and geometric morphometric methods reveal differences between specimens of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) from seven provinces of Iran. *Persian Journal of Acarology*, 1.
- De Guzman, L. & Delfinado-Baker, M. 1996. A new species of *Varroa* (Acari: Varroidae) associated with *Apis koschevnikovi* (Apidae: Hymenoptera) in Borneo. *International Journal of Acarology*, 22, 23-27.
- De Jong, D., De Jong, P. & Goncalves, L. 1982. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21, 165-167.
- De Miranda, J. R., Cordoni, G. & Budge, G. 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol*, 103 Suppl 1, S30-47.
- Delfinado-Baker, M. & Aggarwal, K. 1987. A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). *International Journal of Acarology*, 13, 233-237.
- Delfinado-Baker, M. & Houck, M. 1989. Geographic variation in *Varroa jacobsoni* (Acari, Varroidae): application of multivariate morphometric techniques. *Apidologie*, 20, 345-358.
- Donis, J. H. 2012. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Avances en biomedicina*, 1, 73-81.
- Duay, P., De Jong, D. & Engels, W. 2003. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 34, 61-65.
- Emsen, B., Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Eccles, L., Lacey, B., Ruiz-Pérez, R. A. & Nasr, M. 2016. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitology research*, 115, 175-181.
- Espinosa-Montaña, L. G. & Guzmán-Novoa, E. 2007a. Effectiveness of two natural miticides, formic acid and thymol, for control of the mite *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.) in Villa Guerrero, Mexico. *Veterinaria Mexico*, 38, 9-19.

- Espinosa-Montaña, L. G. & Guzmán-Novoa, E. 2007b. Eficacia de dos acaricidas naturales, ácido fórmico y timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* de las abejas (*Apis mellifera* L.) en Villa Guerrero, Estado de México, México. *Vet. Méx*, 38.
- Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R. & Del Aguila, C. 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl Environ Microbiol*, 75, 6886-9.
- Fernández-Eguiarte, A., Zavala-Hidalgo, J. & Romero-Centeno, R. 2010. Atlas climático digital de México. Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM. Available online: <http://atlasclimatico.unam.mx/atlas/kml>.
- Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V. L. & Angioni, A. 2004. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. *Journal of economic entomology*, 97, 187-191.
- Formato, G., Menegotto, A. & Jannoni-Sebastianini, R. 2016. Enfermedades de las abejas: Nosemosis [Online]. <http://teca.fao.org/es/read/8682>. [Accessed 01/02/2018 2018].
- Forsgren, E. & Fries, I. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet Parasitol*, 170, 212-7.
- Fries, I. 1997. Protozoa. In: Morse, R.A. Flottum K (eds) *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, 3rd ed. A.I. Root Company, 57–76.
- Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*, 103, S73-S79.
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B. & Pieniasek, N. J. 1996a. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, *Nosematidae*), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32, 356-365.
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B. & Pieniasek, N. J. 1996b. *Nosema ceranae* n.sp. (Microspora, *Nosematidae*), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *E. Journal of Protist*, 32, 356–365.

- Fries, I., Martin, R., Meana, A., Garcia-Palencia, P. & Higes, M. 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45, 230-233.
- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Böhler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W. & Gisder, S. 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41, 332-352.
- George-Nascimento, M., Munoz, G., Marquet, P. A. & Poulin, R. 2004. Testing the energetic equivalence rule with helminth endoparasites of vertebrates. *Ecology Letters*, 7, 527-531.
- Giménez Martínez, P., Mendoza, Y., Invenizzi, C., Fuselli, S., Alonso Salces, R., Fernández Iriarte, P. & Maggi, M. 2017. Morphometric correlation between *Apis mellifera* morphotypes (Hymenoptera) and *Varroa destructor* (Acari) from Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 56, 122-129.
- Gisder, S., Mockel, N., Linde, A. & Genersch, E. 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ Microbiol*, 13, 404-13.
- Guzmán-Novoa, E., Benítez, A. C., Montaña, L. G. E. & Novoa, G. G. 2013. Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México Colonization, impact and control of Africanized honey bees in Mexico. *Veterinaria México*, 44, 149-178.
- Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Arechavaleta-Velasco, M. E., Koleoglu, G., Valizadeh, P. & Correa-Benítez, A. 2011. *Nosema ceranae* has parasitized Africanized honey bees in Mexico since at least 2004. *Journal of Apicultural Research*, 50, 167-169.
- Harbo, J. R. 1983. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196 C). *Annals of the Entomological Society of America*, 76, 890-891.
- Härtel, S., Diehl, H. A. & Ojeda, F. 1998. Methyl- β -cyclodextrins and liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. *Analytical biochemistry*, 258, 277-284.

- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Garcia-Palencia, P. & Meana, A. 2008. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J Invertebr Pathol*, 97, 76-8.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R. & Meana, A. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41, 375 –392.
- Higes, M., Martin, R. & Meana, A. 2006a. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol*, 92, 93-5.
- Higes, M., Martín, R. & Meana, A. 2006b. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology*, 92, 93-95.
- Higes, M., Nozal, M. J., Alvaro, A., Barrios, L., Meana, A., Martín-Hernández, R., Bernal, J. L. & Bernal, J. 2011. The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie*, 42, 364-377.
- Holt, W., Bennett, P., Volobouev, V. & Watwon, P. 1996. Genetic resource banks in wildlife conservation. *Journal of Zoology*, 238, 531-544.
- HOPKINS, B. K. & HERR, C. 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*, 41, 548-556.
- Hopkins, B. K., Herr, C. & Sheppard, W. S. 2012. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 1079-1083.
- Hornitzky, M. 2008. *Nosema* Disease. RIRDC Publication No 08/006. RIRDC Project No DAN-228^a.
- Imdorf, A., Bogdanov, S., Kilchenmann, V. & Maquelin, C. 1995. Apilife VAR: a new varroacide with thymol as the main ingredient. *Bee World*, 76, 77-83.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G. & Mendoza, Y. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of invertebrate pathology*, 101, 150-153.

- Javier, C. D. A. F. J. & Euán, Q. 2011. Las abejas reinas en los sistemas apícolas.
- Juven, B., Kanner, J., Schved, F. & Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology*, 76, 626-631.
- Kanga, L. H. B., Jones, W. A. & James, R. R. 2003. Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of economic entomology*, 96, 1091-1099.
- Kelomey, E., Paraiso, A., Azonwade, F., Gbemavo, C., Goergen, G., Tamo, M. & Baba-Moussa, L. 2016. Morphometric characterization of parasite *Varroa* sp. of bee *Apis mellifera* L. in Benin.
- Khan, J., Tahir, M., Khalid, A., Sattar, A. & Ahmad, N. 2017. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on cryosurvival of dog spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 265-268.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M. & Kryger, P. 2007a. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate pathology*, 96, 1-10.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I. & Paxton, R. J. 2007b. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*, 96, 1-10.
- Klein, U., Gimpl, G. & Fahrenholz, F. 1995. Alteration of the Myometrial Plasma Membrane Cholesterol Content with beta.-Cyclodextrin Modulates the Binding Affinity of the Oxytocin Receptor. *Biochemistry*, 34, 13784-13793.
- Kralj, J. & Fuchs, S. 2006. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*, 37, 577-587.
- Krantz, G. 1978. A manual of acarology. –Oregon State University Book Store. Inc. Corvallis, 509.

