



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRABAJO PROFESIONAL
MODALIDAD DE PRODUCCIÓN APÍCOLA
PRÁCTICA AL EXTRANJERO EN GUELPH, CANADÁ

“Informe del Trabajo Profesional y

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE ESPORAS DEL HONGO

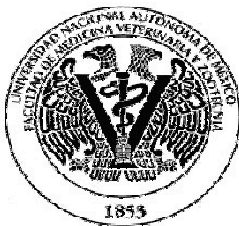
Nosema ceranae EN ABEJAS MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.)”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A
DE LA MORA PEÑA ALVARO
Nº de cuenta. 30301121-1

Asesores:

MVZ. ADRIANA CORREA BENÍTEZ



México, D.F.

Marzo, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRABAJO PROFESIONAL
MODALIDAD DE PRODUCCIÓN APÍCOLA
PRÁCTICA AL EXTRANJERO EN GUELPH, CANADÁ

INFORME FINAL
“TRABAJO PROFESIONAL EN EL EXTRANJERO EN MEDICINA Y
ZOOTECNIA APÍCOLA”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A
DE LA MORA PEÑA ALVARO
N° de cuenta. 30301121-1

Asesores:

MVZ. ADRIANA CORREA BENÍTEZ
PhD. ERNESTO GUZMÁN NOVOA



México, D.F.

Marzo, 2012

DEDICATORIA

Agradezco a la vida, por llenar cada uno de mis sentidos de su magia, por permitirme conocer gente tan valiosa y poder compartir con ellos la magnifico de esta tierra.

A mi ¡México! por ser un país con historia, tradición y cultura; donde todo es posible y los sueños se pueden alcanzar.

A mi *Alma Mater* la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; me siento orgulloso de pertenecer a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, las cuales me han formado como Médico Veterinario Zootecnista y han hecho en mí, germinar la necesidad de contribuir al desarrollo de la situación actual de mi país.

Agradezco infinitamente a mi familia, a quienes amo con todo mi corazón y son motivo de orgullo, respeto y admiración.

A mis padres, Alvaro y Blanca, quienes han dedicado su vida con esfuerzos y sacrificios, para obsequiarme la mayor de las herencias; la cual, es el triunfo de todos y que sin su apoyo no hubiera podido alcanzar. Me enseñaron que para lograr una meta, hay que luchar con amor, valor y coraje; que para superar cualquier dificultad, jamás se debe agachar la cabeza, sino siempre mirar al frente; y que la clave para lograrlo son la serenidad y el trabajo constante.

A mis hermanos, Alonso y Arlene, quienes son mi apoyo incondicional y mi motivación, para levantarme en cada dificultad por más difícil que parezca. Día a día me enseñan que pase lo que pase, el amor sincero es el que triunfa en todas las adversidades.

A la familia De la Mora-Chávez y Peña-Valencia, quienes han estado, y estarán conmigo en las buenas y en las malas; me guían con cada uno de sus ejemplos y experiencias para formarme como mejor persona.

A una persona muy especial, Mildred, quien me apoyó y me brindó su mano para poder culminar esta etapa.

A Anaid, a quien no tengo palabras para expresarle el cariño que le tengo.

A Ana, a quien quiero mucho y gracias a su valentía, fue el vínculo para poder conocer a mis amigas Karen y Amir, que me han acompañado en casi una década de cariño y confianza sincera. Junto con ellas, Ricardo Ruiz[☼], a quien le dedico éste título.

A mis hermanos del alma, Oscar, Gustavo, José Manuel, Edgar, Cristian y Marco; amigos inseparables, con quienes sé que en cualquier momento, allí estaremos para lo que sea.

A Mony, por ser ella en todo momento, sin juicios ni críticas y ser una persona leal, a la que quiero y admiro.

A Mariana, por estar y saber estar, además de ayudarme a viajar y a inundar el cielo verde, luz y fuego.

A mis amigos Marcela, Edwin, José C., Marisol, Beto, Dulce, Manuel R., Sarahi, Karlita, Faby, Alejandra, Itzel, Edgar Luna, Francisco Mariño y Servandus; quienes han estado en el preciso momento, compartiendo su esencia y viviendo experiencias únicas, demostrándome a jamás rajarse. Así como a toda persona que ha participado en este proceso.

A mi maestro Ignacio Molina, quien me enseñó que hay que buscar éxito y no suerte, porque la suerte es para los perdedores.

A mis maestros, PhD. Ernesto Guzmán, Paul Kelly, Pegah Valizadeh, MVZ Adriana Correa, MVZ Laura Espinosa, MVZ José De la Luz, Dr. Miguel Ángel Martínez, MVZ Carlos y MVZ Vanesa Munguía, MVZ Adrián Gálvez, MVZ Sara Caballero, MVZ Maricela Villalobos, MVZ Carmen Frías, MVZ Adriana Here, MVZ Antonio Roldán, MVZ Dianina López, MVZ María del Pilar, MVZ Juan Carlos Jacinto, MVZ Manuel Cortés y MVZ Alfredo Ramos; con quienes estoy agradecido y han dejado huella en mi vida, siendo fuente de inspiración para transformar mi vida y lograr mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis padres, porque con su esfuerzo y ayuda, pude realizar este trabajo.

A mi papá, por sembrar en mí, la pasión de la apicultura.

Sinceramente al equipo de trabajo del PhD Ernesto Guzmán Novoa en la *UoG* y de la MVZ Adriana Correa en la FMVZ-UNAM, por haber sido el vínculo y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo fuera del país.

Al PhD Ernesto Guzmán Novoa, por todo el apoyo que nos otorgó y asignarme un proyecto propio de investigación, además de ser motivo de inspiración para lograr ser una persona de excelencia en cualquier área en la que me desempeñe.

A la MVZ Adriana Correa Benítez, por el apoyo y el interés que me ha brindado incondicionalmente, desde comienzos de mi carrera.

A la MVZ Laura Espinosa, por la paciencia y esfuerzo que ha dedicado en ayudarme a resolver dudas, así como, revisar y corregir el presente informe.

A la Bióloga Esperanza, por su amabilidad y el tiempo dedicado a mi capacitación

A Mildred Delgado, por estar a mi lado en todas las alegrías y tempestades.

A Richy, Itzel, Angy, Dr. José de la Luz, Rodrigo, Silvia y al Departamento de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos, por apoyarme y contribuir en mi formación académica.

A Carlos Medina, por hacer la estancia amena, divertida y ser un buen compañero.

Al MVZ Gustavo García, por ser un apoyo en la revisión de mi trabajo y en la realización de mi exámen.

A Paul Kelly, por ser el mejor jefe del mundo, y más que jefe, un amigo. Por ser fuente de alegría durante la estancia, por hacer el trabajo divertido y entretenido, además de ayudarnos en todo y acogernos como en casa.

A Pegah Valizadeh, por ser la guía y enseñarme todo lo que sé de mi proyecto de investigación. Por poder compartir experiencias y puntos de vista de distintos temas, con un enfoque diferente y único de la situación del mundo. Sinceramente, mis palabras no bastan para expresar mi más sincero agradecimiento y únicamente poderle decir "*Thank you, thank you!*"

A Nancy Bradbury, por estar al pendiente de todo lo de logística y por ayudarnos a pasar una gran experiencia.

A Les, por ser un amigo y abrirnos las puertas de su casa para convivir con él y su familia.

A David Stotesbury, por hacer de la apicultura, la experiencia más radical, increíble y loca en todos sus sentidos.

A Jesse Rebecca, por brindarnos su amistad y apoyo.

A Jessica Klawunn y Emma Kelly, por compartirnos sus experiencias.

A Cheryl Misener, por darnos hospedaje, la confianza y comodidad de su hogar.

A Hassan Tarik y a su familia, por estar al pendiente y cuidado de nosotros, así por su humildad y ganas de compartir experiencias.

A Hanan Gashout , Alice Sinia, Berna Emsen, Hamiduzzaman, Bill y Jack; por el interés de enseñarnos y hacer de nuestra estancia una muy grata experiencia.

CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVO GENERAL	7
INFORME DE ACTIVIDADES	8
4. UBICACIÓN GEOGRÁFICA	8
5. MANEJO APÍCOLA	11
5.1. REVISIÓN DE RUTINA	11
5.1.1. EVALUACIÓN Y MANEJO DEL APIARIO	11
* CARACTERÍSTICAS DEL ENTORNO	11
* PRESENCIA DE DEPREDADORES	12
* PRESENCIA Y ACTIVIDAD DE LAS ABEJAS EN EL APIARIO Y EN LA PIQUERA	12
* CONDICIONES DEL EQUIPO	13
5.2. EVALUACIÓN DE COLMENAS	13
6. MANEJO PRECOSECHA	16
6.1. DIVISIONES	16
6.2. CONTROL, CAPTURA Y APROVECHAMIENTO DE ENJAMBRES	18
6.3. COLOCACIÓN DE ALZAS DE MIEL	20
6.4. COLOCACIÓN DE “ESCAPES PARA ABEJAS”	21
6.5. TRASHUMANCIA	23
6.6. MANTENIMIENTO DE INSTALACIONES Y EQUIPO	24
7. OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE LA COLMENA	25
7.1. MIEL	25
7.1.1. COSECHA DE ALZAS DE MIEL	26
7.1.2. EXTRACCIÓN	27

7.1.3.	SEDIMENTADO	29
7.1.4.	FILTRADO	29
7.1.5.	ENVASADO, ETIQUETADO Y VENTA	29
7.1.6.	CLASIFICACIÓN DE LA MIEL	30
7.2.	CERA	31
7.2.1.	COLECCIÓN	32
7.2.2.	FUNDIDO	32
7.2.3.	ENVASADO Y VENTA	33
7.3.	ABEJAS - FORMACIÓN DE NÚCLEOS	33
8.	CRÍA DE REINAS	34
8.1.	FORMACIÓN DE UNA COLONIA INCUBADORA	35
8.2.	MÉTODOS DE FECUNDACIÓN PARA REINAS	37
8.2.1.	REINA DESTINADA PARA INSEMINACIÓN	37
	INSTRUMENTAL	
8.2.2.	REINA DESTINADA A LA INTRODUCCIÓN EN MINI-NÚCLEOS DE FECUNDACIÓN	38
8.2.3.	REINA DESTINADA PARA LA INTRODUCCIÓN A UNA COLMENA HUÉRFANA	38
8.3.	TRASLARVE	38
9.	PREPARACIÓN DE COLMENAS PARA INVIERNO	41
10.	DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL DE ENFERMEDADES	42
10.1.	LOQUE AMERICANA	42
10.2.	VARROOSIS	42
10.3.	NOSEMOSIS	42
11.	PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	43
11.1.	CRIOPRESERVACIÓN Y VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD DE ESPORAS DEL HONGO <i>Nosema ceranae</i> POR MEDIO DE TINCIONES	43

11.2.	EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA INMUNIDAD CUANDO FUERON ESTIMULADOS CON INFECCIONES DE <i>Nosema ceranae</i> Y CON INDUCTORES INMUNES	45
11.3.	EFFECTOS DE ALGUNOS PESTICIDAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE LAS ABEJAS MELÍFERAS COMO UN POSIBLE FACTOR RELACIONADO AL SÍNDROME DEL COLAPSO DE LAS COLONIAS	45
11.4.	EFFECTOS DE ACARICIDAS NATURALES Y SINTÉTICOS SOBRE EL ÁCARO <i>Varroa destructor</i> Y SOBRE EL COMPORTAMIENTO Y LA RESISTENCIA NATURAL DE LAS ABEJAS MELÍFERAS	46
11.5.	EVALUACIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Bauveria bassiana</i> , <i>Chlonostachys rosea</i> Y <i>Metarhizium anisopliae</i> COMO CONTROLES BIOLÓGICOS PARA COMBATIR AL ÁCARO <i>Varroa destructor</i>	46
11.6.	ESTUDIO SANITARIO DE COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS (<i>Apis mellifera</i>) EN ZACATECAS, MÉXICO	47
11.7.	BASES GENÉTICAS Y DE COMPORTAMIENTO SOBRE LA RESISTENCIA DE LAS COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS AL ÁCARO <i>Varroa destructor</i>	47
12.	COSTOS	48
13.	CONCLUSIONES	49
14.	BIBLIOGRAFÍA	50

