



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD -

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

## ÁCIDOS ABSCÍSICO Y P-CUMÁRICO COMO SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS Y ESTIMULANTES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO DE ABEJAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*)

ELISSA CHÁVEZ HERNÁNDEZ

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: Ácidos abscísico y p-cumárico como suplementos alimenticios y estimulantes del sistema inmunológico de *Apis mellifera scutellata*, realizada por la alumna: Elissa Chávez Hernández bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD -  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR



CONSEJERO

---

Dr. Gabriel Otero Colina



ASESORA

---

Dra. María Celina M. Llanderal Cázares



ASESOR

---

Dr. Matías Daniel Maggi

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2021

# ÁCIDOS ABSCÍSICO Y P-CUMÁRICO COMO SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS Y ESTIMULANTES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO DE ABEJAS AFRICANIZADAS

(*Apis mellifera*)

Elissa Chávez Hernández, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2021

## RESUMEN

El apicultor, para mantener la colmena y estimularla antes de que inicie la temporada de floración, le administra jarabe de alta fructosa o jarabe de azúcar, que únicamente contienen carbohidratos. El jarabe, comparado con la miel, es una sustancia pobre para la abeja ya que sólo aporta energía, aunque con ella se logra un estímulo para incrementar la postura de la reina o para evitar que la colonia sufra hambruna. Existen también suplementos proteicos que ayudan a mantener la colmena aportándole proteínas, ácidos grasos y vitaminas necesarios para su mantenimiento de la colmena en época de escasez. En colonias de abejas determinadas por técnicas morfométrica y molecular como *Apis mellifera scutellata* haplotipo A1, se administraron como suplemento alimenticio mezclados con jarabe de azúcar el metabolito ácido p-cumárico (CUM), importante por sus efectos antioxidantes, y ácido abscísico (ABA), que promueve respuestas de inmunidad innata en abejas, así como la combinación de estas sustancias (ABACUM), y jarabe como testigo. A lo largo de tres meses, se contó el número de celdas con cría y reservas de miel y polen, la concentración de hemocitos en abejas obreras y se monitorearon los principales parásitos de las abejas en México: *Varroa destructor* y *Nosema ceranae*. Se postula que ABA y CUM no tienen efecto en la ovipostura de la reina, manifestada como número de celdas con cría, al menos en las dosis que se manejaron pues con la administración de jarabe, tratamiento testigo, no se observaron diferencias significativas respecto a los otros tratamientos; sin embargo, sí hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo en la suma de las variables cría abierta y cerrada ( $p < 0.0001$ ) y en la variable reservas de alimento ( $p < 0.0001$ ). Con respecto al monitoreo de *V. destructor* durante la administración de ABA y CUM y la mezcla de ambos metabolitos, no hubo diferencias significativas a lo largo del trabajo;

sin embargo, los núcleos lograron desarrollarse, lo que se explica por el tipo de abejas (africanizadas), ya que se ha comprobado la tolerancia que tienen contra este ácaro. No se observaron diferencias significativas en los parámetros para evaluar la infección por *N. ceranae* (intensidad, prevalencia y abundancia); sin embargo, sí hubo diferencia significativa a través del tiempo: intensidad ( $p < 0.0001$ ), prevalencia ( $p < 0.0001$ ) y abundancia ( $p < 0.0001$ ). Esta diferencia se caracterizó por una disminución drástica de esporas entre el inicio y el fin del estudio, lo cual se asoció con el inicio de la floración y el desarrollo de la colmena. La cantidad de hemocitos a lo largo del experimento no mostró diferencia significativa entre tratamientos, pero sí hubo aumento de hemocitos entre la primera y la última evaluación ( $p < 0.0001$ ).

**Palabras clave:** abejas africanizadas, suplemento alimenticio, antioxidantes, inmunidad.

# **ABSCISIC AND P-CUMARIC ACIDS LIKE FOOD SUPPLEMENTS AND STIMULANTS OF THE IMMUNE SYSTEM OF AFRICANIZED BEES (*Apis mellifera*)**

Elissa Chávez Hernández, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2021

## **ABSTRACT**

To maintain the hive and stimulate it before the flowering season begins, the beekeeper provides it high fructose syrup or sugar syrup, which only contain carbohydrates. The syrup, compared to honey, is a poor substance for the bee because it only provides energy, although with it provides a stimulus to increase the egg laying of the queen or to prevent the colony from starving. There are also protein supplements that help maintain the hive by providing proteins, fatty acids and vitamins necessary for nest maintenance in a time of scarcity. In bee colonies by morphometric and molecular techniques as *Apis mellifera scutellata* haplotype A1, a food supplement was administered, it was a mix of sugar syrup with either p-cumaric acid (CUM), important for its antioxidant effects, or abscisic acid (ABA), which promotes innate immunity responses in bees, as well as combined CUM and ABA. Over the course of three months, the number of cells with brood and food reserves and the concentration of hemocytes in worker bees were estimated. Besides, the main parasites of bees in Mexico were monitored: *Varroa destructor* and *Nosema ceranae*. It is postulated that ABA and CUM have no effect on the egg laying by the queen, manifested as the number of cells with brood, at least in the doses that were administered, since after the administration of syrup, control treatment, no significant differences were observed from the other treatments. There were significant differences over time in the sum of the open and closed brood ( $p < 0.0001$ ) and in food reserves ( $p < 0.0001$ ). Regarding the monitoring of *V. destructor*, the administration of ABA, CUM and the mixed metabolites did not result in significant differences; however, the nuclei managed to develop, a fact explained by the strain of bees (africanized) since their tolerance against this mite has been proven. No significant differences were observed in the parameters for evaluation of *N. ceranae* infection (intensity, prevalence and

abundance). However, there was a significant difference over time: intensity ( $p < 0.0001$ ), prevalence ( $p < 0.0001$ ) and abundance ( $p < 0.0001$ ); this difference was characterized by a drastic decrease in spores between the beginning and the end of the study, which was associated with the onset of flowering and the development of the hive. The number of haemocytes throughout the experiment showed no significant difference between treatments.

**Key words:** Africanized bees, food supplement, antioxidants, immunity.

## **DEDICATORIA**

Al honorable ser vivo que hizo posible el desarrollo de ésta: *Apis mellifera*, en honor a todas aquellas que en nombre de la ciencia fueron sacrificadas dedico esta tesis con el más puro deseo de proveer una herramienta más en la apicultura nacional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Colegio de Postgraduados por la oportunidad de seguirme preparando.

Al Conacyt por el apoyo que, sin él, no me hubiese sido posible entrar a estudiar de nuevo.

Agradezco a mi consejero Dr. Gabriel Otero por estar siempre como apoyo en la resolución de obstáculos que se me fueron presentando. Muchas gracias por la comprensión ante las situaciones que se me presentaron, gracias por las explicaciones y las facilidades para introducirme en el mundo de la biología molecular y también en el interesante mundo de los ácaros.

A la Dra. Celina Llanderal Cázares, muchas gracias por el apoyo, por lo aprendido en su maravillosa clase sobre fisiología de insectos.

Al Dr. Matías Maggi por todo el apoyo, por darme este interesante tema que coincidía perfecto con mis inclinaciones en la apicultura.

Al Dr Lauro Soto Rojas y al Dr Martín Eguaras por todo el apoyo recibido.

Al SENASICA, al departamento 3 del CENAPA por todas las facilidades y la gran oportunidad de hacer parte de mi trabajo. Muchas gracias al MC Juan Diego Pérez de la Rosa y a MC Karina Rocha por tanta amabilidad.

Al MC Jorge Valdez por las facilidades y los conocimientos.

Al Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia dirigido por la Dra. Violeta T. Pardío Sedas.

Al director de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia campus Veracruz, Dr Jorge G. Vicente Martínez, y al Dr Sóstenes R. Rodríguez Dehaibes.

Muchas gracias a todos los doctores que fueron mis profesores.

Muchas gracias a mi amado novio: Sos, por siempre apoyarme, por estar detrás de mí para que terminara esta parte de mi formación, gracias por los consejos, por la compañía, qué fácil fue todo este proceso estando a tu lado.

A mi familia por el apoyo, a mi querida hermana Ney por su invaluable visita. A mis padres por darme las herramientas que tuvieron para que yo saliera adelante.

A mis queridas amigas que gracias a la maestría pude conocer y convivir: Elizeth, Adriana, Vianey, Marino, Viridiana.

A mi compañero de trabajo experimental, médico Rafael Lagunes Zapata.

A doña Ana, don Fernando, doña Graciela, don Juan y a don Isael.

Muchas gracias a Dios.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	v
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
Abejas melíferas establecidas en México.....	2
Parásitos y patógenos de las abejas.....	4
<i>Nosema spp.</i> .....	4
<i>Varroa destructor</i> .....	6
Mecanismos de defensa de las abejas.....	7
Ácido p-cumárico.....	9
Ácido abscísico.....	9
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	10
Objetivo general .....	10
Objetivos específicos .....	10
Hipótesis.....	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Material biológico y sitio de estudio .....	11
Determinación de africanización en <i>Apis mellifera</i> .....	11
Técnica molecular .....	11
Técnica morfométrica.....	12
Cría de reinas .....	15
Administración de ABA y CUM con alimento suplementario .....	16
Medición del número de celdas con cría y reserva .....	17
Varroosis .....	18
Nosemosis.....	22
Identificación de <i>Nosema spp.</i> .....	22
Conteo de esporas de <i>Nosema sp.</i> .....	24
Conteo de hemocitos.....	25

<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>27</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>Identificación molecular de subespecies y haplotipos de abejas .....</b>	<b>28</b>
<b>Identificación morfométrica de subespecies de abejas .....</b>	<b>29</b>
<b>Efectos de los suplementos dietarios en el crecimiento de los núcleos .....</b>	<b>29</b>
<b>Monitoreo de <i>Varroa destructor</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>Identificación de <i>Nosema spp.</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>Cuantificación de esporos de <i>Nosema ceranae</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>Cuantificación de hemocitos .....</b>	<b>39</b>
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Procedimiento para medir parámetros basados en las especificaciones de Daly y Balling (1978) y Rinderer <i>et al.</i> (1993), para la determinación de africanización en abejas.....	14
<b>Cuadro 2.</b> Tamaño del segmento de ADN resultado del corte de la enzima Dral.....	28
<b>Cuadro 3.</b> Resultado del análisis morfométrico para identificación de abejas africanizadas basado en Daly y Balling (1978) y Rinderer <i>et al.</i> (1993) .....	29
<b>Cuadro 4.</b> Identificación molecular de <i>N. ceranae</i> por similitud con secuencias de nucleótidos del gen de RNA ribosomal, subunidad menor.....	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotografías de: A ala posterior izquierda, B ala anterior izquierda, C tercer esternito abdominal, D d1 basitarso izquierdo, d2 fémur izquierdo y d3 tarso izquierdo.....	12
<b>Figura 2.</b> A: Tira llena de copaceldas luego del translarve, B: celdas reales en copaceldas operculadas próximas a emerger. Fotografía cortesía de Gonzalo Luna.....	15
<b>Figura 3.</b> A Núcleo de fecundación con reina virgen; B reinas vírgenes recién marcadas listas para ser introducidas a núcleos de fecundación.....	16
<b>Figura 4.</b> Conteo de cuadrados de 5 x 5 cm en un bastidor de cría operculada.....	17
<b>Figura 5.</b> Piso de colmena modificado para el conteo de caída natural de varroa. ....	19
<b>Figura 6.</b> Piso modificado visto desde arriba de la colmena.....	19
<b>Figura 7.</b> Desoperculado de celdas de pupa de obreras. Al fondo de la celda una deutoninfa de <i>V. destructor</i> .....	20
<b>Figura 8.</b> Desoperculado de celdas de obrera.....	20
<b>Figura 9.</b> Embudo con malla para retener abejas y filtro de organza para retener varroas para técnica De Jong <i>et al.</i> (1982) .....	21
<b>Figura 10.</b> Hembras de <i>V. destructor</i> retenidas en el filtro de organza.....	22
<b>Figura 11.</b> Proceso de anestesiado con CO <sub>2</sub> .....	26
<b>Figura 12.</b> Extracción de hemolinfa de la aorta anterior.....	26
<b>Figura 13.</b> Hemocitos desde cámara de Neubauer a 40x en microscopio de contraste de fases. ....	27

**Figura 14.** Comparación de medias de la variable cría abierta y cría cerrada, las significancias para cada evaluación son: 25/01/20: P = 0.45; 13/02/20: P=0.47; 25/02/20: P= 0.22; 10/03/20: P= 0.0034; 23/03/20: P= 0.34; 06/04/20: P=0.43; 30/04/20: P=0.94. La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación. ....30

**Figura 15.** Comparación de medias de la variable reserva, las significancias para cada evaluación son: 25/01/20: P = 0.17; 13/02/20: P=0.08; 25/02/20: P= 0.21; 10/03/20: P= 0.77; 23/03/20: P= 0.78; 06/04/20: P=0.96; 30/04/20: P=0.45. La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación .....31

**Figura 16.** Comparación de medias de la variable caída natural semanal de *V. destructor*, las significancias para cada evaluación son: 02/12/19: P = 0.71; 03/02/20: P=0.16; 10/02/20: P= 0.13; 17/02/20: P= 0.58; 24/02/20: P= 0.01; 02/03/20: P=0.06; 09/03/20: P=0.43; 16/03/20: P= 0.57, 23/03/20: P= 0.89; 30/03/20: P= 15; 06/04/20: P= 0.46; 14/04/20: P= 0.43 La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.....32

**Figura 17.** Comparación de medias de la variable conteo de *V. destructor* en celdas operculadas, las significancias para cada evaluación son: 02/12/20: P = 0.86; 18/02/20: P=0.06; 03/03/20: P= 0.03; 16/03/20: P= 0.27; 30/03/20: P= 0.55; 14/04/20: P=0.85. La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación .....33

**Figura 18.** Comparación de medias de la variable conteo varroas por técnica de Jong *et al.* (1982), las significancias para cada evaluación son: 09/12/19: P = 0.57; 12/02/2020: P=0.40; 24/02/20: P= 0.81; 10/03/20: P= 0.92; 23/03/20: P= 0.81; 07/04/20: P=0.37. La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación .....34

**Figura 19.** Electroforesis correspondiente a *Nosema a.* Es: escalera, Cx+: testigo positivo, Cx-: testigo negativo, los números del 1 al 25 corresponden al número de colmena.....35

**Figura 20.** Electroforesis correspondiente a *Nosema ceranae*. M: escalera, C+: testigo positivo, C-: testigo negativo, la numeración de 1-25 corresponde al número de colmena .....36

**Figura 21.** Comparación de medias de la variable intensidad. Significancias: 25/01/20:  $p = 0.998$ ; 13/02/20:  $p=0.827$ ; 10/03/20:  $p= 0.707$ ; 23/03/20:  $p= 0.22$ ; 20/04/20:  $p= 0.118$ . La comparación de medias (Bonferroni) es válida dentro de cada evaluación .....37

**Figura 22.** Comparación de medias de la variable prevalencia, las significancias para cada evaluación son: 25/01/20:  $P = 0.80$ ; 13/02/20:  $P=0.34$ ; 10/03/20:  $P= 0.46$ ; 23/03/20:  $p= 0.10$ ; 20/04/20:  $P=0.72$ . La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación .....38

**Figura 23.** Comparación de medias de la variable abundancia, las significancias para cada evaluación son: 25/01/20:  $P = 0.998$ ; 13/02/20:  $P=0.827$ ; 10/03/20:  $P= 0.707$ ; 23/03/20:  $P= 0.22$ ; 20/04/20:  $P= 0.118$ . La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.....39

**Figura 24.** Comparación de medias de la variable conteo de hemocitos, las significancias para cada evaluación son: 28/01/20:  $P = 0.91$ ; 19/02/20:  $p=0.14$ ; 02/03/20:  $P= 0.77$ ; 17/03/20:  $p= 0.67$ ; 30/03/20:  $P= 0.88$ ; 14/04/20:  $p=0.39$ , 27/04/20:  $p=0.56$ . La comparación de medias (LSD-Bonferroni) es válida dentro de cada evaluación. ....40

## I. INTRODUCCIÓN

La abeja melífera occidental, *Apis mellifera*, es originaria de Europa y fue introducida al Continente Americano por colonizadores europeos en el siglo XVII (Labougle y Zozaya, 1986). En el año 1956 se introdujeron reinas *Apis mellifera scutellata* en Brasil procedentes del sur del Continente Africano (Kerr, 1967). Las abejas de origen africano llegaron a México en 1985, luego de un proceso invasivo que las llevó a establecerse ampliamente en Centro y Sudamérica (Moffett *et al.* 1987).