- Kurkela, S. & Brown, D. W. G. 2009. Molecular diagnostic techniques. *Medicine*, 37, 535–540.
- Laidlaw, H. & Lorenzen, C. 1977. Laidlaw instrumental insemination instrument [Queen honey bees]. *American Bee Journal* (USA).
- Le Conte, Y., Ellis, M. & Ritter, W. 2010. *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41, 353-363.
- Lebuhn, G., Droege, S., Connor, E. F., Gemmill-Herren, B., Potts, S. G., Minckley, R. L., Griswold, T., Jean, R., Kula, E. & Roubik, D. W. 2013. Detecting insect pollinator declines on regional and global scales. *Conservation Biology*, 27, 113-120.
- Llorente, J., Higes, M. & Suárez, M. Tratamientos con productos naturales contra *Varroa jacobsonii*. Estudio comparativo de varios compuestos: timol, mentol, alcanfor. Actas del II Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica, Pamplona, 1996.
- López, E., Acosta, N., González, N., Fernández, M., Ferreira, E. & Rojas De Arias, A. 2002. Diferencias morfométricas en poblaciones de *Triatoma infestans* provenientes de las regiones Oriental y Occidental del Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 1, 51-57.
- Maggi, M. D., Sardella, N. H., Ruffinengo, S. R. & Eguaras, M. J. 2009. Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitology research*, 105, 1629.
- Mahmoud, A. L. 1999. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants. *Letters in applied microbiology*, 29, 334-336.
- Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G., Caldon, M., Mutinelli, F. & Granato, A. 2008. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 39, 436-445.
- Marín Jiménez, E. 2008. Inferencia exacta y asintótica para parámetros de tests diagnósticos discretos en presencia de verificación parcial.

- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E. & Higes, M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol*, 73, 6331-8.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E. & Higes, M. 2007a. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 6331-6338.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E. & Higes, M. 2007b. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6331-6338.
- Martin, P. 2003. Veterinary drug residues in honey. *Apiacta*, 38, 21-23.
- Medina Flores, C. A., Guzmán Novoa, E., Hamiduzzaman, M., Aguilera Soto, J., Carlos, L. & Marco, A. 2015. Africanización de colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en tres regiones climáticas del norte de México. *Veterinaria México OA*, 2, 1-9.
- Montano, L. & Guzman-Novoa, E. 2007. Effectiveness of two natural miticides, formic acid and thymol, for control of the mite *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.) in Villa Guerrero, Mexico. *Veterinaria Mexico*, 38, 9.
- Nur, Z., Seven-Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C. I., Sağırkaya, H. & Soylu, M. K. 2012. The use of the hypo-osmotic swelling te
- OIE. 2013. Nosemosis de las abejas melíferas [Online]. [Accessed 2013 2018].
- Oliveira, E. E., Guedes, R. N. C., Totola, M. R. & De Marco Jr, P. 2007. Competition between insecticide-susceptible and-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Chemosphere*, 69, 17-24.
- Oudemans, A. C. 1904. On a new genus and species of parasitic acari. Notes from the Leyden Museum, 24, 216-222.
- Page Jr, R. E. & Peng, C. Y.-S. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*, 36, 695-711.

- Papini, R., Mancianti, F., Canovai, R., Cosci, F., Rocchigiani, G., Benelli, G. & Canale, A. 2017. Prevalence of the microsporidian *Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) apiaries in Central Italy. Saudi journal of biological sciences, 24, 979-982.
- Peldoza, J. 2002. Sanidad apícola Nosemosis. Curso de producción apícola. Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? Trends in Ecology & Evolution, 20, 481-486.
- PNUMA, O. 2011. Tercer informe de evaluación: Cambio climático 2001. Impactos, adaptación y vulnerabilidad. Resumen para responsables de políticas y Resumen técnico. Disponible en: <http://www.ipcc.ch/pdf/climate-changes-2001/impact-adaptationvulnerability/impact-spm-ts-sp.pdf>. Acceso en, 15.
- Principal, J., Barrios, C. J., Puzzar, S., García De La Rosa, S. B. & Fuselli, S. R. 2008. Comportamiento higiénico de las abejas africanizadas (*Apis mellífera scutellata Lepeletier*) en apiarios del estado Lara, Venezuela. Zootecnia Tropical, 26, 167-173.
- Ramsey, S. vanEngelsdorp D. *Varroa destructor* feed primarily on honeybee fat body not haemolymph. Proceedings of the American Bee Research Conference, 2017. 13-15.
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G. & De Graaf, D. C. 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. PLoS One, 8, e72443.
- RICE, R. N. 2001. BARTON ACT 2600 PO Box 4776 KINGSTON ACT 2604. 551-593.
- Rosero, T. & David, S. 2006. Selección de colmenas según características de alta producción de miel en los departamentos de Copán, El Paraíso, La Paz y Ocotepeque. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012.
- Rothenbuhler, W. C. 1964. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F 1 and backcross generations to disease-killed brood. American Zoologist, 4, 111-123.