CUADROS

CUADRO 1. POBLACIÓN DE PERSONAS Y SU SITUACIÓN EN MÉXICO	3
CUADRO 2. INFORMACIÓN COMPARATIVA ENTRE LOS PAÍSES DE MÉXICO Y CANADÁ, EN EL CUAL SE SEÑALA EL PIB, LA CANTIDAD DE POBLACIÓN, NÚMERO DE APICULTORES, NÚMERO DE COLMENAS Y LA CANTIDAD DE MIEL PRODUCIDA	4
CUADRO 3. NÚMERO DE COLMENAS Y DIRECCIÓN POR APIARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA AMBIENTAL, UNIVERSIDAD DE GUELPH, ONTARIO, CANADÁ	9
CUADRO 4. COMPOSICIÓN DE LA MIEL	25
CUADRO 5. COMPOSICIÓN DE LOS ESTRATOS SUPERIOR, MEDIO E INFERIOR DENTRO DEL BARRIL FUNDIDOR DE CERA	32
CUADRO 6. IDENTIFICACIÓN DE REINAS CON BASE EN EL COLOR Y CORTE DE ALA SEGÚN LA CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL	35
CUADRO 7. ACTIVIDADES A REALIZAR POR DÍA PARA LA CRÍA DE REINAS EN LA COLMENA DE INCUBACIÓN POR EL MÉTODO <i>CLOAKE</i>	36

FIGURAS

FIGURA 1.	POBLACIÓN DE PERSONAS Y SU SITUACIÓN EN MÉXICO	3
FIGURA 2.	PRODUCTO INTERNO BRUTO (MILLONES DE DÓLARES)	5
FIGURA 3.	POBLACIÓN DE PERSONAS (MILLONES)	5
FIGURA 4.	NÚMERO DE APICULTORES	5
FIGURA 5.	NÚMERO DE COLMENAS	5
FIGURA 6.	TONELADAS DE MIEL PRODUCIDA	5
FIGURA 7.	FOTOGRAFÍA AÉREA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN APÍCOLA (<i>BEE LAB</i>) “ <i>TOWNSEND HOUSE, HONEY BEE RESEARCH CENTRE</i> ”, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA AMBIENTAL DE LA UNIVERSIDAD DE GUELPH, ONTARIO, CANADÁ	8
FIGURA 8.	LA CIUDAD DE GUELPH DENTRO DE LA PROVINCIA DE ONTARIO, CANADÁ	10
FIGURA 9.	DISTRIBUCIÓN DE LAS COLMENAS EN EL APIARIO	12
FIGURA 10.	ABEJAS MUERTAS EN LA PIQUERA DE LAS COLMENAS	13
FIGURA 11.	COLMENA CON DOBLE CÁMARA DE CRÍA ANTES DE DIVIDIR	17
FIGURA 12.	CÁMARA DE CRÍA DIVIDIDA EN DOS CON UN BASTIDOR CON MIEL, EL CUAL SE COLOCA AL EXTREMO DE LA CÁMARA	17
FIGURA 13.	COLONIA SOBREPoblada, LAS ABEJAS SE ACUMULAN EN EL EXTERIOR DE LA COLMENA FORMANDO BARBAS (SIGNO DE ENJAMBRAZÓN)	19
FIGURA 14.	ENJAMBRE LOCALIZADO EN UNA RAMA EN EL <i>BEE LAB FRONT YARD (BLF)</i>	19

FIGURA 15. ENJAMBRE PROCEDENTE DE UNA COLMENA DE EXHIBICIÓN PARA EXPERIMENTACIÓN DE “ <i>TOWNSEND HOUSE, HONEY BEE RESEARCH CENTRE</i> ”, EN EL CUAL SE MARCARON PINTANDO EL DORSO DEL TÓRAX DE 40,500 ABEJAS INDIVIDUALMENTE, DIVIDIDAS EN GRUPOS DE 8 DIFERENTES COLORES PARA LA APLICACIÓN DE DIVERSOS TRATAMIENTOS CONTRA VARROA, PARA ESTUDIAR SI GENERAN ALGUNA ALTERACIÓN CONDUCTUAL EN LAS ABEJAS	20
FIGURA 16. COLOCACIÓN DE ALZAS TIPO <i>LANGSTROTH</i> EN EL APIARIO <i>AIRPORT</i> , DONDE ALGUNAS COLMENAS ALCANZARON UNA ALTURA DE 1.80 M DEL PISO	21
FIGURA 17. COLMENA CON UNA ALTA POBLACIÓN DE ABEJAS A LA CUAL SE REQUIERE AGREGAR TRES ALZAS DE MIEL	21
FIGURA 18. “ESCAPE PARA ABEJAS”	22
FIGURA 19. “ESCAPE PARA ABEJAS” COLOCADO EN UNA COLMENA CUATRO DÍAS ANTES DE SER COSECHADA	22
FIGURA 20. JESSE REBECCA (UNIVERSIDAD DE WATERLOO. TRABAJADORA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN APÍCOLA (<i>BEE LAB</i>) “ <i>TOWNSEND HOUSE, HONEY BEE RESEARCH CENTRE</i> ” (VERANO 2011) JUNTO A UNA COLMENA PRÓXIMA A COSECHAR EN EL APIARIO <i>AIRPORT</i> QUE TIENE UNA ALTURA SIMILAR A ELLA (1.65 M)	23
FIGURA 21. “DAVID STOTESBURY (<i>UOG</i>), CARLOS MEDINA (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS, MÉXICO) Y PAUL KELLY (<i>UOG</i>) MOVILIZANDO COLMENAS EN LA NOCHE A UNA ZONA DE MEJOR FLORACIÓN	23
FIGURA 22. COLMENA DE EXHIBICIÓN EN LA SALA “ <i>DISCOVERY GALERY</i> ” EN EL SEGUNDO NIVEL DEL <i>ROYAL ONTARIO MUSEUM (ROM)</i> , TORONTO, CANADÁ	24

FIGURA 23. COLMENAS CON ALZAS DE MIEL LLENAS PREVIAS A LA COLOCACIÓN DE “ESCAPES DE ABEJAS” PARA SU POSTERIOR COSECHA	26
FIGURA 24. DIABLITO COSECHADOR DE MIEL MANUAL	26
FIGURA 25. COSECHA DE MIEL CON AYUDA DEL BRAZO MECÁNICO INSTALADO EN EL CAMIÓN APÍCOLA DE LA <i>UOG</i>	27
FIGURA 26. CUARTO DE ALZAS	27
FIGURA 27. MÁQUINA PARA EXTRACTAR MIEL DE TIPO LINEAL	28
FIGURA 28. EXTRACTOR MOTORIZADO CUADRANGULAR	28
FIGURA 29. FILTRADO DE LA MIEL	29
FIGURA 30. ENVASADORA AUTOMÁTICA DE LA MARCA NASSENHEIDER®	30
FIGURA 31-a. VENTA DE MIEL EN BARRILES	30
FIGURA 31-b. EXHIBICIÓN DE VENTA DE MIEL EN PRESENTACIÓN DE FRASCOS DE 50, 250, 500G Y 1KG	30
FIGURA 32. PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LA MIEL MENOR A 17% MEDIDA CON UN REFRACTÓMETRO PARA MIEL	31
FIGURA 33. ESCALA DE COLOR CANADIENSE DE LA MIEL CON UNA CLASIFICACIÓN <i>GOLDEN</i> O DORADO, DONDE LA MIEL TIENE 32.5 CM DENTRO DE LA ESCALA DE COLOR DE MIEL <i>JACK'S SCALE</i> ®	31
FIGURA 34. BARRIL FUNDIDOR DE CERA	32
FIGURA 35. CERA EN MARQUETA PARA VENTA	33
FIGURA 36. COLMENA INCUBADORA	36
FIGURA 37. BASTIDOR CON JAULAS INDIVIDUALES PARA CELDAS REALES DE CATORCE DÍAS DE EDAD	37
FIGURA 38. INTRODUCCIÓN DE CELDAS REALES A MINI-NÚCLEOS DE FECUNDACIÓN	38
FIGURA 39. TRASLARVE CON CUCHARILLA DE TRASLARVE	40

FIGURA 40. BASTIDOR PORTA COPACELDAS DE PLÁSTICO O DE CERA DIVIDIDO EN TRES TRAVESAÑOS CON QUINCE COPACELDAS PEGADAS EN UNA BASE DE MADERA DE 1x1CM, CON LA ABERTURA DE LAS COPACELDAS DIRIGIDA HACIA ABAJO, DANDO UN TOTAL DE 45 COPACELDAS	40
FIGURA 41. PREPARACIÓN DE UNA COLONIA PARA INVIERNO	41
FIGURA 42. ESPORAS DE NOSEMA TEÑIDAS CON <i>BF</i>	44
FIGURA 43. ESPORAS DE NOSEMA TEÑIDAS CON <i>DAPI</i>	44
FIGURA 44. ESPORAS DE NOSEMA TEÑIDAS CON <i>PI</i>	44

1 RESUMEN

DE LA MORA PEÑA ALVARO presenta el Informe Final de Trabajo Profesional en el Extranjero, el cual fue realizado en el área de producción, manejo e investigación apícola, en coordinación con la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de Guelph (*UoG*) Canadá, bajo la supervisión de la MVZ. Adriana Correa Benítez y del PhD. Ernesto Guzmán Novoa.

En el presente informe se describen las principales actividades realizadas para la adquisición y aplicación de conocimientos teórico-prácticos en manejo y producción apícola, así como la participación y desarrollo de diversos proyectos de investigación enfocados a tener mayor conocimiento sobre el Síndrome del Colapso de las Colmenas (*SCC*) estudiando múltiples factores relacionados con el mismo.

2 INTRODUCCIÓN

La apicultura es la rama de la zootecnia entendida como el arte y ciencia de la cría de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.)^{*1} encargada de estudiar su anatomía, fisiología, biología (reproducción-etimología) y enfermedades, con la finalidad de obtener productos y subproductos^{2,3} para beneficio del ser humano,⁴ además de tener un alto valor social, económico y biológico.

De acuerdo con la FAO[†] y la SAGARPA,[‡] en México hay 42 mil apicultores los cuales cuentan con 1,787,514⁴ millones de colmenas y su principal producto es la miel. A pesar de contar con la presencia de la abeja africana (1986) y varroosis (1992), México es el sexto país productor de miel,^{5,6} con aproximadamente 56,300 toneladas, los principales estados productores de miel son Yucatán, Campeche, Jalisco, Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Puebla, Quintana Roo y Michoacán; asimismo, se encuentra en tercer lugar como exportador,^{3,6} con 25,000 toneladas que equivalen al 40 o 50% de la producción nacional. También se exportaron 26,800 toneladas de miel orgánica⁶ donde los principales compradores son Alemania, Inglaterra, Suiza, Arabia Saudita y Estados Unidos de América.

Debido a la gran importancia de la apicultura en el país, el sector apícola fue el primero en generar Normas Oficiales Mexicanas (NOM's);[§] además de generar 85.6 millones de dólares⁶ anualmente, la apicultura se coloca como la tercera actividad ganadera generadora de divisas en el sector pecuario^{4,7} después de la carne de porcino con 193'000,000 dólares y

* *Apis mellifera* L. Clasificación taxonómica: Reino *Animalia*, Phylum *Arthropoda*, Clase *Isecta*, Orden *Hymenoptera*, Suborden *Clistogastra*, Superfamilia *Apoidea*, Familia *Apidae*, Género *Apis* y especie *mellifera* L.

† FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

‡ SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Alimentación y Pesca

§ NOM's. Las Normas Oficiales Mexicanas son de observancia obligatoria y tienen como finalidad establecer reglas, características, especificaciones y atributos que deben reunir los productores, procesos, instalaciones, servicios, actividades, métodos o sistemas, cuando éstos constituyen riesgos para la sanidad animal, en la salud humana y en el medio ambiente. Primera NOM en México: NOM-001-ZOO-1994. Campaña Nacional Contra las Varroosis de las Abejas. Fecha de creación, 28 de abril de 1994

la de bovino congelada con 44'156,000 dólares; sin embargo, el consumo per cápita de miel para el año 2010 en México fue de tan sólo 320 gramos⁶ por persona, comparado con el de otros países como Alemania, Estados Unidos de América, Grecia y Suiza donde supera el kilogramo por habitante.

Desde el punto de vista económico, en el año 2010, México contó con una población de 113.42 millones de personas (116.15 millones según la ONU),⁸ de los cuales 20.34 millones (22.17%) viven en el sector rural y 93.08 millones (73.83%) en las urbes.⁴ Este fenómeno le impide al país producir su propio alimento, obligándolo a depender del extranjero; con ello el Consejo Nacional de Evaluación de la Política del Desarrollo Social (CONEVAL) reveló, en el año 2010, que 52 millones de personas en México se encuentran en situación de pobreza, lo que equivale al 46% de la población del país (Cuadro 1) (Figura 1).⁹

Cuadro 1. Población de personas y su situación en México⁸

POBLACIÓN	Millones de personas
Población total	113.42
Personas en pobreza	52
Personas en zona urbana	93.08
Personas en zona rural	20.34

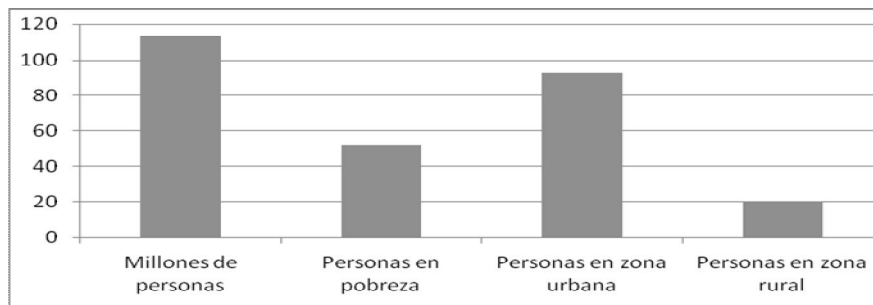


Figura 1. Población de personas y su situación en México⁸

En contraste con México, la ONU señala que Canadá tiene una población de 34.67 millones de habitantes, de los cuales, aproximadamente 8 mil son apicultores (23%); los cuales manejan alrededor de 610,000 colmenas y producen 34,000 toneladas de miel al año,¹⁰ ubicándose como el octavo país productor de miel.⁴ De la miel que producen, exportan 12,230 toneladas a 27 países, principalmente EUA y Alemania, lo que representa aproximadamente \$35 millones de pesos.¹⁰

De acuerdo con la información del Banco Mundial, del Fondo Monetario Internacional y de la *CIA World Factbook* publicada en el periódico “*EL PAIS*” el 7 de noviembre de 2011, México se ubica entre de los países más ricos del mundo según su PIB,^{**} ocupando la décimo cuarta posición con 874 millones de dólares, mientras que Canadá lo hace en la décima con 1.336 millones de dólares.⁸ En el Cuadro 2 se presenta la comparación entre los dos países, cuya información se especifica en las Figuras 2, 3, 4, 5 y 6.

Cuadro 2. Información comparativa entre los países de México y Canadá, en el cual se señala el PIB, la cantidad de población, número de apicultores, número de colmenas y la cantidad de miel producida^{8,10}

Información comparativa	México	Canadá
Población (millones de personas)	116	36,675
PIB (millones de dólares)	874	1,336
Número de apicultores	42,000	8,000
Número de colmenas	2,000,000	610,000
Toneladas de miel producidas	56,300	34,000

^{**} **PIB.** El Producto Interno Bruto es una medida que expresa el valor monetario de la producción de bienes y servicios finales de un país durante un período (normalmente un año). Es usado como una medida del bienestar material de una sociedad y es objeto de estudio de la macroeconomía

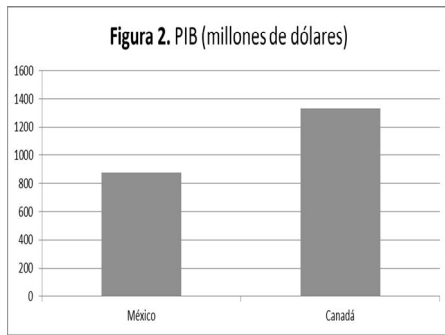


Figura 2. Producto Interno Bruto (millones de dólares)^{8,10}

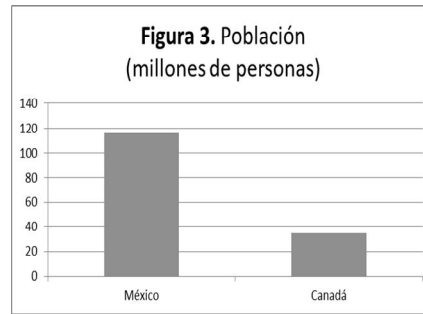


Figura 3. Población de personas (millones)^{8,10}

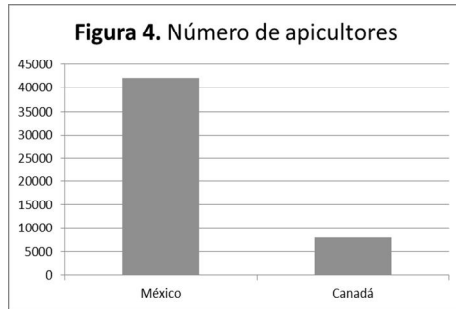


Figura 4. Número de apicultores^{8,10}

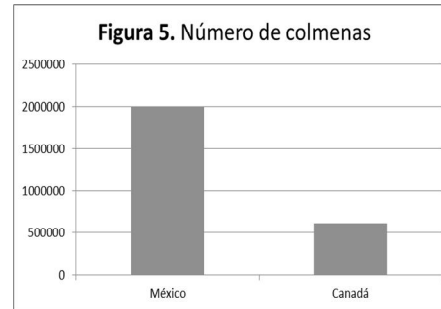


Figura 5. Número de colmenas^{8,10}

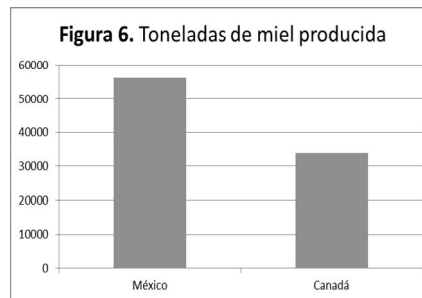


Figura 6. Toneladas de miel producida^{8,10}

En cuanto a las diferencias y similitudes entre ambos países según sus problemas sanitarios apícolas, cabe mencionar que a pesar de que Canadá no cuenta con africanización, pero sí con varroa, tiene la presencia del escarabajo *Aetina tumida*¹¹ y se enfrenta al Síndrome del Colapso de las Colonias, fenómeno no existente aún en México.

Dentro de las grandes adversidades que ha enfrentado la apicultura en el mundo nos encontramos ante este nuevo problema llamado Síndrome del Colapso de las Colonias (SCC)^{††} que ha causado grandes pérdidas en el sector, y del cual se desconoce su origen y

^{††} **SCC.** Síndrome del Colapso de las Colonias el cual es conocido a nivel mundial en idioma inglés, como *Colony Collapse Disorder (CCD)*

control. Este problema comenzó a presentarse en el invierno de 2006 en Estado Unidos de América, Canadá, Europa, Asia, África y Australia. Ha ocasionado una gran pérdida de colonias al finalizar el invierno, sobrepasando el valor normal, que va de un 10% hasta por encima del 30%, lo que equivale anualmente a 1,000 millones de dólares. Este síndrome se caracteriza porque al revisar las colmenas en primavera, se encuentran vacías, sin la presencia de abejas ni de cadáveres, debido a que las abejas obreras adultas mueren fuera de la colmena, las reinas no pueden repoblar la colmena y la cría muere en sus diferentes estados de desarrollo. Dentro de los posibles factores encontrados, están los inviernos prolongados, la presencia de enfermedades como el ácaro *Varroa destructor* responsable del 85% de las causas del SCC;¹² otras posibles causas pueden ser, virus, el hongo *Nosema spp.*, estrés, poblaciones débiles, falta de alimento proteínico, mal manejo, pesticidas, cambios climáticos, etc.^{13,14} Estos factores van deteriorando la calidad de vida de las colonias hasta ocasionarles la muerte; sin embargo, este síndrome no es un factor aislado, es la combinación de varios factores, los cuales, debilitan la colonia y permiten la entrada de agentes oportunistas.

Debido a la importancia de la apicultura en México y en el mundo, así como al impacto que ha generado la presencia de problemas como el SCC y las diferentes enfermedades, es de suma importancia desarrollar investigación multidisciplinaria, con el fin de prevenir y solucionar los problemas existentes en la apicultura mundial, y qué mejor que sea nuestra Facultad y Universidad las que participen en ello, además de colaborar con otros países para colocar el nombre de México en alto y formar profesionistas especializados y actualizados en las diferentes áreas.

3 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una serie de habilidades y destrezas para enfrentar el competitivo campo de trabajo actual, reforzar conocimientos teóricos y desarrollar habilidades prácticas en el área de producción apícola; fomentar el desarrollo profesional y ético como Médico Veterinario Zootecnista y reafirmar los conocimientos adquiridos durante la carrera, tales como son:

- Iniciación a la metodología de la investigación
- Antecedentes y situación actual de la apicultura
- Anatomía y fisiología de las abejas
- Comportamiento biológico y social de las abejas melíferas
- Técnicas de muestreo y toma de datos
- Técnicas de diagnóstico de enfermedades por métodos cualitativos y cuantitativos, entre ellas *Varroa destructor* y *Nosema ceranae*
- Técnicas por métodos moleculares (PCR) para conocer el origen del ADN mitocondrial de la abeja melífera (*Apis mellifera* spp.)
- Técnicas de diagnóstico de africanización
- Experiencia práctica en métodos de manejo de las abejas
- Experiencia práctica en técnicas de cosecha y extracción de miel
- Experiencia práctica en la cría de abejas reinas

INFORME DE ACTIVIDADES

4 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigación Apícola (*Bee Lab*) “*Townsend House, Honey Bee Research Centre*” con dirección *308 Stone Rd east, Guelph, Ontario, Canada* y en el *Laboratory 3244, 3rd floor, Bovey Building, N1G 2W1*; los cuales pertenecen al Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá (Figura 7). El Departamento cuenta con 373 colonias repartidas en doce apiarios ubicados en distintas áreas de la ciudad (Cuadro 3) y actualmente la Universidad se encuentra trabajando en colaboración con la Asociación de Apicultores de Ontario.