Es importante suplementar con algo más que carbohidratos a la colmena en época de escasez, ya que se corroboró que abejas suplementadas con polen tenían una mayor cantidad de vitelogenina en el cuerpo, mayor inmunidad celular y mayor cantidad de aminoácidos y proteínas tanto en el intestino como en la hemolinfa (Goblirsch *et al.*, 2013; Azzouz-olden *et al.*, 2018).

El ácido abscísico (ABA) es un componente natural presente en la miel que induce la producción de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (Bruzzone *et al.*, 2007; Lipp, 1990; Negri *et al.*, 2015; Tossi *et al.*, 2012), el cual juega un papel de señalización para la cicatrización de heridas, respuestas de encapsulación, activación de la formación de melanina y reconocimiento de agentes extraños (Negri *et al.*, 2013, 2014, 2015). El ácido p-cumárico (CUM), un compuesto de ácido hidroxicinámico, se ha reportado que tiene efectos antioxidantes (Zang *et al.*, 2000; Isidorov *et al.*, 2009; Chiremba *et al.*, 2012; Buitimea-Cantúa *et al.*, 2018; Cha *et al.*, 2018). El CUM se ha encontrado en polen, pan de abeja y propóleos (Kumazawa *et al.*, 2004; Jorge *et al.*, 2008; Isidorov *et al.*, 2009; Was *et al.*, 2017). Mao *et al.* (2013) mostraron evidencia de que el CUM contenido en polen y miel desarrolla la expresión de genes de desintoxicación en *A. mellifera*, lo que promueve la tolerancia frente a los plaguicidas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

La miel es una mezcla viscosa compleja de hidratos de carbono simples (glucosa y fructosa, principalmente), enzimas (invertasa, sacarasa, dextrasa, diastasa, glucosa oxidasa), vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina, ácido pantoténico, ácido nicotínico), aminoácidos, ácidos grasos, minerales (calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio), sustancias aromáticas, pigmentos, cera y granos de polen (Dadant *et al.*, 1975; White Jr. *et al.*, 1962; Zappi *et al.*, 2018). Recientemente se comprobó la importancia de suplementar con algo más que carbohidratos a la colmena en época de escasez, cuando se corroboró que abejas suplementadas con polen tenían una mayor cantidad de vitelogenina en el cuerpo, mayor inmunidad celular y mayor cantidad de aminoácidos y proteínas tanto en intestino como en hemolinfa (Goblirsch *et al.*, 2013). Al inocular a un grupo de abejas infectadas con *Nosema apis*, se observó que las abejas que únicamente se suplementaron con carbohidratos desarrollaban estrés por hambre, lo que ocasionó daño en el ADN en células infectadas (Azzouz-olden *et al.*, 2018).

### **Abejas melíferas establecidas en México**

La abeja melífera occidental, *A. mellifera*, es originaria de Europa y llegó al Continente Americano gracias a los colonizadores europeos en el siglo XVII (Labougle y Zozaya, 1986). En el año 1956 se introdujeron reinas *Apis mellifera scutellata* en Brasil procedentes del sur del Continente Africano (Kerr, 1967), pero un accidente ocasionó que descendientes de esas reinas africanas se esparcieran progresivamente en el Continente Americano (Rinderer *et al.*, 1991).

Las abejas de origen africano llegaron a México en 1985 (Winston, 1992), si bien Moffett *et al.* (1987) encontraron que los primeros enjambres de abejas africanizadas llegaron a México por Chiapas a finales de 1986. Smith *et al.* (1989) afirmaron que hacia 1989 cerca del 97% de las colonias en Brasil, Venezuela, Honduras y México tenían ADNmt característico de *A. m. scutellata*. Quezada-Euán (2007), por medio de técnicas morfométricas y moleculares, identificó mayor cantidad de genes africanos en colmenas de la costa del Golfo de México a diferencia de poblaciones del Altiplano y costa del

Pacífico, debido a las condiciones húmedas y grandes floraciones que hay en el Golfo de México. Domínguez-Ayala *et al.* (2015) confirmaron que en climas tropical y subtropical en México las colonias con abejas africanizadas son predominantes. En dos estudios en los que Nielsen *et al.* (2000) y Clarke *et al.* (2002) analizaron la frecuencia de haplotipos europeos y africanos en diferentes regiones en México, mostraron cómo afecta el clima y el ambiente para que se establezcan poblaciones con predominancia africana, así como la oportunidad de una mezcla genética con abejas europeas locales en las diferentes regiones de México, pues la abeja africanizada se desarrolla mejor en climas cálidos, mientras que en climas templados predomina la abeja europea.

Se conocen cinco linajes evolutivos de la especie *Apis mellifera*: A, incluye las subespecies africanas *adansonii*, *unicolor*, *capensis*, *monticola* y *scutellata*; M, incluye subespecies de Europa occidental como *mellifera*, *iberica*, *sahariensis*, *major* e *intermissa*; C, conformado por abejas de Europa del este como *ligustica*, *carnica*, *macedonica*, *cecropia* y *sicula*; el linaje O incorpora las subespecies de Oriente próximo como *meda*, *anatoliaca*, *syriaca*, *cipria* y *adami*; por último, el linaje Y, incluye la subespecie *yemenitica* de Etiopía (Franck *et al.*, 2000). Una herramienta para la caracterización de los linajes de abejas es el patrón de restricción Dral del ADNmt en la región COI-COII (Garnery *et al.*, 1993; Franck *et al.*, 2000).

Las abejas africanizadas *A. m. scutellata* tienen mayor afinidad por la recolección de polen que de néctar. Danka *et al.* (1987) compararon la proporción de abejas pecoreadoras destinadas a la recolección de polen entre colonias africanizadas y europeas en Venezuela y encontraron que por arriba del treinta por ciento de las abejas africanizadas, contra el quince por ciento de las abejas europeas, recolectaron polen. Fewell y Bertram (2002) obtuvieron resultados similares en Arizona, Estados Unidos de América.

Las abejas africanizadas toleran más ciertas enfermedades en comparación con las abejas europeas, debido principalmente a una mayor expresión del comportamiento higiénico (detectar y remover cría muerta o enferma), de acicalamiento (comportamiento

de las abejas en retirar ácaros de sus cuerpos usando patas y mandíbulas) y a una menor posibilidad de una invasión y reproducción de agentes patógenos (Nganso *et al.*, 2017).

## **Parásitos y patógenos de las abejas**

Las abejas conforman grandes colonias, pues son insectos sociales, lo que conlleva a condiciones óptimas para que alojen parásitos y haya una transmisión horizontal, ya que el nido es un ambiente que incuba a miles de posibles huéspedes (Schmid-hempel, 2005).

### ***Nosema spp.***

Microsporidia, un grupo de parásitos unicelulares relacionados con el reino Fungi, son parásitos intracelulares obligados que pueden afectar tanto a invertebrados como a vertebrados (Vávra y Lukeš, 2013). *Apis mellifera* es afectada por dos microsporidios del mismo género: *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, los que causan la enfermedad llamada nosemosis (Smith, 2012; Fries *et al.*, 2013). En México *N. apis* se reportó por primera vez en 1980 (Guzman-Novoa, 1981) y *N. ceranae* está presente desde 1995 (Guerrero-Molina *et al.*, 2016).

Fleites-Ayil *et al.* (2018) encontraron que *N. ceranae* induce a abejas africanizadas jóvenes a que comiencen a ser pecoreadoras ocho días antes que abejas sanas y que ocurre algo similar en abejas europeas. En el mismo trabajo colectaron 60 abejas de 21 colmenas de un apiario experimental, las muestras fueron analizadas mediante PCR convencional y parte del alineamiento de la secuencia preservada de una pequeña subunidad del gen 16S rRNA. Para la identificación de *N. ceranae* y *N. apis* utilizaron el protocolo descrito por Chen *et al.* (2008), el cual se basó en la longitud de amplificación de segmentos de 250 o 401 pares de bases, respectivamente (Fleites-Ayil *et al.* 2018).

Cueto *et al.* (2019) identificaron especies de *Nosema* en el noreste de México mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, de 765 muestras de 76 apiarios y

de cuatro puntos espaciales; encontraron que el 87.32% de las muestras fue positivo a *N. apis*, el 12.68% a *N. ceranae* y el 10.20% resultó en una coinfección de ambos microsporidios.

Ambos microsporidios infectan y proliferan dentro de las células del epitelio ventricular de las abejas adultas cuando éstas ingirieron esporos en agua o miel contaminados, o se alimentaron por trofalaxis con abejas infectadas (Gisder *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2015). Entre tres y cuatro días después de la infección se produce degeneración en el tejido y deterioro en la renovación celular, que son los dos factores responsables de la mortalidad de abejas (Dussaubat *et al.*, 2012). La infección con *N. apis*, considerada de menor virulencia, se caracteriza por presentar signos como disentería, reducción en la longevidad de las abejas infectadas y aumento en la mortalidad durante el invierno (Kurze *et al.*, 2016; Martín-Hernández *et al.*, 2018). La nosemosis causada por *N. ceranae* también incrementa el consumo de azúcar y afecta la respuesta inmune y la esperanza de vida de las abejas (Botías *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018). La nosemosis crónica causada por ambos microsporidios reduce la producción de miel, la supervivencia de la colmena, la longevidad de las abejas, el desarrollo de cría y la recolección de polen (Paxton, 2010). Esta enfermedad presenta diferentes signos, como disentería en infecciones de *N. apis*, que tiene una transmisión fecal-oral; sin embargo, la disentería no se presenta en la infección de *N. ceranae*, el cual tiene una infección oro-oral (Smith, 2012). Otro signo es aumento en el pecoreo en abejas infectadas debido a la acumulación de hormona juvenil, lo que ocasiona que estos insectos ingieran más alimentos y con ello el microsporidio también tiene más nutrientes para su desarrollo y proliferación (Goblirsch *et al.*, 2013). La nosemosis causa daños dentro de la abeja, por ejemplo, modula el nivel de expresión de genes involucrados en actividades en el metabolismo básico de carbohidratos, de aminoácidos, de transporte y energético. También se observa una menor cantidad del gen que codifica a las enzimas dopa descarboxilasa y catalasa, lo que compromete la inmunidad de las abejas, pues suprime la cascada de melanina y ocasiona bajos efectos antioxidantes y xenobióticos (Aufauvre *et al.*, 2014). El único medicamento de reconocida eficacia en el control de la nosemosis es la fumagilina (sal de biciclohexilamonio), por lo que es de amplio uso (Higes *et al.*,

2006 b); sin embargo, este producto no está permitido en algunos países por ser un contaminante en la miel (Lopez *et al.*, 2008) y tóxico para el ser humano (van den Heever *et al.*, 2014). En México no está autorizada la importación de la fumagilina para uso veterinario, aunque no se cuenta con ninguna prohibición oficial de parte del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

### ***Varroa destructor***

El ácaro *Varroa destructor* Anderson y Trueman, 2000 (Acari: Varroidae) causante de la varroosis, es considerado el parásito más importante de abejas melíferas (Lodesani *et al.*, 1992).

Ramsey *et al.* (2019) demostraron que *V. destructor* se alimenta principalmente del tejido graso de adultas y larvas de *A. mellifera*, pues gracias a un perfil fluorescente en el cual la hemolinfa y el tejido graso toman diferente color, identificaron que en el intestino de *V. destructor* había mayor cantidad de tejido graso. Los mismos autores observaron que una dieta únicamente de hemolinfa ocasionaba una esperanza de vida menor y una menor cantidad de huevos en la hembra. Con lo anterior resulta interesante mencionar que ABA induce a la producción de óxido nítrico en las células, el cual participa en la respuesta celular que tiene *A. mellifera* y promueve la cicatrización en heridas luego de que la hembra de *V. destructor* dañe la cutícula (Negri *et al.*, 2015). Este ácaro posee sustancias anticoagulantes que, al momento de lastimar la cutícula de las abejas, evita una pronta cicatrización (Richards *et al.*, 2011). Reyes-Quintana *et al.* (2019) midieron la cantidad de hemocitos en abejas africanizadas infestadas con *V. destructor* y la compararon con la de abejas sanas; las concentraciones fueron  $1291 \pm 81$  hemocitos/ $\mu\text{L}$  y  $1834 \pm 129$  hemocitos/ $\mu\text{L}$ , respectivamente.

Las colonias de abejas africanizadas, gracias a que son fácilmente propensas a enjambrar, presentan cargas más bajas de poblaciones de *V. destructor* en comparación con las colonias de abejas (Fries *et al.*, 2003). También expresan en mayor medida el

hábito higiénico (Vandame *et al.*, 2002) y de acicalamiento contra este ácaro (Guzman-Novoa *et al.*, 2012).

Nganso *et al.* (2017) identificaron que el nivel de infestación por *V. destructor* fue tres veces más alto en híbridos de *A. mellifera* de origen europeo comparado con *A. m. scutellata*; notaron que esta última es más agresiva contra el ácaro y concluyeron que tiene más mecanismos de supervivencia contra el ácaro comparado con abejas europeas. Datos similares fueron presentados por Medina-Flores *et al.* (2014), quienes observaron que los niveles de infestación por *V. destructor* en regiones calurosas de México, en donde predominan abejas africanizadas, eran menores comparados con los de regiones más templadas, en donde predominaban abejas de origen europeo.

*Varroa destructor* parasita a abejas adultas y a sus crías (Demedio, 2010; Le Conte *et al.*, 2010), con lo cual produce daños directos e indirectos sobre los individuos afectados (Eguaras y Ruffinengo, 2006; Roberts *et al.*, 2017). Se ha confirmado que transmite virus a las abejas, seis de éstos confirmados en México: virus de la cría ensacada, virus de las celdas reales negras, virus de las alas deformes, virus de la parálisis aguada, virus de la parálisis aguada de Israel y virus de Cachemira (Hernández y Arechavaleta, 2016). El control de este ácaro se realiza con acaricidas piretroides y fosforados, pero desde hace una década se ha detectado resistencia a estos principios activos en Europa, Estados Unidos, Asia, Argentina y México (Maggi *et al.*, 2009; Rodríguez-Dehaibes *et al.*, 2005). Un posible apoyo “natural” al problema del uso de agentes de síntesis antiparasitarios es fortalecer el sistema inmunológico de las abejas a través de una complementación de su dieta (Negri *et al.*, 2015).

### **Mecanismos de defensa de las abejas**

El sistema inmune innato de los insectos incluye tanto defensa celular como humoral, la primera de ellas mediante la actividad de los hemocitos o células de la hemolinfa (Schmid-Hempel, 2005; Schmid *et al.*, 2008). Cuando el organismo de un insecto reconoce un agente extraño, los hemocitos activan diferentes procesos tales como fagocitosis, encapsulación y nodulación; de manera casi simultánea con las reacciones

celulares empiezan las respuestas humorales con la elaboración de proteínas de reconocimiento, las cuales inician una cascada de reacciones metabólicas que terminan con la síntesis de péptidos antimicrobianos y antifúngicos que se liberan en la hemolinfa (Nardi *et al.*, 2006; Nation, 2016).