- Rubio, J. L. U., Guzmán Novoa, E., Hunt, G. J., Benítez, A. C. & Rubio, J. A. Z. 2003a. Efecto de la africanización sobre la producción de miel, comportamiento defensivo y tamaño de las abejas melíferas (*Apis mellifera L.*) en el altiplano mexicano. *Veterinaria México*, 34, 47-59.
- Rubio, J. L. U., Guzmán Novoa, E., Hunt, G. J., Benítez, A. C. & Rubio, J. A. Z. 2003b. The effect of africanization on honey production, defensive behavior and size of honeybees (*Apis mellifera L.*) in the mexican high plateau. *Veterinaria Mexico*, 34, 47-59.
- Sangrador, C. O., De Dios, J. G. & Álvarez, J. C. B. 2007. Evaluación de artículos científicos sobre pruebas diagnósticas. *Evidencias en pediatría*, 3, 24.
- Schuster, I. & Cruz, C. D. 2004. Estadística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados, Universidad Federal de Viçosa.
- Smith, D. R. 1991. Mitochondrial DNA and honey bee biogeography. *Diversity in the genus Apis*, 131-176.
- SPSS, I. 2011. IBM SPSS statistics for Windows, version 20.0. New York: IBM Corp, 440.
- Stankus, T. 2008. A review and bibliography of the literature of honey bee Colony Collapse Disorder: a poorly understood epidemic that clearly threatens the successful pollination of billions of dollars of crops in America. *Journal of Agricultural & Food Information*, 9, 115-143.
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., Savignone, C. A. & Stornelli, M. A. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*, 25.
- Sylvester, H. & Rinderer, T. 1987. Fast Africanized bee identification system (FABIS) manual. *American bee journal (USA)*.
- UNIÓN EUROPEA, N. 2007. Reglamento de la Unión Europea (CE) No. 834/2007 sobre la producción y etiquetado de los productos ecológicos. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Van Den Heever, J. P., Thompson, T. S., Otto, S. J., Curtis, J. M., Ibrahim, A. & Pernal, S. F. 2016. Evaluation of Fumagilin-B® and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie*, 47, 617-630.

- Taylor, M., Guzman-Novoa, E., Morfin, N. & Buhr, M. 2009. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72, 149-159.
- Viollon, C. & Chaumont, J.-P. 1994. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 128, 151-153.
- Wallner, K. 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30, 235-248.
- Williams, B. A. 2009. Unique physiology of host–parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular microbiology*, 11, 1551-1560.
- Williams, G. R., Shafer, A. B. A., Rogers, R. E. L., Shutler, D. & Stewart, D. T. 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 189-192.
- Williams, G. R., Shutler, D., Burgher-Maclellan, K. L. & Rogers, R. E. 2014. Infra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS One*, 9, e99465.
- Wu, R., Ma, C.-X., Lou, X.-Y. & Casella, G. 2003. Molecular dissection of allometry, ontogeny, and plasticity: a genomic view of developmental biology. *AIBS Bulletin*, 53, 1041-1047.
- Yan, D., Tang, K. F. & Lightner, D. V. 2009. Development of a real-time PCR assay for detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *J Invertebr Pathol*, 102, 97-100.
- Yarahmadi, F., Moassadegh, M., Soleymannejadian, E., Saber, M. & Shishehbor, P. 2009. Assessment of acute toxicity of abamectin, spinosad and chlorpyrifos to *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) on sweet pepper by using two bioassay techniques. *Asian Journal of Biological Sciences*, 2, 81-87.
- Zamora, O., Dominguez, R., Alaniz-Gutierrez, L. & Quezada-Euán, J. J. G. 2008. Frequency of european and african-derived morphotypes and haplotypes in colonies of honey bees (*Apis mellifera*) from NW México. *Apidologie*, 39, 388-396.
- Zander, E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Munchener Bienenzeitung*, 31, 196–204.

Zhang, Z.-Q. 2000. Notes on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) parasitic on honeybees in New Zealand. Systematic and Applied Acarology Special Publications, 5, 9-14.