Figura 7. Fotografía aérea del Centro de Investigación Apícola (*Bee Lab*) “*Townsend House, Honey Bee Research Centre*”, Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá

Cuadro 3. Número de colmenas y dirección por apiario del Departamento de Biología Ambiental, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá

Apiario	Ubicación	Número de colonias
<i>Airport</i>	<i>9737 Stone Road, Guelph</i>	29
<i>Arkell</i>	<i>413 Arkell Road, Guelph</i>	28
<i>Brookville</i>	<i>11367 Guelph Line Brookville, Ontario</i>	29
<i>Crewson's</i>	<i>5030 Erin/Eramosa Town Line, Crewson's corners, Ontario</i>	29
<i>Eramosa</i>	<i>5841 Wellington Rd 29, Guelph</i>	21
<i>Georgina Island</i>	<i>Simcoe Country, Ontario</i>	28
<i>Honey Bee Research Centre. Bee Lab Back Yard (BLB) y Bee Lab Front Yard (BLF)</i>	<i>308 Stone Road East, Guelph</i>	105
<i>Moffat</i>	<i>Concession 11 Moffat, Ontario</i>	29
<i>Piccine</i>	<i>Piccine Watson St North, Guelph</i>	19
<i>Thorah Island</i>	<i>Simcoe Country, Ontario</i>	28
<i>Willowbee</i>	<i>Hwy 6 North, Guelph</i>	28

La ciudad de Guelph se encuentra en Canadá, a 100 km al oeste de la ciudad de Toronto y al este de *Kitchener-Waterloo*, dentro de la provincia de Ontario, Canadá (Figura 8), en las coordenadas Latitud 43°33'N, Longitud 80°15'W, al norte se encuentra el río *Speed* y al este el río *Eramosa*. Cuenta con una superficie de 86.72km², su precipitación anual promedio es de 690 mm de lluvia y 143 mm de nieve, el invierno tiene una duración de ocho meses, la temperatura promedio es de 7.2 °C (38°C en verano y -20°C en invierno) y se encuentra a 334 msnm. Tiene una población de 118,000 personas, la ciudad es rica en cultura, arquitectura, parques y diversos ríos que la cruzan.^{15,16}



Figura 8. La ciudad de Guelph dentro de la provincia de Ontario, Canadá

La Universidad de Guelph (*UoG*) es una de las primeras en realizar investigación extensiva; ofreciendo programas de postgrado en las diferentes áreas de artes, humanidades, ciencias sociales y ciencias naturales. Actualmente se encuentran inscritos 15,000 alumnos, de los cuales, el 13% de sus graduados son extranjeros, asimismo las clases son impartidas en el idioma inglés.

5 MANEJO APÍCOLA

5.1 REVISIÓN DE RUTINA

La revisión de rutina sirve para conocer y evaluar el estado general del apiario y sus colonias, lo que permite tomar decisiones que permitan aplicar un manejo adecuado, con el fin de prevenir, mejorar y controlar cada uno de estos problemas.

5.1.1 EVALUACIÓN Y MANEJO DEL APIARIO

La evaluación del apiario se realizó siempre que se trabajó con las colmenas, algunos apiarios se revisaron diario como los apiarios delantero (*BLF*) y trasero (*BLB*), ubicados en las instalaciones del *Bee Lab*, y otros mínimo una vez a la semana, salvo en el apiario *Willowbee* que pertenecía a la Asociación de Apicultores de Ontario donde únicamente se realizaron tres visitas para colocar alzas de miel, cosechar, medicar y alimentar las colonias para fortalecerlas antes del invierno.¹⁷

- **CARACTERÍSTICAS DEL ENTORNO.** Consistió en la observación del terreno, la evaluación del crecimiento de hierbas y su control por corte con maquinaria. Cada apiario está formado por aproximadamente 30 colmenas, las cuales se colocan en grupos de tres pares, formando medio círculo con una angulación de 45° para cada par, la piquera está orientada en distintas direcciones con la finalidad de reducir la deriva; cada colmena se coloca sobre una tarima a una altura de diez y quince centímetros del piso, con una separación entre cada colmena entre diez y treinta centímetros (Figura 9).¹⁷



Figura 9. Distribución de las colmenas en el apiario

- **PRESENCIA DE DEPREDADORES.** En los apiarios del *Bee Lab* se observó la presencia de zorrillos los cuales acechaban las colmenas. Para controlarlos se colocaron ladrillos a 10 cm de distancia de la piquera, obligando a que el zorrillo se levante y despegue el abdomen del suelo quedando vulnerable al ataque de las abejas.¹⁷
- **PRESENCIA Y ACTIVIDAD DE LAS ABEJAS EN EL APIARIO Y EN LA PIQUERA.** Al aproximarnos a las colmenas se observaron cadáveres de abejas adultas frente a la piquera (Figura 10) debido en gran parte, a que las abejas que son regresadas a la colmena después de cada investigación, pelean con las guardianas de las colmenas y mueren. En verano, cuando la floración es abundante se observó pecoreo con una entrada y salida ordenada de las abejas en la piquera, asimismo, en esta temporada las abejas de algunas colonias se agruparon en la piquera formando barbas como signo de enjambrazón; también se encontraron enjambres en ramas de árboles y en el suelo del *Royal Ontario Museum Toronto* donde se capturó únicamente a la reina; la mayoría de los enjambres se recolectaron y se depositaron en cámaras de cría vacías con panales con miel y polen. En la época de otoño cuando el flujo de néctar disminuye, se observó pillaje, las abejas trataban de robar alimento de otras colmenas volando rápidamente con movimientos de *zig-zag* y de igual manera formaron barbas frente a las piqueras para lograr entrar; al trabajar con

las colmenas hubo robo de alimento almacenado en los panales, esto se solucionó alimentando a las abejas en barriles de 200 litros con jarabe de sacarosa al 65% en una proporción de 20 litros por colmena para que las abejas almacenen la mayor cantidad de alimento y puedan resistir el invierno.¹⁷



Figura 10. Abejas muertas en la piquera de las colmenas

- **CONDICIONES DEL EQUIPO.** En la revisión de rutina de cada colmena es muy importante evaluar el equipo del apiario para determinar si hay que repararlo o reemplazarlo. En el *Bee Lab* se elabora la mayoría del equipo que se usa, en este periodo elaboramos techos externos para que las colmenas resistan mejor las lluvias y el invierno. Se remplazaron los bastidores convencionales de marco de madera y una hoja de cera estampada por bastidores de plástico, ya que son más resistentes al manejo.

5.2 EVALUACIÓN DE COLMENAS

La revisión de las colmenas se realizó desde una vez al día hasta una vez cada dos semanas, dependiendo de la temporada del año y del proyecto de investigación al que fuera designada cada una. Se realizó manejo apícola propio de la temporada como manejo precosecha, prevención y control de enjambres, cosecha, fortalecimiento, tratamientos, cría y cambio de reinas, alimentación y preparación de colmenas para invierno, todas estas actividades se describen a detalle en el presente informe.

La revisión individual de las colmenas se debe realizar cada 15 días, con el fin de evitar que emerja una nueva reina, cuyo tiempo de formación desde que se pone un huevo hasta que emerge una reina es de 16 días; la revisión se debe realizar en menos de 5 minutos para evitar que la colmena se enfríe, y que en épocas de escases de alimento haya pillaje y se debiliten más las colmenas. En esta revisión, es importante evaluar:

- Las condiciones del equipo con el fin de determinar su estado y establecer si es necesario reparar o remplazar por equipo nuevo
- La fortaleza de las colonias se determina como fuerte cuando la colmena presenta ocho o más bastidores con abejas, mientras que cuando presenta menos de siete bastidores con abejas se considera débil. Es importante observar la actividad de las abejas, su comportamiento, higiene, defensividad y cantidad de población, la cual nos permite determinar si es necesario aumentar o reducir el espacio dependiendo de la temporada del año, y así poder prevenir la enjambrazón o establecer el momento óptimo de cosecha
- La presencia y calidad de la reina se determina observando directamente a la reina y/o con la presencia de un huevo por celda
- La cría se observa de dos tipos, la cría abierta y la cría cerrada. La cría abierta corresponde a los estadios de huevo y larva de las abejas, en los cuales se observó la coloración y conformación de la larva; la cría cerrada corresponde a los estadios de pupa y cría adulta próxima a emerger, en esta fase los opérculos deben estar completos, íntegros, no grasosos ni húmedos y sin roer, para descartar cualquier tipo de enfermedad. El patrón de postura se establece con base en la cantidad de celdas con cría operculada
- Las abejas adultas deben tener movimientos coordinados, estar alerta, ser preferentemente dóciles y no presentar malformaciones
- Se debe realizar un manejo adecuado para evitar que el apicultor sea vector en la transmisión de enfermedades. Se debe llevar a cabo un monitoreo constante para conocer la situación zoonosanitaria del apiario, evaluar la presencia de malos olores, deformidad y malformaciones en las larvas y abejas o la presencia de agentes dañinos, flamear la cuña entre colmenas, renovar bastidores con cera vieja; todo

esto, con el fin de prevenir y/o tratar las enfermedades, para disminuir la merma productiva y económica que generan

- La cantidad de alimento según la temporadas es importante para decidir si es el momento propicio para cosechar o, en el caso contrario, proporcionar alimento como jarabe de azúcar y tortas de polen para que las colmenas resistan el invierno, fortalecer a las colmenas débiles y estimular las colmenas productoras de reinas
- Los signos de enfermedad nos ayudan a evaluar el estado sanitario de las colmenas. La *UoG* dedica mucha investigación al estudio de las enfermedades y problemas que afectan a las abejas melíferas, para ello, las colmenas son infectadas intencionalmente con diversas enfermedades, tales como el ácaro *Varroa destructor* que es el principal problema sanitario de las abejas a nivel mundial; en las colmenas infectadas con esta enfermedad, al ser revisadas se observa al parásito caminando sobre las abejas o los bastidores, algunas abejas nacen deformes y sin alas debido a que también el ácaro es vector para la transmisión de algunos virus. También existe la presencia del hongo *Nosema ceranae* que es una enfermedad en estudio de la que se desconoce su patogenicidad^{††} y virulencia,^{§§} y las colmenas infectadas con esta enfermedad presentan las paredes externas manchadas con heces

^{††} **Patogenicidad.** Capacidad de un organismo para generar una enfermedad, la cual está relacionada con la susceptibilidad inherente del huésped^{5,6,19}

^{§§} **Virulencia.** Es la magnitud o severidad con la que un agente causa una enfermedad en términos de frecuencia y gravedad^{5,6,19}

6 MANEJO PRECOSECHA

La época de precosecha es aquella que se presenta antes de la época de floración y antecede a la recolección de miel, en la cual el flujo de néctar es abundante en las plantas. En esta época se realiza una serie de manejos que permite incrementar el número de abejas y colonias, para obtener la mayor cantidad de miel posible.

6.1 DIVISIONES

La división es la reproducción artificial y controlada de las colonias de abejas, la cual ayuda a incrementar el número de colonias a inicios y mediados de la floración con la finalidad de tener la mayor cantidad de colmenas, ya sea para polinizar o almacenar la mayor cantidad de miel posible.^{11,18}

Se requiere una colonia fuerte (determinada por la calidad de la reina, el patrón de postura, población abundante en más de ocho bastidores y suficientes reservas de alimento), a la cual, si es necesario, se le puede adicionar previamente una cámara de cría extra con la finalidad de obtener una mayor población (Figura 11). De esta manera, después de siete o quince días se pueden dividir en dos o en hasta cinco nuevas colonias dependiendo la fortaleza de la colonia inicial, colocándolas en cámaras de cría divididas en dos (Figura 12). En cada parte se colocan cinco bastidores, en el extremo se acomodan dos bastidores con miel; en seguida, dos con cría cerrada y en la parte central, uno con cría abierta en diferentes estados de desarrollo. La colonia original se completa con bastidores de cera trabajada vacíos. Es importante tener especial cuidado con la reina.¹⁷



Figura 11. Colmena con doble cámara de cría antes de dividir



Figura 12. Cámara de cría dividida en dos, con un bastidor con miel el cual se coloca al extremo de la cámara

Las colmenas nuevas se sellan completamente y se cambian de lugar o de apiario, se dejan en orfandad por dos días y posteriormente, se introduce una reina nueva virgen o fecundada en una jaula para reinas (tipo Benton o *JZBZ*).^{***} Uno o dos días después, se abre la piqueta y a los siete o quince días posteriores se revisa la postura de la reina. Cuando la nueva división se encuentra fortalecida se transfiere a una cámara de cría de tamaño original.