Las abejas melíferas tienen un sistema inmunológico innato, también conocido como inmunidad individual, que incluye tanto barreras físicas como respuestas celulares y humorales que les permiten defenderse de una amplia variedad de organismos infecciosos y parasitarios. Por otra parte, la alta densidad de población en la colmena y la presencia de alimento en ella la hace atractiva para diferentes patógenos; sin embargo, estas mismas condiciones también promueven la inmunidad social, caracterizada por un comportamiento cooperativo dentro de la colonia a través de mecanismos como regulación de temperatura, comportamiento de aseo, recolección y uso de propóleo (Larsen *et al.* 2019).

Marringa *et al.* (2014) encontraron en abejas, por medio de citometría de flujo con análisis microscópico, que hay una inexplicable diversidad de perfiles de hemocitos en una sola colmena y postularon que la variación pudiera estar relacionada con la edad de los individuos, además de la influencia externa sobre la colmena como es el clima, la exposición a productos químicos o la respuesta a determinadas infecciones. En cuanto al número de células en las abejas, la cría tiene más hemocitos en comparación con los adultos, siendo larvas y pupas las que cuentan con una mayor cantidad de ellos (Wilson-Rich *et al.* 2008). En un estudio en el que se incluyeron las dos castas de la abeja adultas y los machos, se observó que los hemocitos disminuyen con la edad, sin distinción de castas ni género (Schmid *et al.*, 2008).

Alaux *et al.* (2010) encontraron que la calidad de las proteínas del polen de mezclas de flores incrementó la inmunocompetencia en *A. mellifera*, comparado con el de una fuente floral única, expresada en un mayor nivel de la enzima glucosa oxidasa, mayor número de hemocitos y niveles más altos de la fenol oxidasa, enzima que, de acuerdo con

Eleftherianos y Revenis (2011), conduce a la formación de melanina en heridas y se ubica alrededor de los microorganismos intrusos en la hemolinfa.

### **Ácido p-cumárico**

El ácido p-cumárico (CUM) es un compuesto de ácido hidroxicinámico, el cual tiene tres isómeros: ácido m-cumárico, ácido o-cumárico y ácido p-cumárico. CUM es el isómero más abundante del ácido hidroxicinámico en la naturaleza, ampliamente distribuido en frutas (manzanas, peras, tomates), tubérculos (papas), frijoles, té y granos (maíz y sorgo), se ha reportado que el CUM tiene efectos antioxidantes (Zang *et al.*, 2000; Isidorov *et al.*, 2009; Chiremba *et al.*, 2012; Buitimea-Cantúa *et al.*, 2018; Cha *et al.*, 2018). El CUM se ha encontrado en polen, pan de abeja y propóleos (Kumazawa *et al.*, 2004; Jorge *et al.*, 2008; Isidorov *et al.*, 2009; Waś *et al.*, 2017). Mao *et al.* (2013) mostraron evidencia de que el CUM contenido en polen y miel desarrolla la expresión de genes de desintoxicación en *A. mellifera*, lo cual promueve la tolerancia de las abejas frente a los plaguicidas; también indicaron que la concentración de 82 µg /g no es tóxica para la abeja adulta. Mao *et al.* (2015) administraron 0.5 mM de CUM a larvas de abejas y comprobaron que, al igual que los adultos, el consumo de CUM da como resultado una regulación positiva de múltiples citocromos metabolizadores de xenobióticos en los genes P450 y genes de inmunidad.

### **Ácido abscísico**

La fitohormona ácido abscísico (ABA) que regula el crecimiento, el desarrollo de semillas, la adaptación a abióticos y la respuesta a estresores medioambientales como temperaturas altas, luz, sequías y baja salinidad (Schwartz *et al.*, 2003; Sankar *et al.*, 2016). En los animales, ABA es una hormona endógena que actúa dentro de las respuestas inflamatorias (Bruzzone *et al.*, 2007). A través de estudios de laboratorio y experimentos de campo, Negri *et al.* (2015) demostraron que la suplementación a colmenas con jarabe que contenía ABA promueve respuestas de inmunidad innata y también observaron que una suplementación con ABA tiene un efecto importante en la abeja a nivel individual, ya que estimula las respuestas inmunológicas innatas celular y

humoral. A nivel colonia, luego del invierno, las colmenas suplementadas con ABA logran tener hasta un 70% de mayor población comparada con el testigo.

El ácido abscísico (ABA) es un componente natural presente en la miel que induce la producción de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (Lipp, 1990; Bruzzone *et al.*, 2007; Tossi *et al.*, 2012; Negri *et al.* 2015), el cual juega un papel de señalización para la cicatrización de heridas, respuestas de encapsulación, activación de la formación de melanina y reconocimiento de agentes extraños (Negri *et al.*, 2013, 2014, 2015).

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de las moléculas de origen vegetal ácido abscísico y ácido p-cumárico administradas a núcleos africanizados de *Apis mellifera* para medir el incremento en celdas con cría, la reserva de miel/polen y, a lo largo del trabajo, monitorear el comportamiento de *V. destructor* y *Nosema spp.*

#### **Objetivos específicos**

Evaluar, mediante ensayos de campo, si el suministro de ABA y CUM como suplemento alimenticio a colonias de *A. mellifera scutellata* estimula el desarrollo de éstas y el almacenamiento de miel/polen.

Evaluar cómo afecta el suministro de ABA y CUM la infestación de las abejas por *V. destructor*, expresada en la mortalidad natural, infestación de abejas adultas por la etapa forética y la infestación de cría.

Evaluar el efecto del suministro de ABA y CUM en la infección de las abejas por *Nosema spp.*, expresada en la intensidad, prevalencia y abundancia de este microorganismo en las colonias.

Evaluar cómo afecta el suministro de ABA y CUM en la concentración de hemocitos en las abejas.

## **Hipótesis**

El suministro de ABA y CUM aumentará la producción de cría de *A. mellifera* de origen africano y las reservas de miel y polen; también incrementará las defensas inmunes contra varroosis y nosemosis.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico y sitio de estudio**

El material biológico para las pruebas en laboratorio y para el trabajo en campo se instaló en la Posta Zootécnica Torreón del Molino de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad Veracruzana, ubicada en Tejería, Veracruz, México. El trabajo inició con 17 colmenas, las cuales fueron muestreadas para, de éstas, seleccionar una colmena que tuviera ascendencia africana.

### **Determinación de africanización en *Apis mellifera***

#### **Técnica molecular**

La identificación subespecífica de las abejas se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología molecular, edificio de Fitosanidad, y en el Laboratorio de Acarología en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo. Para determinar el linaje de las colonias de abejas se usaron dos técnicas, la molecular y la morfológica. Para la técnica molecular se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) total siguiendo parte del protocolo de Côté (2007), en el cual se utilizó únicamente el tórax de una abeja por colmena. Se corrió la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con Garnery *et al.* (1993), con los primers (iniciadores o cebadores) E2 (5'-GGC AGA ATA AGT GCA TTG-3') y H2 (5'-CAA TAT CAT TGA TGA CC-3'), que amplifican un segmento de la región intergénica ARNt<sup>leu</sup>-COII. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Thermo Scientific 5020 modelo ITCA0096; se usó el kit QIAamp DNA Micro kit (Cat. No. 56304), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El programa de PCR consistió en desnaturalización a 96° por 5 min, 35 ciclos de 1 min con una temperatura de hibridación de 53°C, extensión a 72°C durante 1 min, desnaturalización de 45 s a 96°C y 10 min de extensión final a 72°C. Los

productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% con 60 mL de buffer TAE con bromuro de etidio. Alícuotas de los productos de PCR se enviaron a la empresa Macrogen, en Corea del Sur, para su secuenciación mediante el método Sanger. Mediante el programa MEGA versión 10.0.5 se formaron las secuencias consenso. La identificación de las subespecies de abejas y sus haplotipos fue realizada *in silico* por la presencia y posición de sitios de restricción diagnósticos de la enzima Dral (5'-TTT^AAA-3') (Salamanca *et al.*, 2009; Garnery *et al.*, 1993).

### Técnica morfométrica

Para respaldar los resultados de la técnica molecular para identificación de subespecies de abejas, se utilizó la técnica morfométrica basada en Daly y Balling (1978) y Rinderer *et al.* (1993), la cual consistió en tomar 10 abejas de cada colmena y a cada abeja se le diseccionaron las siguientes partes anatómicas (Figura 1):

- Tercer esternito abdominal.
- Ala anterior izquierda.
- Ala posterior izquierda.
- Fémur izquierdo.
- Tibia izquierda.
- Basitarso izquierdo.



**Figura 1.** Fotografías de: A ala posterior izquierda, B ala anterior izquierda, C tercer esternito abdominal, D d1 basitarso izquierdo, d2 fémur izquierdo y d3 tarso izquierdo.

Las piezas anatómicas citadas se montaron entre porta y cubreobjetos en preparaciones semipermanentes con ácido láctico, las cuales fueron fotografiadas con la ayuda de un estereoscopio Carl Zeiss Stereo V20 con cámara Canon EOS 5D con objetivo de 1.0, magnitud de 20.0 x y en un campo de 11.0 mm (Figura 1).

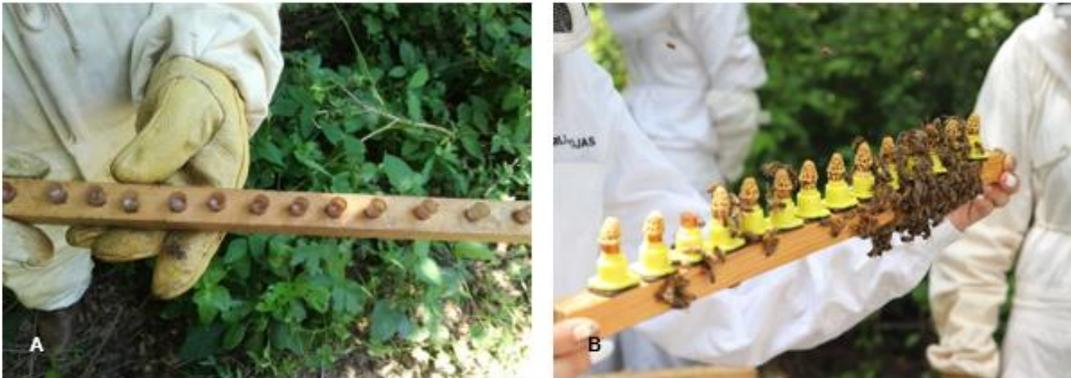
Se analizaron 25 características (Cuadro 1), las longitudes y los ángulos fueron medidos con el programa ImageJ 1.52a con calibración de escala a 7 mm. Los valores promedio de cada característica se multiplicaron por los coeficientes correspondientes; la suma de los productos se sumó a la constante 65.8162 y el resultado fue el criterio para determinar a las abejas como europeas o africanizadas; 1.2669 es el punto medio entre africanizadas y europeas, arriba de este valor se consideran abejas con linaje africano y debajo de este valor se consideran abejas con linaje europeo (Rinderer *et al.*, 1993).

**Cuadro 1.** Procedimiento para medir parámetros basados en las especificaciones de Daly y Balling (1978) y Rinderer *et al.* (1993), para la determinación de africanización en abejas.

Núm. progresivo	Descripción de la característica	Valor promedio de 10 obreras	Multiplicar por el siguiente coeficiente
1	Longitud de ala anterior		-1.6672
2	Ancho de ala anterior		6.5436
3	Longitud de abscisa proximal de vena M		-4.6348
4	Longitud de abscisa distal de vena M		8.6729
5	Ángulo A29		0.02846
6	Ángulo A30		-0.006395
7	Ángulo A31		0.02593
8	Ángulo A32		-0.1883
9	Ángulo A33		-0.07260
10	Ángulo A34		-0.05546
11	Ángulo A35		0.2896
12	Ángulo A36		-0.1081
13	Ángulo A38		-0.1196
14	Ángulo A39		-0.09794
15	Longitud ala posterior		-1.6948
16	Ancho ala posterior		-6.6517
17	Número de hámulos		0.09415
18	Longitud fémur		-15.1122
19	Longitud tibia		6.6036
20	Longitud basitarso		0.6594
21	Ancho basitarso		-0.2038
22	Longitud del esternito		2.8746
23	Ancho espejo de cera		-4.9703
24	Longitud espejo de cera		-4.9189
25	Distancia entre espejos de cera		2.5428
			Suma de los productos de medias por coeficientes
			Sumarle la siguiente constante: 65.8162

## Cría de reinas

Se seleccionó una colonia que fue determinada como africanizada, tanto por la técnica molecular como morfométrica, como pie de cría para la obtención de reinas. Se utilizó el método de translarve (trasplante o injerto de larvas) basado en Woodward (2007), el cual consistió en elegir larvas de aproximadamente tres días de edad de la colmena seleccionada, que fueron colocadas en copaceldas previamente acondicionadas en un marco de bastidor (Figura 2 A). Una vez terminado el translarve se introdujo el marco a una colmena huérfana para estimular a las obreras nodrizas a alimentar a las larvas y convertirlas en reinas (Figura 2 B). Cuando éstas llegaron a adultas, se seleccionaron 20 reinas vírgenes entre 11 a 13 días después del translarve y cada una se introdujo en un núcleo de tres bastidores para su fecundación (Figura 3), posteriormente se cercioró la fecundación de la reina y el desarrollo del núcleo. El trabajo se inició con 20 núcleos de cinco bastidores.



**Figura 2.** A: Tira llena de copaceldas luego del translarve, B: Celdas reales en copaceldas operculadas próximas a emerger. Fotografía cortesía de Gonzalo Luna.



**Figura 3.** A Núcleo de fecundación con reina virgen; B reinas vírgenes recién marcadas listas para ser introducidas a núcleos de fecundación.

### **Administración de ABA y CUM con alimento suplementario**

Se utilizó ( $\pm$ )-ácido abscísico (ABA)  $\geq 98.5\%$  (HPLC) cultivo de células vegetales marca Sigma® CAS: 14375-45-2 en dosis de  $50 \mu\text{M}$  mezclado en 500 mL de jarabe 1:1 (azúcar: agua), administrado una vez por semana, de acuerdo con Szawarski *et al.* (2019) durante todo el trabajo experimental.

Se utilizó p-ácido cumárico  $\geq 98.0\%$  (HPLC) 4- ácido hidroxicinámico marca Sigma® CAS: 501-98-4, con una dosis de  $600 \mu\text{M}$ , que está dentro del rango de dosis que utilizaron Mao *et al.* (2013) mezclado en 500 mL de jarabe 1:1 (azúcar: agua) una vez por semana durante todo el trabajo experimental.

El trabajo abarcó del 27 de enero al 30 de abril 2020. Se incluyeron los 20 núcleos divididos de la siguiente manera:

- Cinco núcleos, con números 1, 5, 7, 20 y 21, los cuales fueron suplementados semanalmente con 500 mL de jarabe 1:1 más  $50 \mu\text{M}$  de ABA.
- Cinco núcleos, con números 6, 8, 10, 14 administrados semanalmente con jarabe 1:1 más  $600 \mu\text{M}$  correspondiente de CUM.

- Cinco núcleos, con números 11, 12, 15, 23 y 25, administrados semanalmente con 500 mL de jarabe 1:1 más una mezcla de 50  $\mu$ M ABA y 600  $\mu$ M de CUM (ABACUM).
- Cinco núcleos, con números 2, 3, 9, 13 y 16, suplementados únicamente con 500 mL de jarabe 1:1, como testigos.

Los núcleos correspondientes a los tratamientos anotados fueron dispuestos aleatoriamente en el apiario experimental.

### **Medición del número de celdas con cría y reserva**

Este parámetro se midió cada quince días durante los tres meses que duró el trabajo, con base en el método de Delaplane *et al.* (2013) con algunas modificaciones y consistió en cuantificar el número de celdas ocupadas por cría con un rectángulo de acrílico transparente dividido en cuadrados de 5 cm x 5 cm (Figura 4), donde en cada cuadrado caben 99 celdas de abejas obreras. Se colocó el rectángulo de acrílico sobre cada panel de cada núcleo para contar cuántos cuadrados había ocupados por cría abierta (CA), por cría operculada (CO) y la cantidad de cuadrados de reservas de miel y polen (R) de todos los bastidores de la cámara de cría en sus dos caras.



**Figura 4.** Conteo de cuadrados de 5 x 5 cm en un bastidor de cría operculada.

Al final del trabajo experimental se sumó el número de cuadrados que había de CA, CO y R en cada núcleo a lo largo del experimento, posteriormente se agruparon por tratamiento y el resultado final se multiplicó por 99 (esta cifra es la cantidad promedio de celdas que hubo en un cuadrado de 25 cm<sup>2</sup> de 10 bastidores de diferentes núcleos, que se contó previo a iniciar el trabajo experimental), para estimar el número de celdas ya sea con CA, CO o R de un núcleo a lo largo del tiempo.

### **Varroosis**

A lo largo del trabajo experimental se monitoreó el ácaro *V. destructor*, con base en tres parámetros establecidos por Dietemann *et al.* (2013):

- **Conteo de caída natural de *V. destructor*:** Este parámetro se midió semanalmente a lo largo de todo el trabajo, para lo cual se colocó debajo de cada núcleo un piso modificado (Figura 5) con malla galvanizada de 8 x 8 hilos por pulgada (3 mm de abertura) y debajo de ella una charola blanca (Figura 6), para poder medir la cantidad de ejemplares de *V. destructor* que cayeron.



**Figura 5.** Piso de colmena modificado para el conto de caída natural de *V. destructor*.

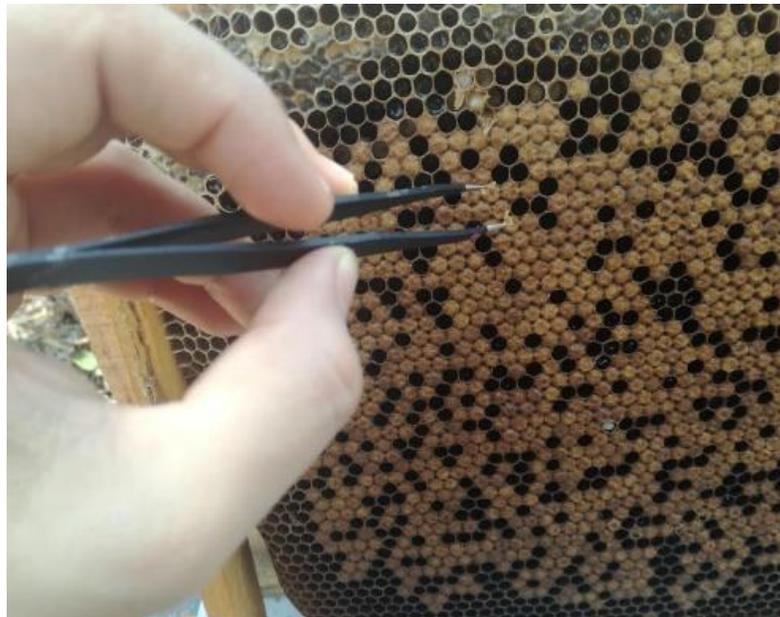


**Figura 6.** Piso modificado visto desde arriba de la colmena.

- Prevalencia de *V. destructor* en cría. Este parámetro se midió cada quince días a lo largo de todo el trabajo, se retiró el opérculo de 100 celdas y se contó la cantidad de hembras fundadoras de *V. destructor* presentes (Figuras 7 y 8).



**Figura 7.** Desoperculado de celdas de pupa de obreras. Al fondo de la celda una deutoninfa de *V. destructor*.



**Figura 8.** Desoperculado de celdas de obrera.

- El nivel de infestación por *V. destructor* en abejas obreras adultas se determinó cada quince días mediante el método descrito por De Jong *et al.* (1982). Esta técnica consistió en agitar mecánicamente una muestra de aproximadamente 150 abejas obreras en alcohol al 75 % durante 15 s para desprender los ácaros adheridos a su cuerpo y, posteriormente, verter el alcohol a través de una tela blanca, para registrar el número de ácaros retenidos en ella (Figuras 9 y 10). El porcentaje de infestación se determinó mediante el conteo total de ácaros encontrados en la tela, dividido entre el número de abejas analizadas y multiplicado por 100.



**Figura 9.** Embudo con malla para retener abejas y filtro de organza para retener ejemplares de *V. destructor*, técnica de Jong *et al.*, 1982),



**Figura 10.** Hembras de *V. destructor* retenidas en el filtro de organza.

### ***Nosemosis***

#### **Identificación de *Nosema spp.***

Se colectaron, previo al inicio del trabajo experimental, 30 abejas pecoreadoras de la piquera de cada núcleo y se colocaron en un frasco con etanol al 70%. Para la identificación de especies de *Nosema*, se llevó a cabo análisis por PCR y secuenciación de los amplicones en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) ubicado en la Carreta Federal Cuernavaca-Cuautla, Colonia Progreso, Morelos. El protocolo, desarrollado en el CENAPA (MC Karina Rocha, comunicación personal) se inició con la preparación de un macerado, para lo cual se tomaron cinco abejas de cada colmena y se colocaron sobre papel absorbente, luego se diseccionaron sus abdómenes con una pinza previamente desinfectada y se colocaron en un tubo con perlas de cerámica (MagNA Lyser Green Beads marca Roche® con número de producto 03358941001) más 600  $\mu$ L de agua destilada, se les sometió a disrupción a 50

oscilaciones por segundo durante 6 min, se pasó el macerado a un tubo Eppendorf de 2 mL, al resto del tubo con perlas se le agregaron 600 µL de agua destilada, esto también se pasó al tubo de 2 mL; se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 min, se decantó el sobrenadante hasta dejar el pellet formado en el fondo del tubo, al cual se le agregaron 1000 µL de agua grado biología molecular, éste se pasó brevemente por un agitador vortex y se volvió a centrifugar a 14 000 rpm durante 3 min.

La extracción de ADN se realizó con el kit Wizard® Genomic DNA Purification. Se agregaron 600 µL de solución de lisis (nucleic lysis solution) al pellet, se mezcló en el vortex durante 10 s, se incubó a 65°C durante 30 m, se añadieron 3 µL de RNasas (RNase solution) a cada muestra y se mezcló en el vortex, se incubó a 37°C durante 15 min y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se añadieron 200 µL de solución de precipitado de proteínas (protein precipitation solution), se homogenizó e incubó en hielo durante 10 min, luego se centrifugó a 16 000 g por 6 m. Una vez terminado esto se transfirieron 200 µL de sobrenadante a un tubo de 1.5 mL con 600 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 16 000 por 1 min, se desechó el sobrenadante y únicamente quedó el pellet, éste se lavó con 600 µL de etanol al 70%, se mezcló con vortex, se volvió a centrifugar a 16 000 g por 1 min, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se deshidrató el pellet en 50-100 µL de solución de rehidratación (DNA rehidratation solution de Wizard® genomic DNA Purification kit de Promega) durante 1 h a 65°C. Para cuantificar los ácidos nucleicos se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000. Al terminar se colocó la mezcla de reactivos basados en el Cuadro 2.

Para *Nosema apis* el iniciador en sentido fue 5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA -3' y el antisentido fue 5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACTATG -3'; en el caso de *Nosema ceranae* el iniciador en sentido fue 5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA -3' y el antisentido fue 5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG -3'. Ambos juegos de iniciadores amplifican un segmento de la unidad menor del gen de RNA ribosomal (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Para la PCR se utilizaron los siguientes reactivos: agua libre de nucleasas 7.5 µL, mezcla maestra de reacción (High-Performance GoTaq® G2 DNA Polymesase in a Ready-to-Use Master Mix, Promega, cat. No. M7822) 12.5 µL,

iniciador sentido 1  $\mu\text{L}$ , iniciador antisentido 1  $\mu\text{L}$ , ADN 3  $\mu\text{L}$  con un volumen total de 25  $\mu\text{L}$

La PCR se corrió en un termociclador marca Applied Biosystems, modelo GeneAmp® PCR System 9700, con el siguiente programa: desnaturalización inicial, 95°C por 2 min; 35 ciclos de 95°, 30 s; 58°m 30; 72°, 30 s; con un periodo de extensión final de 5 min.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel agarosa al 2% en buffer TBE 0.5X, teñido con SYBR® Green PCR, y utilizando 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 6x mezclado con 5  $\mu\text{L}$  de cada producto de PCR, a 90-100 voltios durante 50 min. Como referencia se usó marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Se visualizaron los amplicones generados en la reacción de PCR con un transiluminador de luz UV.

Los productos de PCR se procesaron para su secuenciación con el método Sanger en el CENAPA. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa MEGA versión 10.0.5 para la obtención de las secuencias consenso. Éstas se alinearon utilizando BLAST con secuencias depositadas en el GenBank para su identificación específica por similitud con dichas secuencias.

### **Conteo de esporas de *Nosema sp.***

En cada muestra, cinco en total a lo largo de todo el trabajo experimental, fueron colectadas 50 abejas pecoreadoras, ya que es más probable que estén infectadas en comparación con abejas jóvenes (Meana et al., 2010); se colocaron en un frasco con etanol al 70% (Fries et al., 2013).

De acuerdo con Fries et al. (2013), se determinó la prevalencia y la intensidad de *Nosema* spp. (número de abejas infestadas entre número de abejas examinadas, y número de esporos entre número de abejas infectadas, respectivamente); asimismo y de acuerdo con Prendas-Rojas et al. (2018), se determinó la abundancia de *Nosema* spp. (número de esporos entre número de abejas examinadas). El procedimiento fue extraer los abdómenes de 21 abejas de cada colmena, los que fueron individualmente macerados en 1 mL de agua destilada; esta agua fue filtrada dos veces con tela de organza, de ese filtrado se tomó un alícuota (10  $\mu\text{L}$ ) y se estimó la concentración de esporos en una

cámara de Neubauer Reichert Bright-Line® (0.1 mm de profundidad y área de recuento de 0.0025 mm<sup>2</sup>) bajo un microscopio de contraste de fases Carl Zeiss® S-220601170 a 400 aumentos (400x).

### **Conteo de hemocitos**

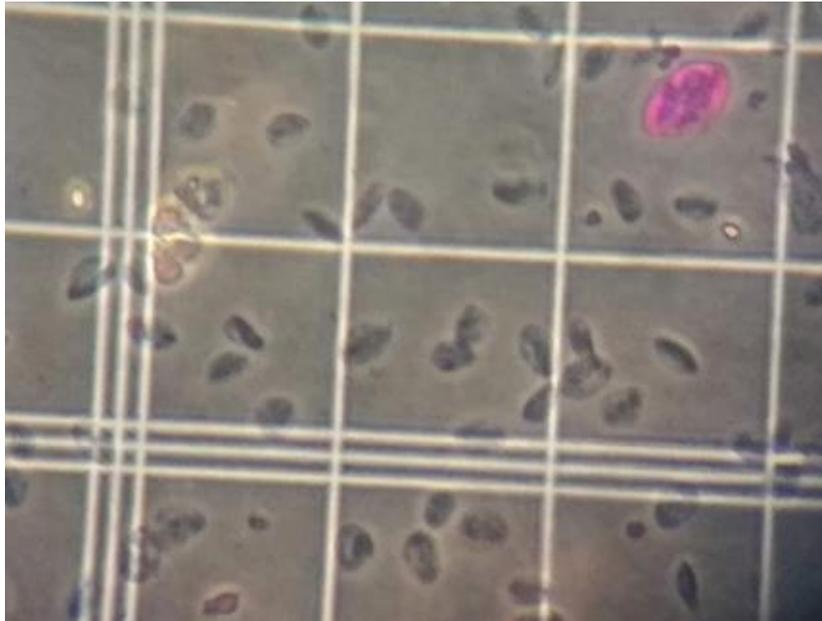
Este parámetro se midió cada 15 días durante el tiempo que duró el trabajo experimental, para lo cual en cada fecha se colectaron 10 abejas de cada colmena. En el laboratorio las abejas se anestesiaron con CO<sub>2</sub> a 0.14 kg/cm<sup>2</sup> (2 libras por pulgada cuadrada) durante 15 s (figura 11) y se procedió a la extracción de la hemolinfa con base en el protocolo de Garrido *et al.* (2013), que consistió en punzar la aorta (figura 12). Para la punción se utilizó una jeringa con aguja hipodérmica de 0.8 mm de diámetro y 25 mm de longitud (BD Ultra-fine®). La hemolinfa fue colectada de las 10 abejas para obtener 10 µL, 1 µL por individuo, con una pipeta de 10 µL (Thermo scientific Finnepipette® 1 – 10 µL). La hemolinfa se mezcló con 10 µL de solución SBP por las siglas de Sarkaria, Bettini y Patton (Sarkaria *et al.* 1951), para fijar y teñir los hemocitos. De la mezcla se tomaron 10 µL para determinar la cantidad de hemocitos en una cámara Neubauer Reichert Bright-Line® (0.1 mm de profundidad y área de recuento de 0.0025 mm<sup>2</sup>), bajo un microscopio de contraste de fases Carl Zeiss® a 400 aumentos (figura 13). Inmediatamente después de extraer la hemolinfa y aún anestesiadas, las abejas se sacrificaron en alcohol al 96%. Para el conteo de hemocitos se siguió la metodología descrita por Llanderal y Cibrián (1983).



**Figura 11.** Proceso de anestesiado con CO<sub>2</sub>.



**Figura 12.** Extracción de hemolinfa de la aorta anterior.



**Figura 13.** Hemocitos desde cámara de Neubauer a 40x en microscopio de contraste de fases.

### **Análisis estadístico**

Las variables de respuesta a la administración de suplementos alimenticios se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés), además se realizó la prueba de comparación de medias LSD ( $\alpha = 0.05$ ). En todos los casos, exceptuando a la variable de conteo de células con reserva, a los datos se les aplicó transformación logarítmica  $Z = \text{LOG}(Y + 1)$  para satisfacer los supuestos de las pruebas paramétricas. Se implementó el análisis de varianza con muestras repetidas, pero los resultados no mostraron autocorrelación entre evaluaciones, por lo que se hizo un ANOVA convencional cuyos factores de variación fueron los tratamientos y los periodos de evaluación.

Para el caso de conteo de hemocitos, excepto las fechas 28/01/20 y 30/03/20 y en el conteo de esporos en el parámetro intensidad, se realizó un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal- Wallis y comparación de medias con corrección de Bonferroni ( $\alpha = 0.05$ ). Para las variables en estudio se hizo una prueba de t ( $\alpha = 0.05$ ) para comparar los

niveles al principio y al final de los experimentos. El análisis estadístico se hizo con el programa R, librería *agricolae* (R Core Team, 2020; Mendiburu, 2020).

## V. RESULTADOS

### Identificación molecular de subespecies y haplotipos de abejas

La observación de las secuencias de nucleótidos de los amplicones obtenidos usando los iniciadores E2 y H2, permitió ubicar los sitios de restricción de la enzima DraI: TTT<sup>n</sup>AAA. Al simular *in silico* los cortes a los segmentos amplificados, se determinó la longitud de los segmentos resultantes, expresada en número de pares de bases. Las colonias 14, 15 y 20 fueron identificadas como del haplotipo A1, por la longitud de los segmentos de restricción como aparecen en el Cuadro 2 (Garnery *et al.*, 1993; Salamanca *et al.*, 2009). Estos autores definen los haplotipos A1 a A9 como de linaje africanizado pero no especifican a qué subespecie corresponde cada uno. Sin embargo, de acuerdo con Harpur *et al.* (2020), la subespecie *A. m. scutellata* es el principal componente de la invasión de las abejas africanas en América, por lo que las abejas determinadas como del haplotipo A1 se designan en este trabajo como dicha subespecie. Los tamaños de los segmentos varían por algunos pares de bases respecto a los previstos por los autores mencionados; esta variación se atribuye a la limpieza manual que se hizo al elaborar las secuencias consenso. Las demás colonias fueron identificadas como pertenecientes a otras subespecies, por lo que fueron descartadas para su uso como pies de cría.