En el caso de que se mantengan dos colonias dentro de la cámara de cría dividida y se desee producir miel, se coloca una tela gruesa a lo largo de la división debajo del techo interno

^{***}

Jaulas para reina tipo Benton o *JZBZ*. Estas cajas son empleadas para introducir nuevas reinas a las colmenas huérfanas, permitiendo un periodo de familiarización y previniendo que las abejas de la colonia maten a la reina. La reina se acompaña de tres hasta ocho obreras y una pasta de azúcar *glass* llamada *Candy*, colocada en un orificio por donde la reina saldrá; la jaula se introduce entre dos bastidores centrales con cría y por un periodo de dos a tres días las obreras consumen el *Candy*, posteriormente la reina será liberada

para evitar que las reinas se pasen al otro lado de la colmena y se peleen entre sí, se coloca el excluidor de reinas y posteriormente las alzas de miel.

6.2 CONTROL, CAPTURA Y APROVECHAMIENTO DE ENJAMBRES

La enjambrazón es un comportamiento de reproducción natural de las abejas, que se presenta en la época de floración y abundancia de alimento; se genera por el aumento de la población y la falta de espacio, ocasionando que la feromona real no sea capaz de mantener unida a toda la colonia. Las abejas obreras generan celdas reales para producir reinas nuevas, la reina vieja deja de poner huevos y puede volar, saliendo de la colonia con la mitad de la población pocos días antes de que emerja alguna de las reinas nuevas. La primera en emerger mata a las demás, pero si emergen dos o más reinas al mismo tiempo, pelean hasta morir y la sobreviviente se convierte en la nueva madre de la colonia.^{11,18}

Dentro de las medidas de control se debe incrementar el espacio de la colonia cuando la población es muy alta y las abejas se acumulen en el exterior de la colmena formando barbas (Figura 13), para esto se debe colocar una cámara de cría extra sobre la inicial con la finalidad de que la reina oviposite, aumente la población, y en un futuro se pueda dividir; también se adicionan alzas de miel para aumentar el espacio de la colonia y para que las abejas almacenen la miel. Es importante colocar un excluidor de reinas entre la(s) cámara(s) de cría(s) y la(s) alza(s) de miel, para evitar que la reina oviposite en estas últimas; a la reina se le corta la mitad de una de las alas para evitar que pueda volar; se destruyen las celdas reales y de emergencia en la colmena para evitar que se genere una nueva reina.



Figura 13. Colonia sobrepoblada, las abejas se acumulan en el exterior de la colmena formando barbas (signo de enjambrazón)

Si las abejas han enjambrado se agrupan formando un racimo en alguna rama, pared o en el suelo (Figura 14), el enjambre se captura sacudiendo la rama donde se encuentre, se cepillan las abejas sobre una lona o la colmena vacía, o aspiran. Las abejas se depositan dentro de la cámara de cría, la cual debe contener bastidores con cera estampada, y trabajada, así como miel para reserva de alimento; se busca a la reina, se marca, se le corta el ala (si no se ha hecho) y se introduce nuevamente; finalmente, se cierra la piquera por 2 días, con la finalidad de que las abejas se familiaricen con la colmena y comiencen a trabajar. Si la reina no se localizó, sólo se depositan las abejas en la colmena y se cierra la piquera.



Figura 14. Enjambre localizado en una rama en el *Bee Lab Front Yard (BLF)*

Los enjambres que se localizaron y recolectaron fueron en los apiarios *Bee Lab Back Yard (BLB)*, *Bee Lab Front Yard (BLF)*, *Willowbee* de la Asociación de Apicultores de Ontario, en las colmenas de exhibición del Centro de Investigación Apícola (*Bee Lab*) “*Townsend House, Honey Bee Research Centre*” (Figura 15) y del *Royal Ontario Museum (ROM)*, Toronto, Canadá.



Figura 15. Enjambre procedente de una colmena de exhibición para experimentación del “*Townsend House, Honey Bee Research Centre*”, en el cual se marcaron pintando el dorso del tórax de 40,500 abejas individualmente, divididas en grupos de 8 diferentes colores para la aplicación de diversos tratamientos contra varroa, para estudiar si generan alguna alteración conductual en las abejas.

6.3 COLOCACIÓN DE ALZAS DE MIEL

La colocación de alzas se realiza en colmenas con alta población que no tengan espacio para poder almacenar mayor cantidad de alimento durante toda la temporada de floración (Figura 16). Las alzas colocadas son tipo *Langstroth* con nueve bastidores, es importante colocar un excluidor de reinas entre la cámara de cría y las alzas de miel para evitar que la reina tenga acceso a las alzas y ponga huevos en su interior, y así permitir que las abejas almacenen la mayor cantidad de miel posible.

El número de alzas a colocar depende de la fortaleza de la colmena, el olor de los panales vacíos estimula el pecoreo, es por ello que se deben colocar muchos bastidores al principio de la floración;¹⁸ a las colmenas con una gran cantidad de abejas en nueve o diez bastidores de la cámara de cría (Figura 17), se les agregaron 3 alzas de miel; a las que tuvieran siete u ocho bastidores con abejas, se les agregaron dos, y las que tenían cinco o siete sólo se les adicionó un alza.¹⁶ A finales de esta época, se debe reducir la cantidad de bastidores para

forzar a las abejas a colocar las reservas de néctar en las esquinas de los bastidores para que estos se cosechen completamente llenos.¹⁸



Figura 16. Colocación de alzas tipo *Langstroth* en el apiario *Airport*, donde algunas colmenas alcanzaron una altura de 1.80 m del piso



Figura 17. Colmena con una alta población de abejas a la cual se requiere agregar tres alzas de miel

6.4 COLOCACIÓN DE “ESCAPES PARA ABEJAS”

Los “escapes para abejas” o “*bee escapes*” son trampas especiales que se colocan tres o cuatro días antes de cosechar las alzas de miel con el fin de que las alzas no presenten abejas al ser cosechadas. Estos son tablas de madera del mismo ancho y largo que las cámaras de cría y que el alza de miel. En la parte central presentan una perforación redonda de cinco centímetros de diámetro y en uno de sus lados (dirigido a la cámara de cría al momento de colocarse). Cuenta con una malla alambre de forma triangular, de trama pequeña unida por medio de tiras de madera de un centímetro de ancho que sobresalen de la tabla de madera y le dan contorno a la malla. Los vértices no se unen perfectamente dejando un espacio mayor al tamaño de las abejas (alto y ancho) para permitir que éstas salgan. Al momento de colocar el escape, el lado que presenta la perforación se dirige a las

alzas de miel, mientras que el lado con la malla se dirige hacia el alza de miel inferior (vacía y recién colocada) y la cámara de cría.

La función de los escapes es permitir que las abejas presentes en las alzas superiores llenas de miel, bajen a la cámara de cría atravesando la perforación del escape caminando por la malla y saliendo en alguna de las aberturas de los vértices; pero una vez que las abejas se encuentran en la parte inferior y quieren subir nuevamente a las alzas no pueden debido a que los únicos accesos (vértices) se encuentran lejos de la perforación central (Figura 18). Es importante señalar que cuando se coloquen éstos, se debe colocar un alza de miel vacía por debajo para evitar reducir por completo el espacio para las abejas y éstas intenten enjamberrar (Figuras 19 y 20).



Figura 18. "Escape para abejas"



Figura 19. "Escape para abejas" colocado en una colmena cuatro días antes de ser cosechada



Figura 20. Jesse Rebecca (Universidad de Waterloo. Trabajadora del Centro de Investigación Apícola (*Bee Lab*) “*Townsend House, Honey Bee Research Centre*” (verano 2011) junto a una colmena próxima a cosechar en el apiario *Airport* que tiene una altura similar a ella (1.65m)

6.5 TRASHUMANCIA

Esta actividad conocida como **Apicultura Migratoria** consiste en trasladar a las abejas de una región a otra que presente mayor flujo de néctar y polen con el fin de aprovecharlos para su cosecha.^{11,16} La trashumancia debe ser realizada en la noche, cuando la temperatura no es muy elevada, con las piqueras cerradas para aprovechar que la mayoría de las abejas se encuentran en el interior de la colmena, y su actividad es reducida esto con el propósito de evitar la menor pérdida posible de abejas (Figura 21).

Figura 21. David Stotesbury (*UoG*), Carlos Medina (Universidad Autónoma de Zacatecas, México) y Paul Kelly (*UoG*) movilizando colmenas en la noche a una zona de mejor floración



6.6 MANTENIMIENTO DE INSTALACIONES Y EQUIPO

El mantenimiento se realiza durante todo el año. Dentro de estas actividades se realizó la reparación de una falsa piquera ubicada en la colmena de exhibición presente en el *Royal Ontario Museum (ROM)* donde algunas abejas salían de la colmena al interior de la sala de exhibición (Figura 22). Se lavó y restauró equipo diverso equipo colmenas, bastidores, maquinaria de trabajo; se lavaron y prepararon los barriles de 200 litros para el envasado de miel; se elaboró equipo para diversos proyectos de investigación (colmenas de observación), techos externos, mini-núcleos de fecundación, *candy* cajas para reina tipo *Benton* y *JZBZ*; así como el corte de pasto de los diferentes apiarios.



Figura 22. Colmena de exhibición en la sala “*Discovery Galery*” en el segundo nivel del *Royal Ontario Museum (ROM)*, Toronto, Canadá

7 OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE LA COLMENA

7.1 MIEL

La miel es una sustancia viscosa de sabor dulce elaborada por las abejas a partir del néctar de las flores.^{1,11} El néctar es libado^{†††} por las abejas, almacenado y madurado dentro de la colmena en donde la sacarosa del néctar se desdobla enzimáticamente en glucosa y fructuosa.

La miel debe ser fluida, espesa, con un color inespecífico debido a los minerales del suelo; tiene un pH ácido entre 3.2 y 3.5, tiene la propiedad de cristalizar; presenta un alto contenido de azúcares, sales minerales, vitaminas (Complejo B) entre otras cualidades (Cuadro 4).

Cuadro 4. Composición de la miel²⁰

COMPONENTE	Gr/100gr Base
Humedad	21
Proteínas	21
Azúcar (fructuosa y glucosa)	73
Sacarosa	1.4
Dextrosa	1.5
Ácido fórmico	0.2
Ácido libres	0.4
Cenizas	0.3
Lecitina	0.2

^{†††} **Libar.** Acción de las abejas de succionar el néctar de las flores con ayuda de su aparato bucal

7.1.1 COSECHA DE ALZAS DE MIEL

Las abejas recolectan el néctar y lo llevan a las colmenas donde lo depositan en la celdas, para posteriormente evaporar el exceso de agua y finalmente transformarlo en miel.^{14,18}

La cosecha de miel se realiza de dos a cuatro días posteriores a la colocación de los escapes para abejas con la finalidad de que no haya presencia de abejas dentro de las alzas. En este verano se realizaron de dos a tres cosechas por colmena las cuales tenían de una a seis alzas de miel listas (Figura 23).



Figura 23. Colmenas con alzas de miel llenas previas a la colocación de “Escapes de abejas” para su posterior cosecha

El método de cosecha se lleva a cabo retirando las alzas llenas de miel en un 80-90% de su capacidad junto con los escapes para abejas, este manejo se facilitó con el uso de un diablito cosechador manual (Figura 24) y del brazo mecánico instalado en el camión apícola de la *UoG* (Figura 25).



Figura 24. Diablito cosechador de miel manual



Figura 25. Cosecha de miel con ayuda del brazo mecánico instalado en el camión apícola de la *UoG*

Las alzas cosechadas se colocan en el camión de la *UoG* sobre bases de madera (función salva miel) estibándolas en ocho niveles para posteriormente trasladarlas al cuarto de alzas,²⁰ el cual se encuentra a una temperatura entre 28 - 35°C y una humedad relativa del 50% (Figura 26), lo que evita la alteración de las propiedades fisicoquímicas de la miel y facilita su extracción.