**Cuadro 2.** Tamaño del segmento de ADN resultado del corte de la enzima DraI.

Colmena	Tamaño de segmentos de ADN (pares de bases)
14	50, 108, 477
15	41, 108, 468
20	50, 109, 440

### Identificación morfométrica de subespecies de abejas

De las 17 colmenas que se analizaron, se eligieron las tres que fueron identificadas como *A.m. scutellata* haplotipo A1 mediante la técnica molecular (colmenas 14, 15 y 20). En los tres casos se corroboró la identidad como abejas africanizadas mediante el método de Rinderer *et al.* (1993) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Resultado del análisis morfométrico para identificación de abejas africanizadas basado en Daly y Balling (1978) y Rinderer *et al.* (1993).

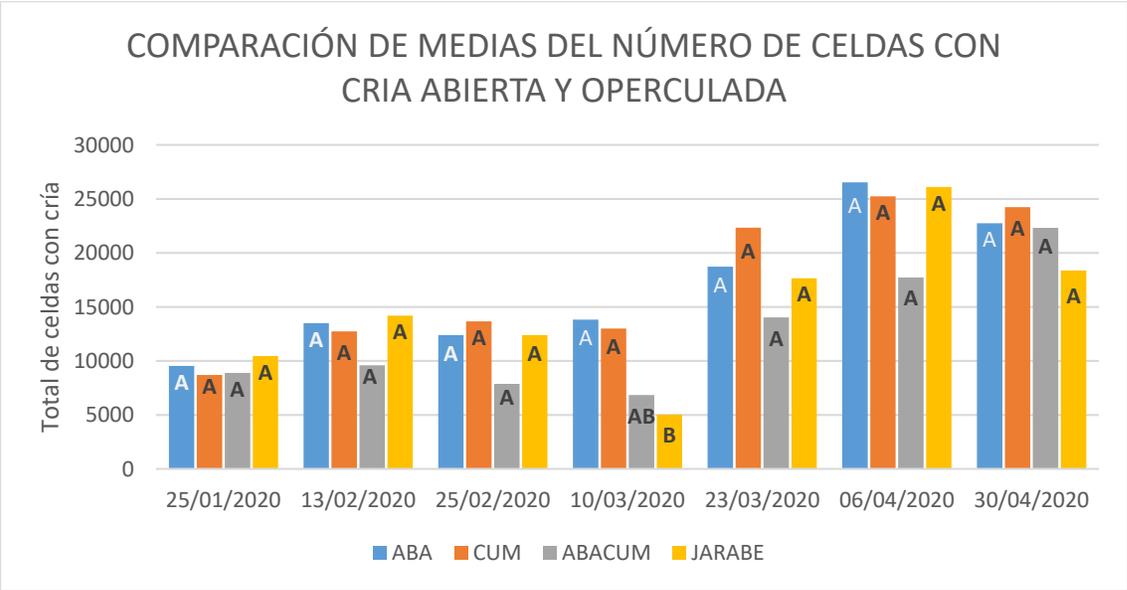
	Valor final*	Linaje africano	Linaje europeo
Colmena 14	2.661	X	
Colmena 15	2.724	X	
Colmena 20	2.755	X	

\*El valor 1.2669 es el punto medio entre africanizadas y europeas, arriba de este valor se consideran abejas con linaje africano y abajo de este valor se consideran abejas con linaje europeo (Rinderer *et al.*, 1993).

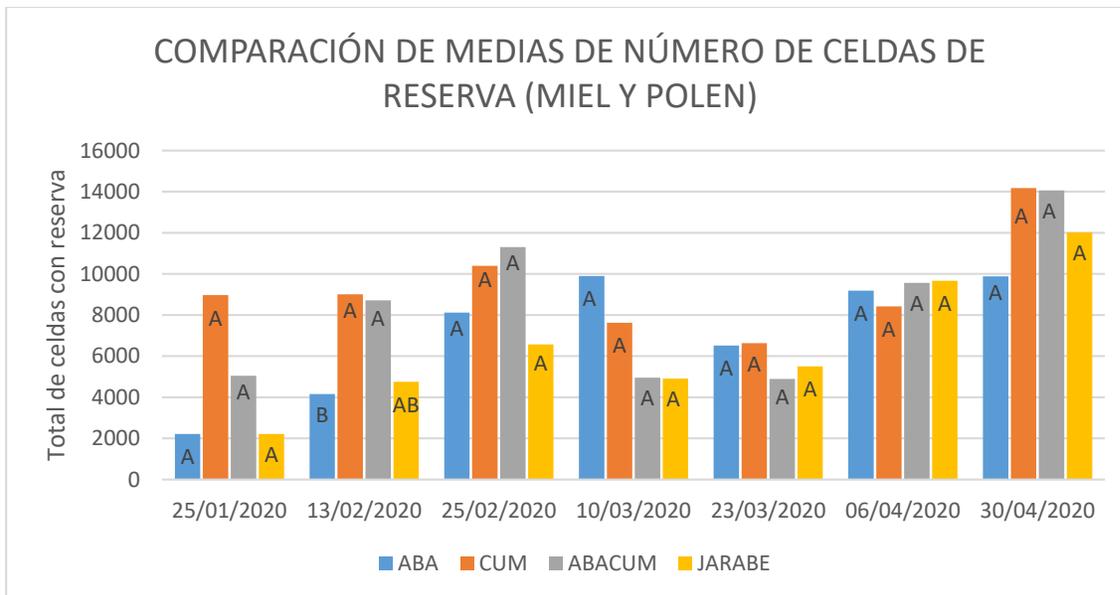
Se eligió a la colmena 14 como pie de cría sobre las colmenas 15 y 20 porque tenía mejor postura la reina y estaba suficientemente poblada de abejas y reserva (colmena fuerte), en comparación con las otras dos candidatas.

### Efectos de los suplementos dietarios en el crecimiento de los núcleos

A lo largo de las observaciones sucesivas, se registró un incremento en el número de celdas ocupadas por cría de abejas, donde los valores corresponden a la suma de cría abierta más operculada ( $p < 0.0001$ ) (Figura 14). De igual forma, las reservas de miel y polen aumentaron a lo largo de las observaciones ( $p < 0.0001$ ) (Figura 15). En contraste, no se observó diferencia significativa entre tratamientos, excepto en la cantidad de cría en la observación del día 10 de marzo de 2020, con cantidad de cría significativamente inferior en el tratamiento de jarabe (Figura 14), y en reservas de miel y polen en la observación del 13 de febrero de 2020, donde el valor fue significativamente menor en el tratamiento ABA (Figura 15).



**Figura 14.** Comparación de medias de la variable cría abierta y cría cerrada, las significancias para cada evaluación son: 25/01/20: P = 0.45; 13/02/20: P=0.47; 25/02/20: P= 0.22; 10/03/20: P= 0.0034; 23/03/20: P= 0.34; 06/04/20: P=0.43; 30/04/20: P=0.94. La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.

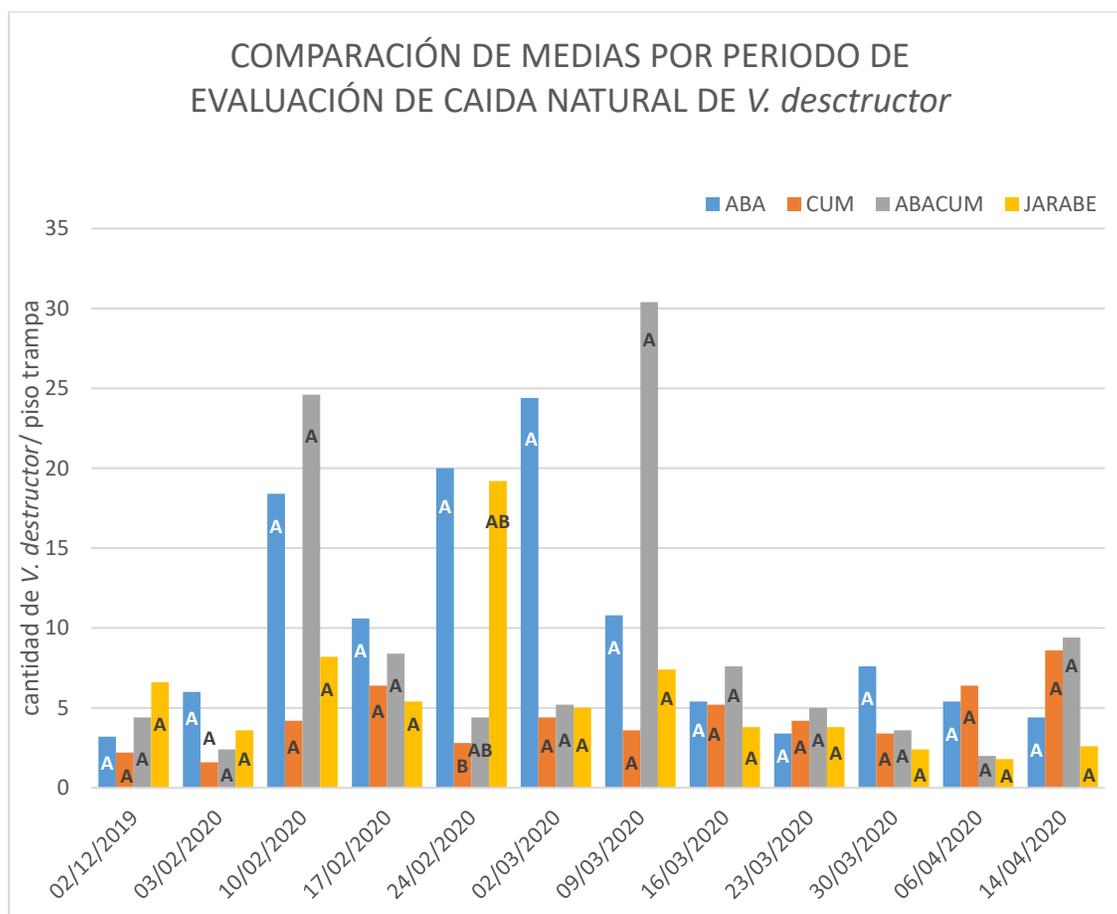


**Figura 15.** Comparación de medias de la variable reserva, las significancias para cada evaluación son: 25/01/20: P = 0.17; 13/02/20: P=0.08; 25/02/20: P= 0.21; 10/03/20: P= 0.77; 23/03/20: P= 0.78; 06/04/20: P=0.96; 30/04/20: P=0.45. La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.

### Monitoreo de *Varroa destructor*

La caída natural de *V. destructor* tuvo fluctuaciones irregulares, con elevados picos en el número de ejemplares caídos, los cuales se ubicaron en las evaluaciones llevadas a cabo entre el 10 de febrero y el 9 de marzo de 2020 (Figura 16). Estos picos no se asociaron a algún tratamiento en particular, aunque fueron más frecuentes en ABA (tres picos), que en ABACUM y jarabe (dos picos cada uno). No se observó ningún pico en caída natural de *V. destructor* en los núcleos alimentados con CUM. No se observó diferencia significativa entre la caída natural entre la primera y la última evaluación ( $p=0.318$ ).

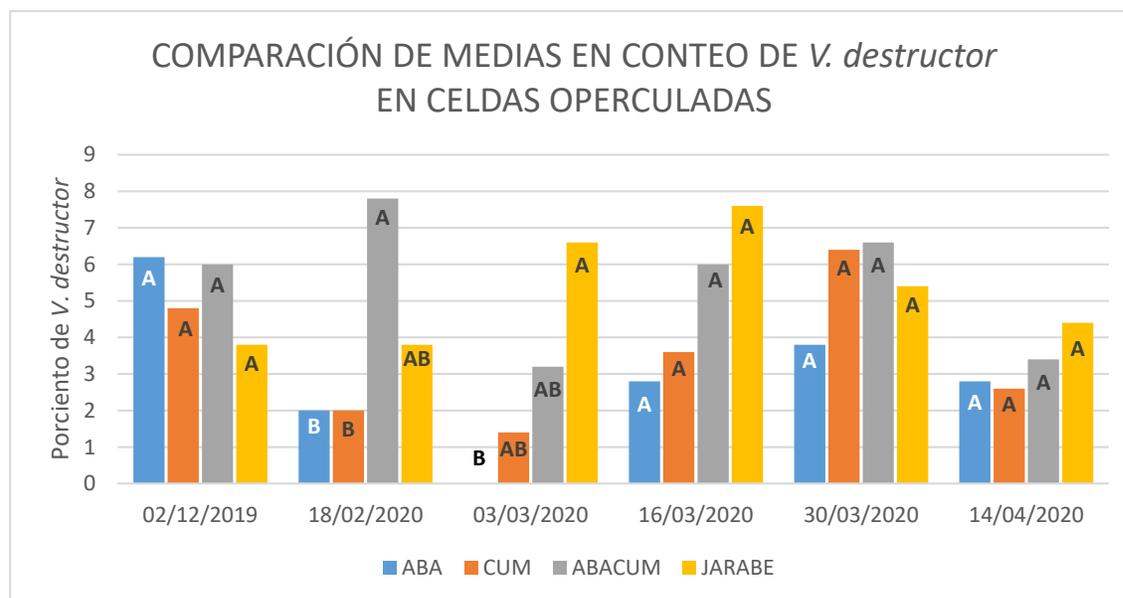
Por otra parte, no se observó un efecto consistente de ningún tratamiento en la caída natural de *V. destructor*, aunque en la evaluación llevada a cabo el 24 de febrero la caída natural fue significativamente menor en el tratamiento CUM (Figura 17).



**Figura 16.** Comparación de medias de la variable caída natural semanal de *V. destructor*, las significancias para cada evaluación son: 02/12/19: P = 0.71; 03/02/20: P=0.16; 10/02/20: P= 0.13; 17/02/20: P= 0.58; 24/02/20: P= 0.01; 02/03/20: P=0.06; 09/03/20: P=0.43; 16/03/20: P= 0.57, 23/03/20: P= 0.89; 30/03/20: P= 15; 06/04/20: P= 0.46; 14/04/20: P= 0.43 La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.

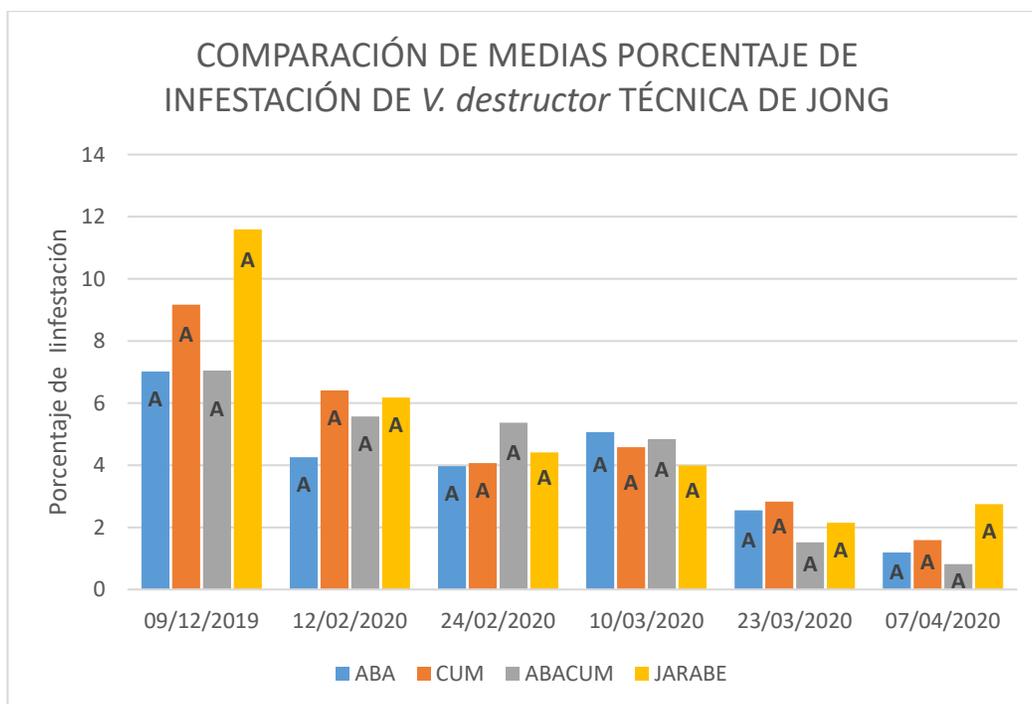
En el conteo de celdas operculadas infestadas por *V. destructor* se observó fluctuación irregular, con porcentajes de celdas infestadas que variaron entre 1.5 y 8 (Figura 17). No se observó una tendencia de aumento o disminución en el porcentaje de celdas infestadas; no hubo diferencia significativa ( $p=0.123$ ) entre las evaluaciones inicial y final.

De manera similar a lo ocurrido con la cantidad de cría y de reservas alimenticias, así como con la caída natural de *V. destructor*, en evaluaciones realizadas en febrero y marzo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, donde ABA y CUM tuvieron un porcentaje significativamente inferior de celdas infestadas (Figura 17).



**Figura 17.** Comparación de medias de la variable conteo de *V. destructor* en celdas operculadas, las significancias para cada evaluación son: 02/12/20: P = 0.86; 18/02/20: P=0.06; 03/03/20: P= 0.03; 16/03/20: P= 0.27; 30/03/20: P= 0.55; 14/04/20: P=0.85. La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.

En la última variable para estimar el nivel de infestación por *V. destructor*, la infestación por ejemplares foréticos sobre abejas obreras adultas mediante la técnica de Jong *et al.* (1982), presentó una disminución en el porcentaje de infestación, con diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) entre la primera evaluación y la última. En ninguna de las evaluaciones se observó diferencia significativa entre tratamientos (Figura 18).



**Figura 18.** Comparación de medias de la variable conteo de ejemplares foréticos de *V. destructor* por técnica de Jong *et al.* (1982), las significancias para cada evaluación son: 09/12/19: P = 0.57; 12/02/2020: P=0.40; 24/02/20: P= 0.81; 10/03/20: P= 0.92; 23/03/20: P= 0.81; 07/04/20: P=0.37. La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.

### Identificación de *Nosema spp.*

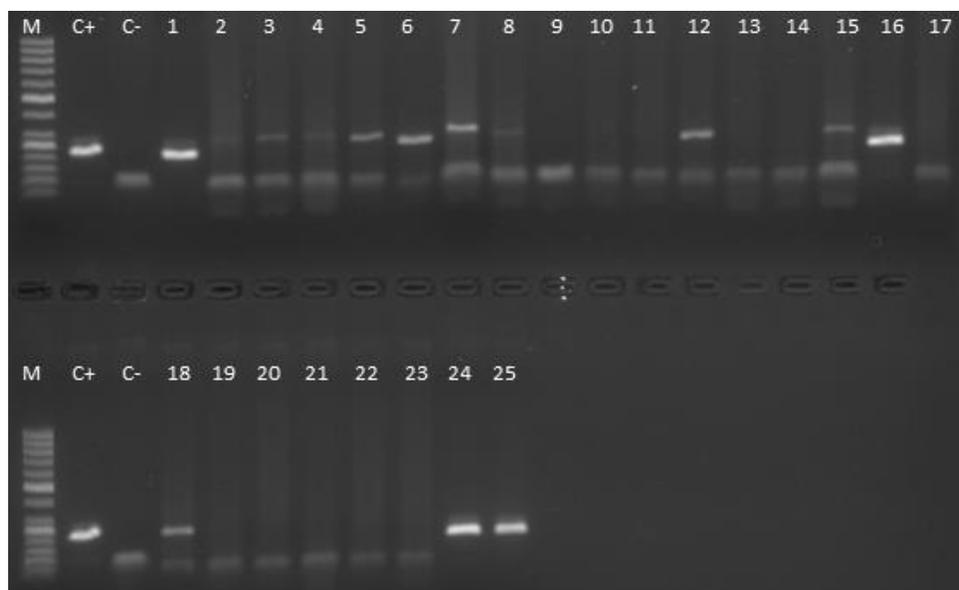
Como resultado de la PCR usando los iniciadores específicos para la detección de *N. apis*, en ninguna de las muestras se observó amplificación (Figura 19), por lo que todas las colmenas se consideran negativas a la infección por este patógeno. En contraste, cuando se usaron los iniciadores específicos para la detección de *N. ceranae*, los núcleos 1,2,3,4,5,6,7,8,12,14,15,16,17,21,24 y 25 resultaron positivos a la infección por esta segunda especie (Figura 20).

Se analizaron secuencias de núcleos selectos procesadas por CENAPA: 1, 16 y 24. Cuando se les alineó con secuencias depositadas en el GenBank (BLAST, usando el programa MEGA versión 10.0.5), éstas presentaron alta similitud y cobertura expresadas

en porcentaje, con lo que se confirmó la identidad de *N. ceranae* en las colmenas listadas (Cuadro 4).



**Figura 19.** Electroforesis correspondiente a *Nosema apis* a. Es: escalera, Cx+: testigo positivo, Cx-: testigo negativo, los números del 1 al 25 corresponden al número de colmena.



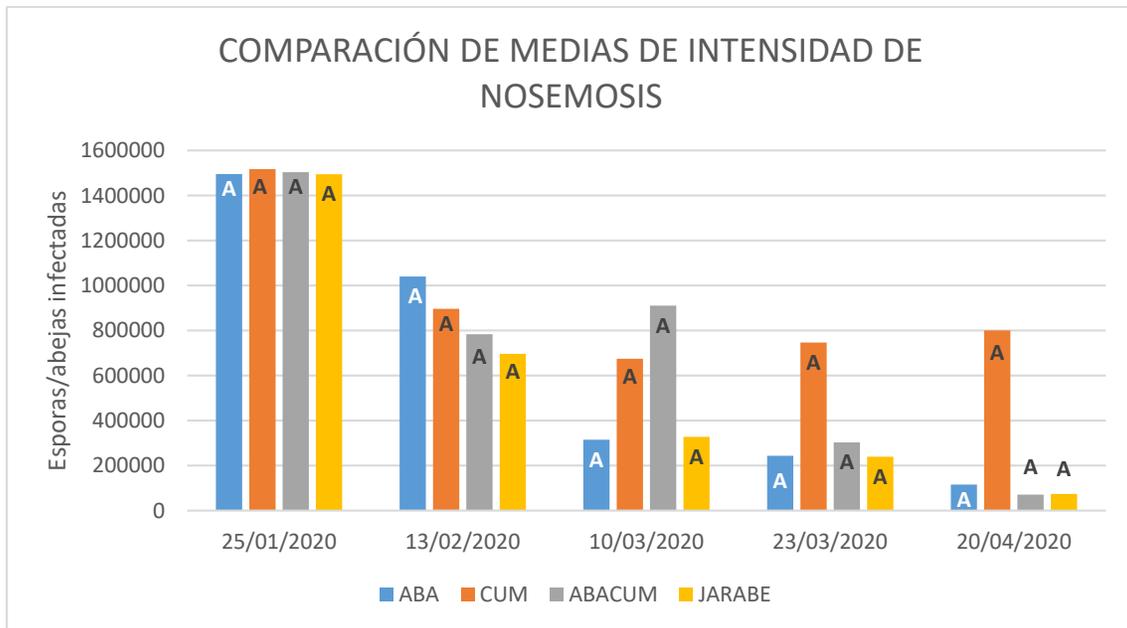
**Figura 20.** Electroforesis correspondiente a *Nosema ceranae*. M: escalera, C+: testigo positivo, C-: testigo negativo, la numeración de 1-25 corresponde al número de colmena.

**Cuadro 4.** Identificación molecular de *N. ceranae* por similitud con secuencias de nucleótidos del gen de RNA ribosomal, subunidad menor.

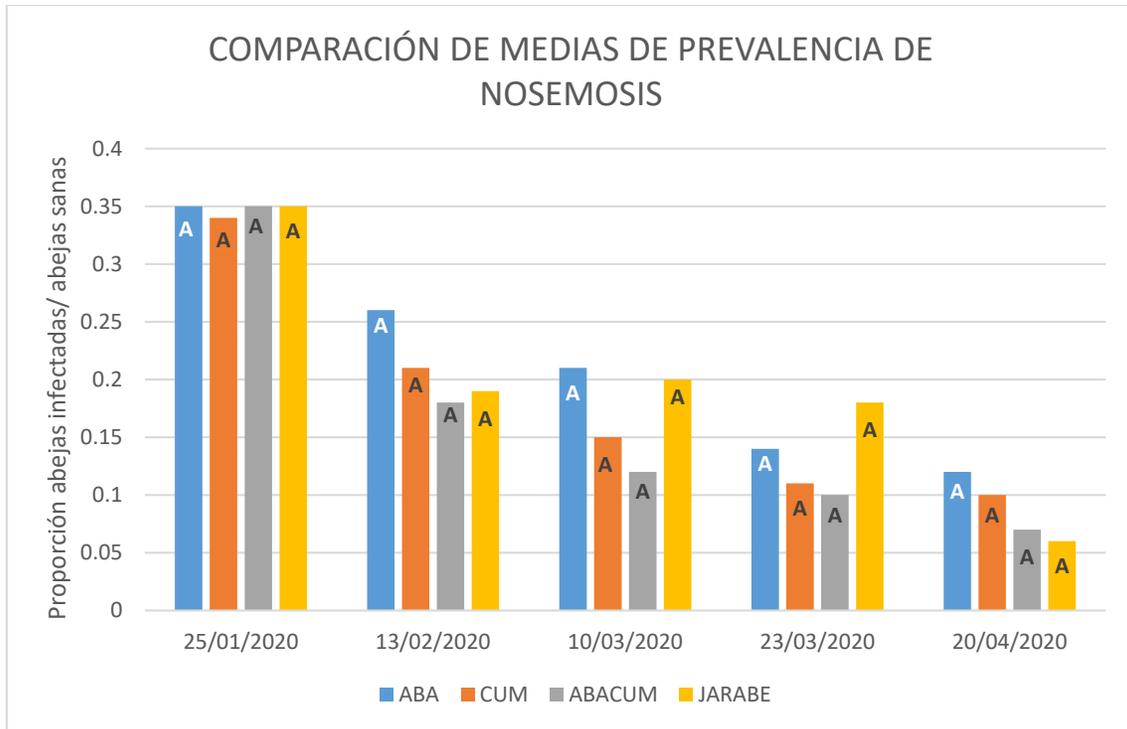
Núcleo	Secuencia con máxima similitud	Cobertura	Porcentaje de similitud	Clave de acceso
1	<i>Nosema ceranae</i> aislamiento NC67, secuencia parcial de la unidad menor del gen del ARN ribosomal	100%	100%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1916436001 MW092909.1">gi 1916436001 MW092909.1</a>
16	<i>Nosema ceranae</i> aislamiento NC67, secuencia parcial de la unidad menor del gen del ARN ribosomal	100%	99.55%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1916436001 MW092909.1">gi 1916436001 MW092909.1</a>
24	<i>Nosema ceranae</i> aislamiento CR1 secuencia parcial de la unidad menor del gen del ARN ribosomal	100%	100%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 383281298 JQ639307.1">gi 383281298 JQ639307.1</a>

### Cuantificación de esporos de *Nosema ceranae*

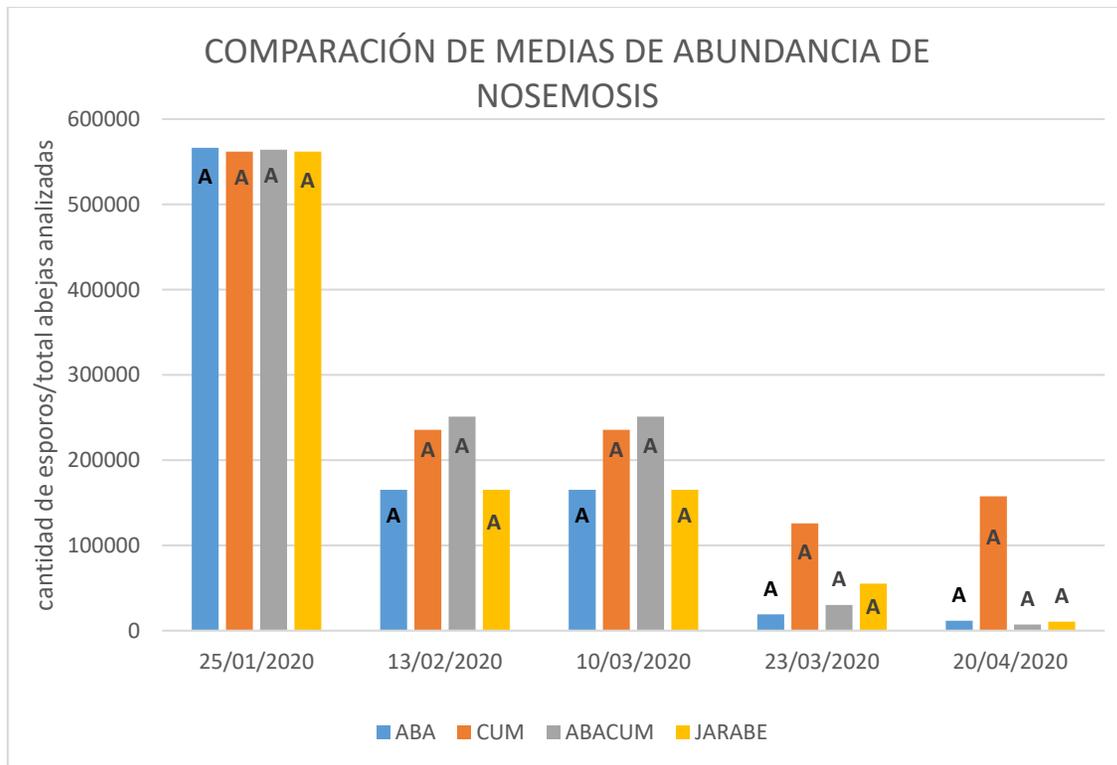
La infección de los núcleos experimentales por *N. ceranae* se evaluó por tres las variables de respuesta, intensidad, prevalencia y abundancia. En las tres variables se observó que a lo largo de las evaluaciones sucesivas los valores disminuyeron, con diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) entre la primera y la última evaluación (Figuras 21, 22 y 23 para intensidad, prevalencia y abundancia, respectivamente). En ninguna de las tres variables de respuesta se observó diferencia significativa entre tratamientos, en todas las evaluaciones sucesivas.



**Figura 21.** Comparación de medias de la variable intensidad. Significancias: 25/01/20:  $p = 0.998$ ; 13/02/20:  $p = 0.827$ ; 10/03/20:  $p = 0.707$ ; 23/03/20:  $p = 0.22$ ; 20/04/20:  $p = 0.118$ . La comparación de medias (Bonferroni) es válida dentro de cada evaluación.