Figura 26. Cuarto de alzas

7.1.2 EXTRACCIÓN

El Centro de Investigación Apícola “*Townsend House*” cuenta con una máquina para extraer miel de tipo lineal, la cual tiene integradas las cuchillas desoperculadoras, el banco desoperculador, la extractadora de miel y un banco para depositar los bastidores vacíos recién extractados (Figura 27).¹¹



Figura 27. Máquina para extraer miel de tipo lineal

En primer lugar, los bastidores pasan por las cuchillas desoperculadoras para retirar los opérculos que cubren la miel madura, posteriormente los bastidores se depositan en el banco desoperculador, mientras que los opérculos y la miel que escurren caen a un tanque de desoperculado con malla que separa los opérculos de la miel para recolectarla por centrifugación.¹⁸ En el siguiente paso, los bastidores pasan al extractor motorizado de forma cuadrangular con capacidad para 24 bastidores, doce de cada lado (figura 28), en el extractor permanecen girando por diez minutos y al final se colocan los bastidores vacíos en alzas de miel para reutilizarse o almacenarse hasta la siguiente temporada.



Figura 28. Extractor motorizado cuadrangular

7.1.3 SEDIMENTADO

La miel extractada se deposita en un tanque de sedimentación con ayuda de una bomba para líquidos viscosos, en el tanque la miel permanece de 48-72 horas con la finalidad de que los residuos e impurezas se dirijan a la superficie y se puedan retirar fácilmente.¹¹

7.1.4 FILTRADO

Este proceso consiste en hacer pasar la miel por un filtro de malla de tela con perforaciones de dos por tres milímetros de abertura, con el fin de retirar cualquier residuo presente en la miel.¹¹ Por inocuidad, la miel filtrada se deposita en tambos de acero con bolsa de plástico limpia en el interior con capacidad para 200 litros (Figura 29).



Figura 29. Filtrado de la miel

7.1.5 ENVASADO, ETIQUETADO Y VENTA

La miel filtrada se envasa en frascos de 50g, 250g, 500g, 1 kg, cubetas de 4 y 19 kg y tambos de 200 kg con ayuda de una envasadora automática de la marca Nassenheider® (Figura 30). Cada una de estas presentaciones es etiquetada con información de la facultad y destinada para venta (Figura 31-a y 31-b).



Figura 30. Envasadora automática de la marca Nassenheider®



Figura 31-a. Venta de miel en barriles



Figura 31-b. Exhibición de venta de miel en presentación de frascos de 50, 250, 500g y 1 kg

7.1.6 CLASIFICACIÓN DE LA MIEL

La miel de la UoG tiene una clasificación “*Canada No.1, Golden, extra light amber, liquid*”, donde *Canada No.1* se refiere a que la miel tiene un porcentaje de humedad menor del 17 % (Figura 32),¹² *Golden* es el color dorado y se obtiene con la escala de color de miel *Jack’s scale*® encontrándose dentro de 31-50mm (32.5mm) donde recibiría el nombre de ámbar extra claro (*extra light amber*), aunque en la clasificación canadiense es dorado (Figura 33), mientras que *Liquid* corresponde a la presentación líquida.

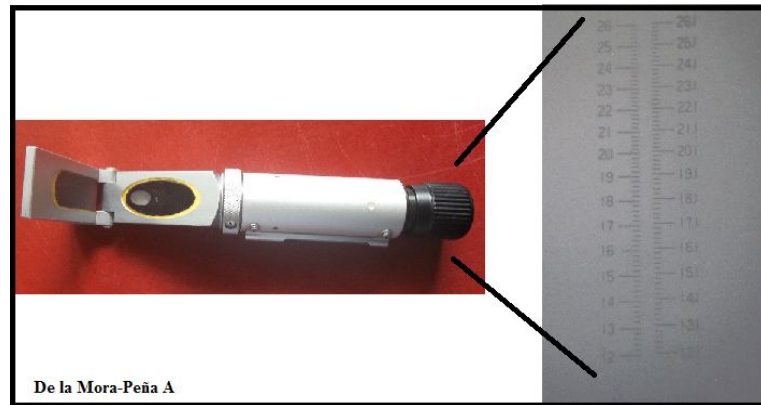


Figura 32. Porcentaje de humedad de la miel menor a 17% medida con un refractómetro para miel

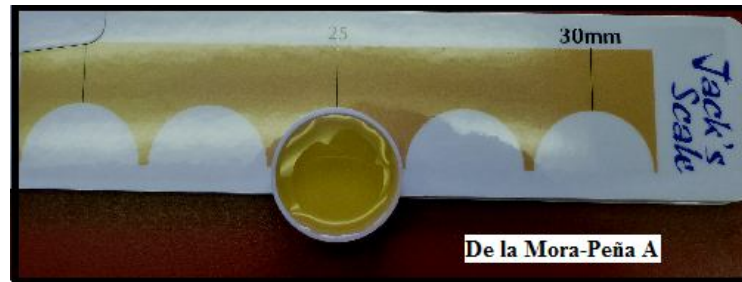


Figura 33. Escala de color canadiense de la miel con una clasificación *Golden* o dorado, donde la miel tiene 32.5 cm dentro de la escala de color de miel *Jack's scale*®

7.2CERA

La cera es el principal material de construcción de las abejas para formar celdas y panales. Está formada por una cadena de 16 – 64 carbohidratos y alcoholes, es muy estable y no sufre deterioro, su punto de ebullición se encuentra en los 62 y 63 °C; es usada en la industria apícola, de velas, de cosméticos, dental, electricidad, calzado, crayones, como abrillantador, entre muchos otros usos.¹

Es producida por cuatro glándulas de las abejas obreras localizadas en la parte ventral del abdomen, se secreta en forma de escamas blancas claras y moldeadas por el aparato bucal para la formación de celdas y de opérculos en los panales.¹

7.2.1 COLECCIÓN

La cera recolectada proviene principalmente del proceso de extracción de miel, en especial del proceso de desoperculado y centrifugado de la miel, la cera se almacena en un barril fundidor (Figura 34) el cual tiene conectadas tres llaves de salida a diferente altura en la parte inferior y un calentador interno.



Figura 34. Barril fundidor de cera

7.2.2 FUNDIDO

Una vez lleno el barril de cera se le agrega agua corriente hasta una cuarta parte de su capacidad y se enciende el calentador con el fin de derretir la cera, una vez líquida se forman diferentes estratos por densidad dentro del tanque (Cuadro 5).

Cuadro 5. Composición de los estratos superior, medio e inferior dentro del Barril fundidor de cera

Estrato	Composición
Superior	Residuos, restos de abejas, basura, polen, etc
Medio	Cera
Inferior	Miel y agua

7.2.3 ENVASADO Y VENTA

La cera fundida se almacena en trastes especiales para la elaboración de cera en marqueta (Figura 35). Una vez que los estratos se han formado se abre la segunda llave del barril y se drena dejando salir agua con cera y algunos residuos, cuando comience a salir cera limpia se cierra esa llave y se abre la superior llenando los recipientes necesarios; cuando empiecen a salir los residuos del estrato superior se cierra esa llave y se abre la inferior para que salga el agua con cera y residuos para así limpiar el barril.



Figura 35. Cera en marqueta para venta

Los recipientes para almacenar la cera líquida deben estar limpios y humedecidos con una ligera película de agua jabonosa para facilitar el desprendimiento de la cera una vez formada la marqueta. La cera es vendida a un templo para la elaboración de velas.

7.3 ABEJAS - FORMACIÓN DE NÚCLEOS

Los núcleos son una forma de comercializar y adquirir abejas, cada uno se forma por una pequeña colonia de abejas adultas, cuatro panales colocando en los extremos panales con alimento (miel y polen) y en el centro panales con cría abierta y operculada en distintas etapas de desarrollo; se coloca una reina virgen o fecundada. Los núcleos elaborados son vendidos a apicultores de la región.

8 CRÍA DE REINAS

La cría de reinas se realiza de forma natural por las abejas cuando en la colmena hay una disminución en la percepción de la feromona real, esto sucede cuando hay ausencia de reina, cuando ésta es vieja, improductiva, cuando está enferma, no fue aceptada por la colonia, se le agotó la reserva de espermatozoides y cuando la colmena va a enjambrar.

En el ámbito productivo la cría de reinas es una actividad de gran importancia para el apicultor, ya que ayuda a mejorar genéticamente a las abejas, con el fin de obtener las características deseables, como aumentar la producción de miel, docilidad, resistencia a enfermedades, comportamiento higiénico, así como disminuir la enjambrazón y el pillaje.

Para lograr una óptima cría de reinas se requiere la cría de zánganos, con la finalidad de conocer y controlar el origen genético que queremos para fecundar a las reinas, ya sea naturalmente y/o por inseminación instrumental.

Una vez que las reinas se encuentran sanas y han quedado fecundadas, se marcan con pintura en el dorso del tórax y se les corta la mitad del ala dependiendo el año en que hayan nacido (Cuadro 6). Posteriormente, se introducen en una colmena huérfana o son ofrecidas para venta colocándolas en jaulas tipo *Benton*, Yucatán o *JZBZ*.

Cuadro 6. Identificación de reinas con base en el color y corte de ala según la clasificación internacional²⁰

Mnemotecnia	Color	Terminación de año	Tipo de año non/par	Corte de ala der/izq
B	Blanco	1 6	N	I
A	Amarillo	2 7	P	D
R	Rojo	3 8	N	I
V	Verde	4 9	P	D
A	Azul	5 10	N	I

8.1 FORMACIÓN DE UNA COLONIA INCUBADORA

La colonia incubadora se forma por el método *Cloake* el cual establece la capacidad que tienen las abejas para producir celdas reales en época de enjambrazón, se encuentra constituida por la unión de dos colmenas fuertes. La colmena inferior contiene reina, la colmena superior esta huérfana y debe provenir de un apiario diferente, con el fin de que las abejas no regresen al lugar donde se encontraba su colmena original. El procedimiento de la cría de reinas se lleva a cabo en varios días (Cuadro 7).

La colmena incubadora (Figura 36) funge como colmena incubadora y finalizadora, desde la formación la alimentación de larvas con jalea real hasta la liberación de las reinas en jaulas individuales; está formada de la siguiente manera:

- Piso
- Excluidor de reinas
- Cámara de cría con reina
- Excluidor de reinas
- Lámina deslizable para evitar que la feromona real llegue a la colmena huérfana de la cámara de cría superior
- Excluidor de reinas
- Cámara de cría huérfana
- Excluidor de reinas

- Alimentador de techo para jarabe de azúcar con ramas como flotadores
- Techo interno
- Techo externo



Figura 36. Colmena incubadora

Cuadro 7. Actividades a realizar por día para la cría de reinas en la colmena de incubación por el método Cloake

DÍA	ACTIVIDAD
0	→Transferir abejas jóvenes (nodrizas) de la cámara de cría inferior a la superior, sacudiendo bastidores de cría recién emergida sobre la cámara de cría huérfana. La lámina intermedia debe estar en su posición de cerrado.
1	→Introducir un bastidor con copaceldas que permanecerá por 24 horas para que las abejas las limpien, las impregnen con su aroma y se familiaricen con ellas. →Alimentar la colonia huérfana con una torta de polen la cual es una fuente de proteína, nitrógeno, azufre, fósforo, almidón, aceites, hidratos de carbono, y otras sustancias, que ayudarán a estimular la producción de jalea real. La jalea real es producida en las glándulas hipofaríngeas ubicadas en la cabeza de las obreras.
2	→Retirar el bastidor con copaceldas para realizar el traslarve por el método <i>Doolittle</i> descrito en el punto 8.3 más adelante. →Una vez hecho este procedimiento se coloca de nuevo el marco con las larvas (recordar que la lámina intermedia debe estar en la posición de cerrado).
3 – 14	→ La lámina se desliza a la posición de abierto quedando así hasta que la celda real cumple catorce días de edad (entre los nueve y once días después del traslarve dependiendo la edad de las larvas). →Entre los nueve y once días de después del traslarve (catorce días de edad) se saca el marco de la colmena con las celdas reales formadas, para evitar que las reinas emerjan dentro de la colmena (a los 16 días de edad) y se maten entre sí.

Es importante eliminar todas las celdas reales y de emergencia formadas de forma natural por las abejas, así como contar con un registro del porcentaje de formación de celdas reales contando las celdas que se lograron, por ejemplo en un total de las 45 larvas colocadas el porcentaje promedio de formación de celdas fue de 80% el cual se considera aceptable.