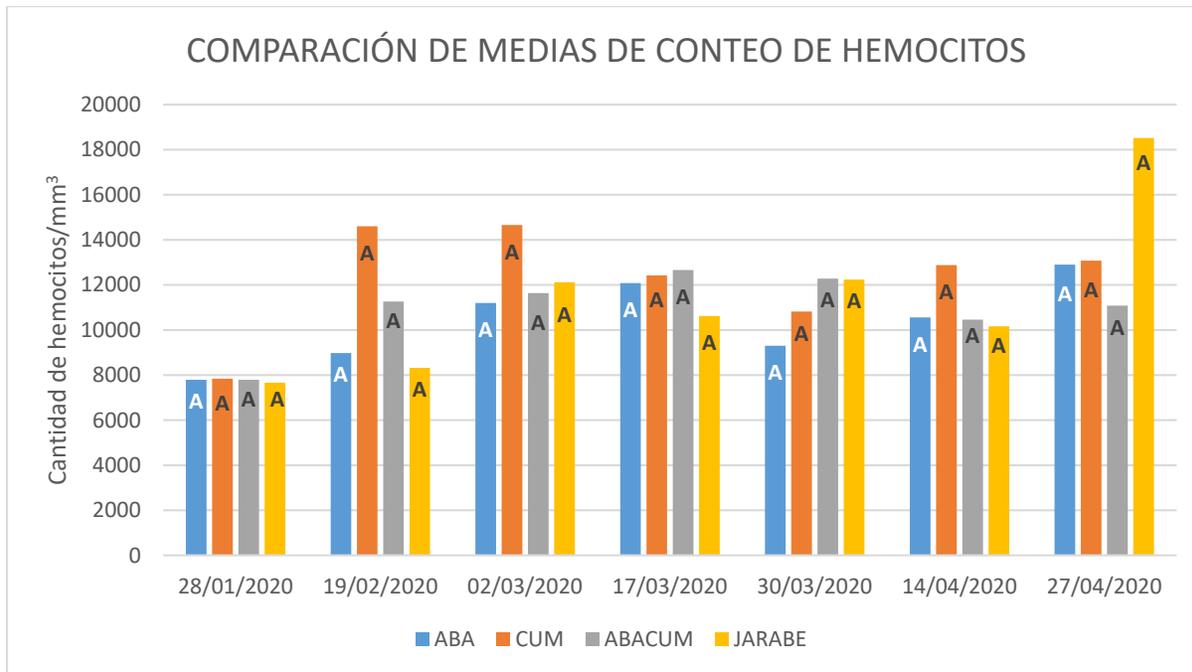
**Figura 22.** Comparación de medias de la variable prevalencia, las significancias para cada evaluación son: 25/01/20:  $P = 0.80$ ; 13/02/20:  $P=0.34$ ; 10/03/20:  $P= 0.46$ ; 23/03/20:  $p= 0.10$ ; 20/04/20:  $P=0.72$ . La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.



**Figura 23.** Comparación de medias de la variable abundancia, las significancias para cada evaluación son: 25/01/20:  $P = 0.998$ ; 13/02/20:  $P=0.827$ ; 10/03/20:  $P= 0.707$ ; 23/03/20:  $P= 0.22$ ; 20/04/20:  $P= 0.118$ . La comparación de medias (LSD) es válida dentro de cada evaluación.

### Cuantificación de hemocitos

La concentración de hemocitos aumentó en la hemolinfa de las abejas entre la primera evaluación y la última ( $p<0.0001$ ), sin diferencia significativa entre tratamientos en las distintas evaluaciones (Figura 24).



**Figura 24.** Comparación de medias de la variable conteo de hemocitos, las significancias para cada evaluación son: 28/01/20: P = 0.91; 19/02/20: p=0.14; 02/03/20: P= 0.77; 17/03/20: p= 0.67; 30/03/20: P= 0.88; 14/04/20: p=0.39, 27/04/20: p=0.56. La comparación de medias (LSD-Bonferroni) es válida dentro de cada evaluación.

## VI. DISCUSIÓN

Al comparar la cantidad de cría en los núcleos experimentales (suma de cría abierta y operculada) a lo largo de las evaluaciones sucesivas, no hubo diferencias significativas entre tratamientos, por lo cual podemos afirmar que, al menos en las dosis que se manejaron de ABA y CUM en abejas africanizadas, estos productos y la combinación de ellos no tuvieron efecto en el crecimiento poblacional de los núcleos. Los resultados coinciden con los de Szawarski *et al.* (2019), quienes no obtuvieron diferencias significativas entre suplementar únicamente con miel, comparado con suplementar miel más ABA en el desarrollo o, en su caso, mantenimiento de cría durante el periodo

invernal. Sin embargo, los autores citados sí observaron diferencias significativas en la cantidad de abejas adultas al final del invierno, asociada al suplemento con ABA.

Para la variable reservas de miel y polen tampoco hubo diferencias significativas entre tratamientos. Cabe destacar que ambas variables: cuantificación de cría y cantidad de alimentos de reserva, tuvieron un incremento significativo entre la primera y última evaluación en ambos casos ( $p < 0.0001$ ). Se postula que esto se debió a que durante el trabajo experimental en la zona hubo floración, con lo cual los núcleos de todos los tratamientos tuvieron suficientes fuentes de nutrientes para lograr desarrollarse, si bien el suplemento que les fue administrado semanalmente fue consumido en su totalidad.

El experimento se instaló en un ambiente casi urbano, de pobres recursos nectapoliníferos, y se desarrolló en una época de escasez de miel y polen, de manera que los suplementos alimenticios fueran la única fuente de alimento, y con ello las abejas se vieran forzadas a consumirlo para poner en evidencia el efecto de ABA y CUM. Pese a ello, los núcleos experimentales almacenaron reservas, lo que indica que recolectaron miel y polen. En el presente estudio se seleccionaron intencionalmente abejas africanizadas por ser el componente dominante y representativo de las abejas en México y en amplias zonas de América tropical. Las abejas de este linaje son resistentes y activas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011), lo que les permitió prosperar, aun en las condiciones difíciles que se les impusieron. Sin embargo, al contar con una fuente externa de alimento, los suplementos administrados pudieron ser almacenados o al menos se diluyeron con néctar recolectado por abejas pecoreadoras, lo que pudo enmascarar su efecto. Este hecho podría explicar por qué las colonias suplementadas con ABA y CUM no tuvieron diferencias significativas en cantidad de cría y reservas de alimento, comparadas con el testigo suplementado sólo con jarabe de azúcar, a diferencia de lo observado por Negri *et al.* (2015), quienes demostraron que colmenas suplementadas con jarabe que contenía ABA llegan a tener hasta un 70% de mayor población comparada con el testigo.

Según Negri *et al.* (2015), ABA induce a la producción de óxido nítrico en las células, el cual participa en la respuesta celular que tiene *A. mellifera* y promueve la cicatrización en heridas. Esto puede ser beneficioso luego de que la hembra de *V. destructor* dañe la cutícula. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se decidió monitorear el comportamiento de *V. destructor* durante la administración de ABA y CUM; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las variables estudiadas: caída natural, prevalencia en celdas operculadas ni infestación en abejas adultas (ácaros foréticos). Al comparar la infestación de *V. destructor* entre la primera y la última evaluación, la única variable que resultó con diferencias significativas ( $p > 0.0001$ ) fue la cantidad de ejemplares foréticos en abejas adultas. De manera consistente, hubo disminución de *V. destructor* durante el tiempo de estudio en todos los tratamientos, por lo que no se puede determinar que alguno de ellos tuvo efecto en la infestación de dicho ácaro, sino más bien la disminución en la infestación se puede asociar con el aumento en la población de abejas en los núcleos, derivada del hecho de que las abejas experimentales almacenaron miel y polen. Se postula que la aparente disminución en la infestación por *V. destructor* es más bien una “dilución”, esto es, la población existente de este ácaro se distribuyó en una mayor población de sus hospedantes. En México, la NOM001-ZOO-1994 (Diario Oficial de la Federación, 2005) recomienda que a partir de 5 % de infestación por ejemplares foréticos de *V. destructor* en abejas adultas, se aplique un tratamiento contra este ácaro; durante todo el trabajo experimental, aunque las colmenas tuvieron alrededor de ese porcentaje, lograron desarrollarse sin problemas evidentes (como se comprobó en el desarrollo de cría) sin un tratamiento acaricida. Las abejas africanizadas, como las usadas en este experimento, tienen cierta tolerancia a *V. destructor*, como lo demostraron Medina-Flores *et al.* (2014) y Reyes-Quintana *et al.* (2019), lo cual es una razón adicional para que ni ABA ni CUM hayan tenido un efecto significativo.

No se detectó a *N. apis* en ninguna de las colonias con las que se inició el estudio. Al parecer esta especie predomina en el noroeste de México (Cueto *et al.*, 2019), mientras que en el sur de este país prevalece *N. ceranae*, según datos del presente estudio y los de Fleites-Ayil *et al.* (2018). Szawarski *et al.* (2019) observaron que el nivel de individuos

parasitados por *Nosema* sp. (prevalencia) incrementó significativamente en abejas sin suplementación con ABA, lo que indicó que ABA puede suprimir el desarrollo de nosemosis a nivel colonia durante el invierno. Sin embargo, a nivel individuo no obtuvieron diferencias significativas (intensidad). Según Botías *et al.* (2013), la mejor manera de evaluar salud en la colmena es mediante el parámetro prevalencia. En este trabajo no hubo diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros (intensidad, prevalencia y abundancia); sin embargo, sí hubo diferencias significativas entre la primera y última evaluación: intensidad ( $p < 0.0001$ ), prevalencia ( $p < 0.0001$ ) y abundancia ( $p < 0.0001$ ), lo cual se entiende en una disminución drástica de esporos, comparando el inicio del trabajo con las cifras finales en todos los tratamientos analizados. Se sugiere que esto se debió a que los núcleos experimentales almacenaron miel y polen, con lo que se fortalecieron y con ello hubo una renovación de abejas que permitió disminuir la cantidad de esporos en la colmena. El nivel de infección en promedio de todas los núcleos al inicio del trabajo y para el parámetro abundancia fue alrededor de 564,000 esporos/  $\mu\text{L}$ , la cual es una infección leve de acuerdo con la tabla de Jaycox (Diario Oficial de la Federación, 1999). Al final del trabajo los núcleos tuvieron en promedio 46 800 esporos /  $\mu\text{L}$ , una cifra más baja que las establecidas en la tabla de Jaycox. Pese a que el apiario se instaló en una zona ya conurbada pobre en recursos florales, conforme las colmenas se desarrollaron el conteo de esporas de *N. ceranae* bajó drásticamente, lo cual sugiere que, en la zona de estudio, la nosemosis no representa un problema para las abejas africanizadas, en tanto sean capaces de recolectar suficiente alimento para sostener un incremento poblacional.

La cantidad de hemocitos a lo largo del experimento no mostró diferencias significativas entre tratamientos. Luego de suplementar a colonias de abejas con jarabe adicionado con ABA, Negri *et al.* (2015) no registraron un aumento en el número total de hemocitos, lo que concuerda con lo obtenido en el presente trabajo. Schmid *et al.* (2008) encontraron que la cantidad de hemocitos en la hemolinfa disminuye conforme las abejas envejecen; aunque sin significancia, en este trabajo se observó un incremento entre el inicio y el final del experimento en la cantidad de hemocitos, lo que atribuimos a una reducción en la edad promedio de las abejas adultas, gracias a la entrada de la floración y al subsecuente

desarrollo de los núcleos. Dichos autores estimaron concentraciones de hemocitos entre 6 000 y 18 000/ $\mu\text{l}$ , valores similares a los observados en el presente estudio. Por su parte, Reyes-Quintana *et al.* (2019) observaron que abejas africanizadas recién emergidas y parasitadas por *V. destructor* tenían una concentración de hemocitos de  $1291 \pm 81/\mu\text{L}$ , significativamente menor que los  $1834 \pm 129$  hemocitos/ $\mu\text{L}$  en abejas no parasitadas, lo que difiere de lo encontrado en este trabajo, donde la concentración de hemocitos es aproximadamente 10 veces mayor, en el cual no se determinó si las abejas en las que se midió la concentración de hemocitos habían sido parasitadas por *V. destructor*, sin embargo, no tuvieron ningún tipo de tratamiento acaricida previo y la infestación en abejas adultas osciló alrededor de 4.5%.

## VII. CONCLUSIONES

De manera consistente, en todas las variables de respuesta evaluadas para determinar el posible efecto de ABA, CUM y la combinación de ambos productos (ABACUM), no se observaron los efectos citados en estudios previos; por ejemplo, incremento en población o acumulación de reserva o algún fortalecimiento del sistema inmune, que pudiera resultar en una disminución en la infección por *Nosema* spp. o infestación por *V. destructor*. Lo anterior no descarta que los productos citados podrían tener algún efecto benéfico en las abejas, pero muestra que su efecto puede verse oculto cuando las abejas suplementadas con esos productos tienen otra fuente de alimento, como la recolección natural de néctar, tal como ocurrió en el presente trabajo y por el tiempo de abeja, africanizada, ya que, hasta la fecha, únicamente se había probado estos metabolitos en abejas europeas.

La escasa información sobre la cantidad de hemocitos en abejas y la discrepancia entre los datos reportados en los trabajos llevados a cabo, hace evidente la necesidad de ampliar la información sobre el conteo de hemocitos en los diferentes estados de desarrollo de *A. mellifera*.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. y Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562–565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>

Anderson, D. L. y Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari : Varroidae ) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 165–189. DOI: 10.1023/A:1006456720416

Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F. y Blot, N. (2014). Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS ONE*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091686>

Azzouz-olden, F., Hunt, A. y DeGrandi-Hoffman, G. (2018). Transcriptional response of honey bee (*Apis mellifera*) to differential nutritional status and *Nosema* infection. *BMC Genomics*, 19(628), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5007-0>

Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A. y Higes, M. (2013). *Nosema spp* . infection and its negative effects on honey bees ( *Apis mellifera iberiensis* ) at the colony level. *Research in Veterinary Science*, 95, 1041-1045. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.09.012>

Bruzzone, S., Moreschi, I., Usai, C., Guida, L., Damonte, G., Salis, A., Scarfi, S., Millo, E., De Flora, A. y Zocchi, E. (2007). Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14), 5759–5764. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609379104>

Buitimea-Cantúa, N. E., Torres-Chávez, P. I., Ramírez-Wong, B., Ledesma-Osuna, A. I., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Guerrero, D. A. y Serna-Saldívar, S. O. (2018). Ferulic, p-cumaric, diferulic and triferulic acids contents of corn tortillas prepared with extruded corn

flour and enriched with sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) bran. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12,1633-1640.

Cha, H., Lee, S., Lee, J. H. y Park, J. W. (2018). Protective effects of p-coumaric acid against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 131-139. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.060>

Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B. y 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. 97(2008), 186–188. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.010>

Chiremba, C., Taylor, J. R. N., Rooney, L. W. y Beta, T. (2012). Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Food Chemistry*, 134(1), 81–88. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.02.067>

Clarke, K. E., Rinderer, T. E., Franck, P., Quezada-Euán, J. G. y Oldroyd, B. P. (2002). The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: A study of a massive hybridization event across time. *Evolution*, 56(7), 1462–1474. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01458.x>

Cornuet, J. M. y Garnery, L. (1991). Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie*, 22, 627–642. <https://doi.org/10.1051/apido:19910606>

Côté, M. J. (Canadian F. I. A. (2007). Identification of *Tetranychus* species using Polymerase Chain Reaction (PCR) based methods. Canadian Food Inspection Agency. 1-9.

Cueto, G. S. A., López, V. G., Orozco, C. C., Gómez, G. S. D., Moreno, T. K., Espinoza, B. K. O., Guerrero, V. J. G., Silva, P. L. E., Trasviña, M. E. y Monge, N. F. J. (2019).

Prevalence and geographical distribution of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in apiaries of Northwest Mexico using a duplex real-time PCR with melting-curve analysis curve analysis. *Journal of Apicultural Research*, 59(2), 195-203. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1676999>.

Dadant, C. (1975). *La colmena y la abeja melífera*. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay 270 pp.

Daly, H. V. y Balling, S. S. (1978). Identification of africanized honeybees in the western hemisphere by discriminant analysis. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 51 (4), 857-869.

Danka, R. G., Hellmich, R. L., Rinderer, T. E. y Collins, A. M. (1987). Diet-selection ecology of tropically and temperately adapted honey bees. *Animal Behaviour*, 35, 1858–1863. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(87\)80078-7](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(87)80078-7)

De Jong, D., De Andrea, R. D. y Gonçalves, L. S. (1982). A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. *Apidologie*, 13(3), 297–306. <https://doi.org/10.1051/apido:19820308>

Delaplane, K. S., van der Steen, J. y Guzman-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–12. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>

Demedio, J. (2010). *Guía Técnica de Sanidad Apícola*. Proyecto Apícola Swisscontact FOMIN-BID., Honduras, 1–86.