8.2 MÉTODOS DE FECUNDACIÓN PARA LAS REINAS

Dentro de los métodos de fecundación de reinas podemos encontrar inseminación instrumental, introducción de reinas vírgenes a núcleos de fecundación o a colmenas huérfanas para su apareamiento de forma natural.

8.2.1 REINA DESTINADA PARA INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL

Para obtener reinas vírgenes para inseminar de forma controlada, se debe colocar cada celda real formada de catorce días de edad, en una jaula individual; estas jaulas se colocan en un bastidor con marco especial (Figura 37) el cual las mantendrá en su posición vertical, éste se introduce dentro de la misma colmena incubadora. Las jaulas individuales permiten contener las celdas reales aisladas (colocando una liga a lo largo de la jaula, para que la celda real no se desprenda), evitando así que las reinas al emerger escapen, se maten entre ellas y realicen vuelos de fecundación no controlados.



Figura 37. Bastidor con jaulas individuales para celdas reales de catorce días de edad

Después de que la reina haya emergido (16 días de vida de la celda real) se retira la copacelda vacía para evitar que la reina entre en la copacelda y muera dentro.

Entre los cinco y trece días de vida de la reina (después de que emergió) se insemina, se marca y se destina para venta o se introduce en una colmena huérfana.

8.2.2 REINA DESTINADA A LA INTRODUCCIÓN EN MINI-NÚCLEOS DE FECUNDACIÓN

Los mini-núcleos de fecundación se encuentran formados por tres bastidores, espacio para alimentador interno y abejas jóvenes, a uno de esos bastidores se le coloca un fragmento de feromona mandibular sintética de la reina “QMP” de nombre comercial *Bee Boost de Phero Tech®* que sustituye a la feromona real y permite mantener a las abejas unidas.

A los catorce días de vida las celdas reales se introducen en mini-núcleos huérfanos de fecundación (Figura 38) para que la reina emerja en los próximos dos días (16 días totales) dentro de éstos. Entre los tres y cinco días después de que la reina ha emergido sale a los vuelos de orientación, entre los cinco y trece días se busca a la reina para ver si fue aceptada y se revisa la postura como señal de que quedó fecundada, se marca y se corta la mitad del ala dependiendo el año.



Figura 38. Introducción de celdas reales a mini-núcleos de fecundación

8.2.3 REINA DESTINADA PARA LA INTRODUCCIÓN A UNA COLMENA HUÉRFANA

Una vez que la reina está fecundada y ovipositando se introduce en una colmena que ha estado en orfandad uno o dos días, al introducirla debe ser en su jaula y sin abejas acompañantes, ya que su presencia disminuye en gran medida la aceptación de la reina, la jaula se introduce entre dos bastidores con cría en distintas etapas de desarrollo. Las obreras

pueden apelonarse alrededor de la jaula para intentar matar a la reina pero ésta se protege en la jaula.²¹

A la jaula se le coloca *candy* en uno de los orificios que comunican con el exterior, éste es consumido por las obreras de la colonia, en este periodo de tiempo las obreras se familiarizan con la nueva reina y una vez terminado el *candy* la reina sale. Es importante revisar la colmena dos días después de la introducción de la caja con la reina, y destruir todas las celdas reales.¹⁸

8.3 TRASLARVE

El método de traslarve empleado es el método *Doolittle*, el cual consiste en tomar dos bastidores de colmenas seleccionadas genéticamente, que deben tener larvas de una edad de entre doce y 36 horas de vida, las cuales normalmente se encuentran junto a las celdas con huevo recién puesto; la edad ideal de la larva es aquella en la que no se distingue la larva al fondo de la celda, sino que sólo se observa jalea real.

Estos bastidores se sacuden y cepillan para retirar todas las abejas, se trasladan al lugar húmedo y fresco donde se hará el traslarve cubriéndolos con un paño húmedo para evitar que las larvas se deshidraten.

Con ayuda de una cucharilla de traslarve se transfieren cuidadosamente las larvas del fondo de las celdas deslizando la cucharilla por las paredes de la celda, para recoger y no dañarlas; las larvas se depositan suavemente en el fondo de la copacelda deslizando la cucharilla por las paredes de la copacelda (Figura 39). Este procedimiento se realiza en las 45 copaceldas y se acomodan en un bastidor portacopacelda, el cual tiene tres travesaños, cada travesaño tiene capacidad para quince copaceldas unidas a una base de madera que mide uno por un centímetro en cada bastidor (Figura 40).



Figura 39. Traslarve con cucharilla de traslarve



Figura 40. Bastidor porta copaceldas de plástico o de cera dividido en tres travesaños con quince copaceldas pegadas en una base de madera de 1x1 cm, con la abertura de las copaceldas dirigida hacia abajo, dando un total de 45 copaceldas

Del mismo modo el marco portacopaceldas con las larvas se reintroduce a la colmena incubadora transportándolo cubierto con un paño húmedo.

9 PREPARACIÓN DE COLMENAS PARA INVIERNO

Como ya se ha mencionado, debido al invierno tan largo de ocho meses y al impacto que ha tenido el Síndrome de Colapso de las Colonia (*SCC*) se necesita preparar a las colmenas para que lleguen fuertes, con una reina en óptimas condiciones, máxima población y reservas de alimento para que puedan resistir el invierno.

Un mes antes de iniciar el invierno, se alimenta cada colmena con 20 litros de jarabe de fructuosa al 65%, se perfora la parte superior de la cámara de cría para que, en caso de que la nieve cubra la colmena haya flujo de aire al interior de la misma; se coloca un guarda piquera para prevenir la entrada de los vientos y la entrada de otras abejas; se coloca sobre el techo externo una pieza de poliuretano que cubra el largo y ancho de la cámara de cría y cinco centímetros de alto para que ayude a mantener la temperatura y evitar la condensación dentro de la colmena; por último se coloca una cobertura de plástico negro que sirve como aislante y capta mayor radiación solar (Figura 41).



Figura 41. Preparación de una colonia para invierno. Foto: Delgado-Huerta GM

10 DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL DE ENFERMEDADES

10.1 LOQUE AMERICANA

Enfermedad de origen bacteriano que afecta a la cría de las abejas melíferas, causada por el *Paenibacillus larvae*. Durante la estancia no se detectó algún caso de la enfermedad en las colmenas de la UoG, sin embargo, apicultores de la región sí cuentan con ella, por tal motivo se realiza su prevención esparciendo en los cabezales de las colonias oxitetraciclina en polvo “Oxisol-62.5” de laboratorios “Vétoquinol®” mezclada con azúcar glass al finalizar la época de floración a finales de septiembre.

10.2 VARROOSIS

Enfermedad causada por el ácaro *Varroa destructor*, la mayoría de las colmenas de la Universidad presentaron una infestación natural, sin embargo, algunas colmenas fueron infestadas artificialmente para el estudio de la misma. Los niveles de infestación se determinan como altos cuando se encuentran más de 5.2 varroas, y se determinan como bajos cuando se encuentran 5.1 varroas o menos por cada 100 abejas.²¹

El método de diagnóstico de varroosis fue por el método de charola, el control se lleva a cabo en dos fases, la primera es con el uso de amitraz “Apivar®” colocando dos tiras por colmena posterior a la floración y la segunda es con el uso de ácido oxálico al inicio del invierno cuando no hay cría en la colmena.

10.3 NOSEMOSIS

Enfermedad causada por el hongo *Nosema spp* (*N. apis* y *N. ceranae*), la cual se encuentra en pocas colmenas de la UoG. No se aplica tratamiento de control debido a que se encuentra prohibida, además que en verano, cuando hay una alta infestación de esporas, las colmenas infestadas son empleadas con fines experimentales de investigación, mientras que en el invierno la cantidad de esporas disminuye de manera notable.

11 PROYECTOS DE INVESTIGACION

Los diversos proyectos de investigación en los que participé fueron desarrollados por el PhD Ernesto Guzmán Novoa para estudiar y conocer acerca del Síndrome de Colapso de las Colonias (SCC).

Para la mayoría de los proyectos de investigación se obtuvieron abejas recién nacidas de menos de 24 horas de vida de distintas colmenas de la mayoría de los apiarios, llegando a necesitar hasta más de 3,000 abejas a la semana. Estas abejas se obtuvieron de colmenas muy pobladas, sanas y con reservas de alimento. La temporada para obtenerlas inicia en la primavera y termina en el otoño ya que en ese periodo es cuando hay mayor población y alimento. La metodología consiste en localizar a la reina para no dañarla y encontrar panales de cría con 5 abejas emergiendo de cada lado para asegurarnos que en las próximas 24 horas la mayoría de las abejas emergerán, los bastidores son tomados y depositados en una incubadora por 24 horas para mantenerlos en incubación a una temperatura promedio de 33°C, y a una humedad relativa entre 50 y 60%. Posterior a este periodo, las abejas recién emergidas son contadas y destinadas a un proyecto de investigación específico. El manejo de estas abejas se facilita, ya que son incapaces para volar y los sacos del veneno no están llenos.

Los proyectos a los que se sometieron estas abejas se describen a continuación.

11.1 CRIOPRESERVACIÓN Y VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD DE ESPORAS DEL HONGO *Nosema ceranae* POR MEDIO DE TINCIONES

Este proyecto forma parte de la tesis de maestría de Janine McGowan. El objetivo es determinar el mejor método para la criopreservación y la viabilidad de esporas muertas por calentamiento a 80°C por una hora. Se formaron tres grupos de esporas muertas sometidas

a diferentes tinciones, las esporas teñidas son fotografiadas y analizadas en computadora por medio del programa “*Volocity*”.^{†††21}

- “*BF*” (*Bright field*) o Campo brillante. Las esporas son teñidas de blanco y negro, las esporas se observan brillantes (Figura 42).
- *DAPI* (*D, 1306 – DAPI*) (*4' 6 – diamino 2 phenylindole, dihydrochloride*). Las esporas se tiñen de azul, esta tinción tiñe el ADN, por lo que los núcleos se ven brillantes y bien definidos (Figura 43).
- *PI* (*Prodiium Yodide P3566*). La foto se ve roja, se tiñe el ADN únicamente de las células muertas (Figura 44).

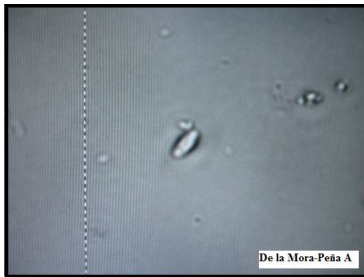


Figura 42. Esporas de nosema teñidas con *BF*

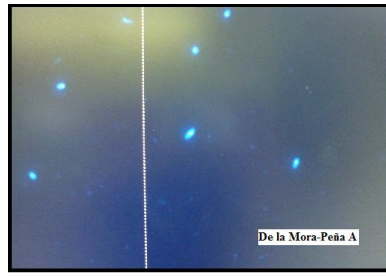


Figura 43. Esporas de nosema teñidas con *DAPI*

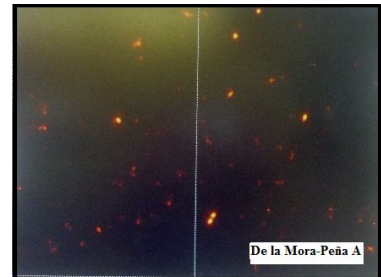


Figura 44. Esporas de nosema teñidas con *PI*

La participación en este proyecto consistió en realizar la extracción, filtrado, tinción y preparación de las esporas para el estudio; coleccionar abejas de 24 horas de vida; realizar el macerado de abdómenes de abejas, obtener esporas congeladas, filtradas, centrifugadas y teñidas; elaborar laminillas, tomar fotos con el programa *Volocity* y contar las esporas analizadas.