Diario Oficial de la Federación (1999) Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/563490/NOM-056-ZOO-1995.pdf>

Diario Oficial de la Federación (2005) Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Varroasis de las Abejas. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:SEGUNDA+SECCION+SECRETARIA+DE+AGRICULTURA+,+GANADERIA+,#0>

Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P. y Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–55. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>

Domínguez-Ayala, R., Moo-Valle, H., May-Itzá, W. J., Medina-Peralta, S. y Quezada-Euán, J. J. G. (2015). Stock composition of northern neotropical honey bees : mitotype and morphotype diversity in Mexico (Hymenoptera : Apidae). *Apidologie*, 47 (5). 642-652. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0414-6>

Dussaubat, C., Brunet, J. L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J. H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L. P., Moritz, R. F. A., Le Conte, Y. y Alaux, C. (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(5), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037017>

Eguaras M. y Ruffinengo S. (2006). Estrategias para el control de Varroa. Ed. Martin, Mar del Plata.

Eleftherianos, I. y Revenis, C. (2011). Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *Innate Immunity*, 3, 28–33. <https://doi.org/10.1159/000321931>

Fewell, J. H. y Bertram, S. M. (2002). Evidence for genetic variation in worker task performance by African and European honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52, 318–325. <https://doi.org/10.1007/s00265-002-0501-3>

Fleites-Ayil, F. A., Quezada-Euán, J. J. y Medina-Medina, L. A. (2018). Onset of foraging and lifespan of africanized honey bees (*Apis mellifera*) infected with different levels of *nosema ceranae* spores in neotropical Mexico. *Apidologie*, 49,781-788. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0602-2>

Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M. y Cornuet, J. (2001). Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86, 420–430.

Franck, P., Garney, L., Solignac, M. y Cornuet, J.-M. (2000). Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*, 31, 167–180.

Fries, I., Hansen, H., Imdorf, A. y Rosenkranz, P. (2003). Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie*, 34, 389–397. <https://doi.org/10.1051/apido:200332>

Fries, I., Chauzat, M., Chen, Y., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R., Tanner, G., Webster, T. y Williams, G. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1), 1-29. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>

Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G. y Cornuet, J. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* 49, 1016–1021.

Garrido, P. M., Martin, M. L., Negri, P. y Eguaras, M. J. (2013). A standardized method to extract and store haemolymph from *Apis mellifera* and the ectoparasite *Varroa destructor* for protein analysis. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 67–68. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.13>

Gisder, S., Schüler, V., Horchler, L. L., Groth, D. y Paxton, R. J. (2017). Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp . Infection prevalence in northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees ( *Apis mellifera* ), but no general replacement of *Nosema apis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(301), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00301>

Goblirsch, M., Huang, Z. Y. y Spivak, M. (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE*, 8(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058165>

Guerrero-Molina, C., Correa-Benítez, A., Hamiduzzaman, M., y Guzman-Novoa, E. (2016). *Nosema ceranae* is an old resident of honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico , causing infection levels of one million spores per bee or higher during summer and fall. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141, 38–40. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.001>

Guzman-Novoa, E.(1981). Contribución al Estudio de la Nosemiasis de las Abejas (DVM thesis). Universidad Nacional de México, Ciudad de México , México. 46 pp.

Guzman-Novoa, E., Emsen, B., Unger, P., Espinosa-Montaño, L. G. y Petukhova, T. (2012). Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3), 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.020>

Harpur B.A., Kadri S.M., Orsi R.O., Whitfield C.W., Zayed A. 2020. Defense response in brazilian honey bees (*Apis mellifera scutellata* spp.) is underpinned by complex patterns of admixture. *Genome Biol. Evol.* 12(8):1367–1377. doi:10.1093/gbe/evaa128

Hernández, M. L., Arechavaleta, M. E., Elizalde, S. M. y Bacilio, L. E. (2016). Principales enfermedades virales en abejas melíferas. Folleto 3, Centro Nacional de Investigación

disciplinarian en Microbiología Animal Cuajimalpa, Cd de México. ISBN: 978-607-37-06414. [www.inifap.gob.mx/Documents/transparencia/Estudios\\_Opiniones/2017/.../37.pdf](http://www.inifap.gob.mx/Documents/transparencia/Estudios_Opiniones/2017/.../37.pdf)

Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón E. y Meana, A. (2006b). An approach to *Nosema ceranae* control with fumagillin in field conditions. In: Vesely, V., Vorčehovská, M., Titeřra, D. (Eds.), Proceedings of the Second European Conference of Apidology EurBee, Prague, Czech Republic. Bee Research Institute. Dol, Czech Republic, p. 33.

Huang, W., Solter, L., Aronstein, K. y Huang, Z. (2015). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. Journal of invertebrate pathology, 124, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.006>

Isidorov, V. A., Isidorova, A. G., Szczepaniak, L. y Czyzewska, U. (2009). Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. Food Chemistry, 115(3), 1056–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.025>

Jorge, R., Furtado, N. A. J. C., Sousa, J. P. B., Da Silva Filho, A. A., Gregório Junior, L. E., Martins, C. H. G., Soares, A. E. E., Bastos, J. K., Cunha, W. R. y Silva, M. L. A. (2008). Brazilian propolis: seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. Pharmaceutical Biology, 46(12), 889–893. <https://doi.org/10.1080/13880200802370373>

Kerr, W. E. (1967) The history of the introduction of africanized bees in Brazil. South African Bee Journal, 39, 3–5.

Kumazawa, S., Hamasaka, T. y Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry, 84(3), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)

Kurze, C., Dosselli, R., Grassl, J., Le Conte, Y., Kryger, P., Baer, B. y Moritz, R. F. A. (2016). Differential proteomics reveals novel insights into *Nosema*–honey bee interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 79, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.10.005>

Labougle, J. M. y Zozaya, R. J. A. (1986) La apicultura en México. *Ciencia y Desarrollo* 69:17-36.

Larsen, A., Reynaldi, F. J. y Guzmán-Novoa, E. (2019). Bases del sistema inmune de la abeja melífera (*Apis mellifera*). Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(3), 705–728. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>

Le Conte, Y., Ellis, M. y Ritter, W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health : can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41(3), 353–363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>

Li, W., Chen, Y. y Cook, S. C. (2018). Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. In *International Journal for Parasitology*, 48 (6), 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.11.004>

Lipp, J. (1990). Nachweis und Herkunft von Abscisinsäure und Prolin in Honig. *Apidologie*, 21, 249–259.

Llenderal, C., C. y J. Cibrián T. 1983. *Prácticas de Fisiología de Insectos*. Colegio de Postgraduados. México. 119 p.

Lodesani, M., Pellacani, A., Bergomi, S., Carpana, E., Rabitti, T. and Lasagni, P. (1992). Residue determination from some products used against *Varroa infestation* in bees. *Apidologie*, 23: 257-272. <https://doi.org/10.1051/apido:19920309>

Lopez, M. I., Pettis, J. S., Smith, I. B. y Chu, P. S. (2008). Multiclass Determination and Confirmation of Antibiotic Residues in Honey Using LC-MS / MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (5), 1553–1559.

Maggi, M., Ruffinengo, S., Damiani, N., Sardella, N., Eguaras, M. (2009). A first detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp. App. Acarol.* 47(4), 317–320.

Mao, W., Schuler, M. A. y Berenbaum, M. R. (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 8842–8846. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303884110>

Mao, W., Schuler, M. A. y Berenbaum, M. R. (2015). A dietary phytochemical alters caste-associated gene expression in honey bees. *Science Advances*, 1(7), 1–10.

Marringa, W. J., Krueger, M. J., Burritt, N. L. y Burritt, J. B. (2014). Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. *Plos ONE*, 9(10), 39–41. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108486>

Martín-Hernández R., M. Aránzazu, L. Prieto, A. Martínez Salvador, E. Garrido-Bailón, M. Hige. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6331–6338.

Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M. A., Soroker, V. y Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1302–1329. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14103>

Meana, A., Martín-Hernández, R. y Higes, M. (2015). The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 49 (2), 212-214. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.12>

Medina-Flores, C. A., Guzmán-Novoa, E., Espinosa-Montaño, L. G., Uribe-Rubio, J. L., Gutiérrez-Luna, R. y Gutiérrez-Piña, F. J. (2014). Frecuencia de varroosis y nosemosis en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en el estado de Zacatecas, México. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 20(3), 159–167. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.08.028>

Mendiburu, de F. (2020). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-3. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

Moffett, J. O., Maki, D. L., Andre, T. y Fierro, M. (1987). The Africanized Bee in Chiapas, Mexico. *American Bee Journal*, 127(7), 517–519.

Nardi, J. B., Pilas, B., Mark, C., Zhuang, S., Garsha, K. y Kanost, M. R. (2006). Neuroglial-positive plasmacytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces. 30, 447–462. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.026>

Nation, J. L. 2016. Immunity. In: *Insect Physiology and Biochemistry*. Third Ed. CRC Press, FL, USA,433-447.

Negri, P., Maggi, M., Correa-Aragunde, N., Brasesco, C., Eguaras, M. y Lamattina, L. (2013). Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. *Apidologie*, 44(5), 575–585. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0207-8>

Negri, P., Quintana, S., Maggi, M., Szawarski, N., Lamattina, L. y Eguaras, M. (2014). *Apis mellifera* hemocytes generate increased amounts of nitric oxide in response to

wounding / encapsulation. *Apidologie*, 45, 610–617. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0279-0>

Negri, P., Maggi, M. D., Ramirez, L., De Feudis, L., Szwarski, N., Quintana, S., Eguaras, M. J. y Lamattina, L. (2015). Abscisic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. *Apidologie*, 46(4), 542–557. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0345-7>

Nganso, B. T., Fombong, A. T., Yusuf, A. A., Pirk, C. W. W., Stuhl, C. y Torto, B. (2017). Hygienic and grooming behaviors in African and European honeybees - New damage categories in *Varroa destructor*. *PLoS ONE*, 12(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179329>

Nielsen, D. I., Ebert, P. R., Page, R. E., Hunt, G. J. y Guzman-Novoa, E. (2000). Improved polymerase chain reaction-based mitochondrial genotype assay for identification of the Africanized Honey Bee (Hymenoptera Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93(1), 1–6. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2000\)093\[0001:ipcrbm\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[0001:ipcrbm]2.0.co;2)

Paxton, R. J. (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause “ Colony Collapse Disorder ” in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*, 49 (1), 80-84. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.11>

Prendas-Rojas, J., Figueroa-Mata, G., Ramírez-Montero, M., Calderón-Fallas, R., Ramírez-Bogantes, M. y Travieso- González, C. (2018) Diagnóstico automático de infección por Nosemiasis en abejas melíferas mediante procesado de imágenes. *Tecnología en Marcha*. 31(2),14-25. DOI: 10.18845/tm.v31i2.3621

Quezada-Euán, J. J. G. (2007). A retrospective history of the expansion of africanized honeybees in Mexico. *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 295–300. <https://doi.org/10.1080/00218839.2007.11101412>

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D. y van Engelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(5), 1792–1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>

Reyes-Quintana, M., Espinosa-Montaña, L. G., Prieto-Merlos, D., Koleoglu, G., Petukhova, T., Correa-Benítez, A. y Guzman-Novoa, E. (2019). Impact of *Varroa destructor* and deformed wing virus on emergence, cellular immunity, wing integrity and survivorship of Africanized honey bees in Mexico. Journal of Invertebrate Pathology, 164, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.009>

Richards, E. H., Jones, B. y Bowman, A. (2011). Salivary secretions from the honeybee mite , *Varroa destructor*: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. Parasitology, 138, 602–608. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000072>

Rinderer, T. E., Bucu, S. M., Rubink, W. L., Daly, H. V, Stelzer, J. A., Riggo, R. M. y Baptista, F. C. (1993). Morphometric identification of Africanized and European honey bees using large reference population. Apidologie, 24, 569–585.

Rinderer, T. E., Stelzer, J. A., Oldroyd, B. P., Bucu, S. M. y Rubink, W. L. (1991). Hybridization Between European and Africanized Honey Bees in the Neotropical Yucatan Peninsula. Science, 253, 309–311.

Roberts, J. M. K., Anderson, D. L. y Durr, P. A. (2017). Absence of deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral

landscapes and colony losses. *Scientific Reports*, 7, 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07290-w>

Rodríguez-Dehaibes S. R., Otero-Colina G., Pardo V., Villanueva J. A. (2005). Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *Journal of Apicultural Research* 44(3): 124-125.

Salamanca, G. G (2009). Variabilidad genética del AND mitocondrial de poblaciones de Abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en Colombia. *Zootecnia Tropical*, 27 (4), 373-382.

Sankar, B., Karthishwaran, K. y Somasundaram, R. (2016). Leaf anatomical changes in peanut plants in relation to drought stress with or without paclobutrazol and ABA. *Journal of Phytology*, 5(0), 25–29.

Sarkaria, D., Bettini, S. y Patton, R. L. (1951). A Rapid Staining Method for Clinical Study of Cockroach Blood Cells. *The Canadian Entomologist*, 83, 329–332.

Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. 22.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420>

Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. W. W., & Stanley, D. W. (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. 54, 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.11.002>

Schwartz, S. H., Qin, X. y Zeevaart, J. A. D. (2003). Update on Abscisic Acid Biosynthesis Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology*, 131, 1591–1601. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017921>

Smith, D. R., Taylor, O. R. y Brown, W. M. (1989). Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA. *Nature*, 339, 213–215.

Smith, M. L. (2012). The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? PLoS ONE, 7(8), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043319>

Szawarski, N., Saez, A., Domínguez, Dickson, R., De Matteis, Á., Eciolaza, C., Justel, M., Aliano, A., Solar, P., Bergara, I., Pons, C., Bolognesi, A., Carna, G., Garcia, W., Garcia, O., Eguaras, M., Lamattina, L., Maggi, M. y Negri, P. (2019). Effect of Abscisic Acid (ABA) Combined with Two Different Beekeeping Nutritional Strategies to Confront Overwintering: Studies on Honey Bees' Population Dynamics and Nosemosis. *Insects*, 10(349), 1–14.

Tossi, V., Cassia, R., Bruzzone, S., Zocchi, E. y Lamattina, L. (2012). ABA says NO to UV-B: a universal response? *Trends in Plant Science*, 17(9), 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.007>

van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Curtis, J. M., Ibrahim, A. y Pernal, S. F. (2014). Fumagillin: An Overview of Recent Scientific Advances and Their Significance for Apiculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (13), 2728-2737. [dx.doi.org/10.1021/jf4055374](https://doi.org/10.1021/jf4055374)

Vandame, R., Morand, S., Colin, M.E. y Belzunces, L. P. (2002). Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 33, 433–445. <https://doi.org/10.1051/apido>

Vávra, J., y Lukeš, J. (2013). Microsporidia and 'The Art of Living Together.' *Advances in Parasitology*, First Edition, 82, 253-319.. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00004-6>

Waś, E., Szczesna, T., Rybak-Chmielewska, H., Teper, D. y Jaśkiewicz, K. (2017). Application of hplc-dad technique for determination of phenolic compounds in bee pollen

loads. *Journal of Apicultural Science*, 61(1), 153–162. <https://doi.org/10.1515/JAS-2017-0009>

White Jr., J. W., Reithof, M. L., Subers, M. H. y Kunshnir, I. (1962). Composition of American Honeys. *Agricultural Research Service*, 27(1261), 89–114. <https://doi.org/10.1038/srep08663>

Wilson-Rich, N., Dres, S. T. y Starks, P. T. (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). 54(2008), 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>

Winston, M. L. (1992). The biology and management of Africanized honey bees. *Annual Review of Entomology*, 37, 173–193. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.37.1.173>

Woodward, D (2007) *Queen bee: biology, rearing and breeding*. Balclutha; New Zealand. 137 pp.

Zang, L.-Y., Cosma, G., Gardner, H., Shi, X., Castranova, V. y Vallyathan, V. (2000). Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279, C954–C960. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.4.C954>

Zappi, A., Melucci, D., Scaramagli, S., Zelano, A. y Marcazzan, G. L. (2018). Botanical traceability of unifloral honeys by chemometrics based on head-space gas chromatography. *European Food Research and Technology*, 244(12), 2149–2157. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3123-3>