^{†††} **Volocity.** Programa computacional de laboratorio por un microscopio compuesto y una cámara para microscopio, se encarga de tomar fotos microscópicas multicromáticas de laminillas de laboratorio

11.2 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA INMUNIDAD CUANDO FUERON ESTIMULADOS CON INFECCIONES DE *Nosema ceranae* Y CON INDUCTORES INMUNES

Trabajo para la tesis de maestría de Pegah Valizadeh. Los objetivos consisten en determinar la patogenicidad de las esporas de nosema en las abejas melíferas, analizar la variabilidad genética del hongo en distintas partes del mundo, medir la expresión de genes relacionados con la inmunidad cuando se estimulan con infecciones de *Nosema ceranae* y con inductores inmunes, determinar el efecto de fuentes nutricionales en la producción de péptidos antimicrobianos de las abejas melíferas cuando son estimuladas con infecciones de nosema y evaluar la viabilidad de esporas del hongo frescas y almacenadas.

En este estudio se apoyó con la colección de abejas de 24 horas de vida, inoculación de tratamientos a las abejas por vía oral, así como el monitoreo y control de los lotes de abejas en incubación.

11.3 EFECTOS DE ALGUNOS PESTICIDAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE LAS ABEJAS MELÍFERAS COMO UN POSIBLE FACTOR RELACIONADO AL SÍNDROME DE COLAPSO DE LAS COLMENAS

Proyecto de tesis doctoral del investigador Hassan Tarik. El objetivo del proyecto es determinar el efecto de los tres pesticidas más comúnmente empleados (*Imidacloprid*, *Clotianidina* y *clorotalonil*) sobre el sistema inmune de las abejas, determinar la dosis letal 50 LD_{50} para cada pesticida, así como el efecto de cada uno sobre la longevidad de las abejas.

En este proyecto se participó con la colección de abejas recién emergidas de menos de 24 horas de vida, aplicar tratamientos con distintas concentraciones de químicos por vía oral y por contacto en tórax, así como monitorear las abejas inoculadas en observación.

11.4 EFECTOS DE ACARICIDAS NATURALES Y SINTÉTICOS SOBRE EL ÁCARO *Varroa destructor* Y SOBRE EL COMPORTAMIENTO Y LA RESISTENCIA NATURAL DE LAS ABEJAS MELÍFERAS

Proyecto para la tesis de maestría de Hanan Gashout. El objetivo del proyecto fue determinar la toxicidad y la dosis letal 50 LD₅₀ de acaricidas naturales y sintéticos usados para el control del varroa, determinar el efecto de los acaricidas en el comportamiento de las abejas (pecoreo, aprendizaje, comportamiento higiénico y de acicalamiento), determinar el efecto de cada acaricida sobre el sistema inmune de las abejas analizando la expresión inmune en los genes.

En este trabajo se participó con el marcaje de 45,000 abejas, a las cuales se les pintó el dorso del tórax con 8 colores distintos, las abejas se inocularon por vía oral con 8 distintos tratamientos, para este proyecto también se colectaron abejas de menos de 24 horas de edad.

11.5 EVALUACIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS *Bauveria bassiana*, *Chlonostachys rosea* Y *Metarhizium anisopliae* COMO CONTROLES BIOLÓGICOS PARA COMBATIR AL ÁCARO *Varroa destructor*

Proyecto para tesis doctoral de Alice Sinia. El objetivo es determinar la patogenicidad y la LD₅₀ de los hongos entomopatógenos *Bauveria bassiana*, *Chlonostachys rosea* y *Metarhizium anisopliae* en los ácaros y en las abejas melíferas, medir el efecto de la temperatura sobre el crecimiento del hongo y la producción de conidias en el laboratorio,

así como determinar el efecto de los tratamientos con los hongos aplicados solos o en combinación con timol.

El apoyo a este proyecto consistió en aplicar tratamientos con hongos entomopatógenos, administrarlos a las abejas y observar las colonias tratadas con cada uno.

11.6 ESTUDIO SANITARIO DE COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS (*Apis mellifera*) EN ZACATECAS, MÉXICO

Proyecto de tesis doctoral del MVZ. Carlos Medina. Los objetivos del trabajo es evaluar el estado sanitario de las colonias manejadas y silvestres en la zona centro y sur de Zacatecas, determinar el origen genético de colonias manejadas y silvestres mediante análisis del ADN en la zona centro y sur del estado de Zacatecas, estudiar el efecto del comportamiento higiénico con la tolerancia a *Varroa destructor*, estudiar el efecto del comportamiento higiénico con la producción de miel, así como establecer el costo generado por el desarrollo del comportamiento higiénico en colonias de abejas africanizadas y europeas.

En este trabajo se colaboró con el macerado de abejas, centrifugado de macerado y correr pruebas de técnicas moleculares como la Reacción en cadena polimerasa (*PCR*), para el conocimiento del origen genético de las abejas de Zacatecas, México.

11.7 BASES GENÉTICAS Y DE COMPORTAMIENTO SOBRE LA RESISTENCIA DE LAS COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS AL ÁCARO *Varroa destructor*

Proyecto de tesis de maestría de Berna Emsen. El objetivo del trabajo fue determinar la relación entre los mecanismos de comportamiento de las abejas con el crecimiento de la población de ácaros en la colonia, así como con la expresión de genes de inmunidad. Para este proyecto se colaboró con al aplicación de campo de feromona de ataque para determinar comportamiento de defensividad en las colmenas del *Bee lab*, así como en la colección se zánganos en la época de floración para estudiar características reproductivas.

12 COSTOS

Este Trabajo Profesional tuvo un costo aproximado de \$ 53,289.76 pesos mexicanos. El 48% de los gastos correspondió al hospedaje y pagos del seguro de la *UoG*, el 21% al transporte, el 16.5% a recreación y gastos varios, el 12.8% a alimentación y el 1.2% a limpieza y artículos personales, asimismo se contó con apoyo financiero de \$1,500.00 dólares canadienses otorgado por los proyectos encaminados a estudiar el *SCC* por parte del PhD. Ernesto Guzmán Novoa y la Universidad de Guelph, Canadá.

13 CONCLUSIONES

Los logros alcanzados en este trabajo profesional fueron satisfactorios debido a que se cumplió con todos los objetivos establecidos. La participación en diversos proyectos de investigación encaminados a conocer y resolver los problemas existentes en la apicultura mundial, me permitió adquirir conocimientos y habilidades que pueden ser aplicados en nuestro país, aprovechando que México figura dentro de una de las principales posiciones a nivel internacional en este sector, a pesar de contar con problemas sanitarios de varroosis, nosemosis, así como de africanización.

Es de suma importancia que nuestra Universidad, al ser la máxima casa de estudios de nuestro país, siga colaborando con otras instituciones internacionales para el desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías aplicables y adaptables a la apicultura nacional, así como con el estudio de fenómenos como el Síndrome del Colapso de las Colonias que atentan contra la apicultura mundial.

14 BIBLIOGRAFÍA

-
- 1- BANCO DE MÉXICO. Balanza comercial agroalimentaria y pesquera. 2ª ed. México. SAGARPA: 2009.
 - 2- CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA VARROASIS DE LAS ABEJAS. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ZOO-1994, (“28-04-1994”)
 - 3- ACTIVIDADES TÉCNICAS Y OPERATIVAS APLICABLES AL PROGRAMA NACIONAL PARA EL CONTROL DE LA ABEJA AFRICANA, Norma Oficial Mexicana NOM-002-ZOO-1994, (“28,02,1994”)
 - 4- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. [Homepage on the Internet]. FAOSTAT. c2006. Available from: <http://faostat.fao.org>
 - 5- MÉXICO OCUPA EL SEXTO LUGAR EN PRODUCCIÓN DE MIEL. [Homepage on the Internet] 2011 [cited 2011 jun]. Available from: <http://www.mexicanbusinessweb.com/noticias/estados.phtml?id=6262>
 - 6- EXPORTACIONES DE MIEL ALCANZAS CIFRAS RECORD. [Homepage on the Internet] 2011 [cited 2011 jun]. Available from: <http://eleconomista.com.mx/industrias/2011/06/12/exportaciones-miel-alcanzan-cifras-record>
 - 7- ESPAÑA CAE A LA 12ª ECONOMÍA MUNDIAL Y NO VOLVERÁ A ESTAR ENTRE LAS 10 MÁS GRANDES EN AÑOS. [Homepage on the Internet] 2011 [cited 2011 apr]. Available from: http://www.elpais.com/articulo/economia/Espana/cae/economia/mundial/volvera/estar/grandes/anos/elpepueco/20110411elpepueco_14/Tes
 - 8- DENNIS VANENGELSDORP. Colony Collapse Disorder: A descriptive study. [serial online] 2009 [cited 2009 August 3]. Epidemiological Survey of CCD. Available from: www.prosone.org
 - 9- SEMANA NACIONAL PYME. México. c2011. Available from: <http://noticiasapicolas.com/mielcanada.htm>

- 10- CARON DM. Honey Bee Biology and Beekeeping. 2nd ed. United States of America: Wicwas Press, LLC. 1999: 11-19.
- 11- KEITH'S DEPLANE. Primeras Lecciones de Apicultura. Dadan't & son INC. Illinois. USA. 2007.
- 12- GUZMÁN-NOVOA E, ECCLES L, CALVETE Y, MCGOWAN J, KELLY PG, CORREA-BENÍTEZ A. Varroa destructor is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie* 2010; 41: 443-450.
- 13- COX-FOSTER DL, ET AL. Colony Collapse Disorder. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee. *Science AAAS*. 2007: 283, 318.
- 14- WELCOME TO THE CITY OF GUELPH. [Homepage on the Internet]. Available from: <http://guelph.ca>
- 15- CALVETE LYM. Efecto de la Nosemiasis (*Nosema* spp.) sobre la fortaleza poblacional en las colonias de abejas (*Apis mellifera*), la variación en las reservas de alimento recuperación demográfica en la primavera en Guelph, Ontario, Canadá (tesis de licenciatura). México (Distrito Federal) México: UNAM, 2010.
- 16- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Apicultura Básica. Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. México. SAGARPA: 2001.
- 17- THRUSFIELD M. Veterinary epidemiology. 3rd ed. Scotland: Blackwell Science, 2007.
- 18- JANINE MCGOWAN. Nosema Staining Procedure using DAPI & PI. June 17th, (Research proposal). Ontario (Guelph) Canadá: University of Guelph, 2011.
- 19- CARTER GR. Bacteriología y micología veterinaria. 2^a ed. México: El manual moderno, 1994.

- 20- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, ALIMENTACIÓN Y PESCA, SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA, COORDINACIÓN GENERAL DE GANADERÍA, PROGRAMA NACIONAL PARA EL CONTROL DE LA ABEJA AFRICANA. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Miel. Programa de Inocuidad de Alimentos. México: SAGARPA, 2002.
- 21- PAUL GORDON KELLY en colaboración con el personal del CENTRO DE INVESTIGACIÓN APÍCOLA (*Bee Lab*) “*Townsend House, Honey Bee Research Centre*” *University of Guelph* del 5 de junio de 2011 al 15 de octubre de 2011 (comunicación personal). Canadá, 2011.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE ESPORAS DEL HONGO

Nosema ceranae EN ABEJAS MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.)

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A
DE LA MORA PEÑA ALVARO
N° de cuenta. 30301121-1

Asesores:

MVZ. ADRIANA CORREA BENÍTEZ

PhD. ERNESTO GUZMÁN NOVOA



México, D.F.

Marzo, 2012

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 ANTECEDENTES	3
1.2 NOSEMOSIS	5
1.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD	5
1.2.2 NOSEMOSIS EN MÉXICO Y EN EL MUNDO	5
1.2.3 ETIOLOGÍA	7
1.2.4 EPIZOOTIOLOGÍA	8
1.2.5 PATOGENIA	9
1.2.6 CUADRO CLÍNICO	11
1.2.7 DIAGNÓSTICO	12
1.2.8 TRATAMIENTO	15
2 JUSTIFICACIÓN	16
3 OBJETIVO GENEREAL	16
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5 HIPÓTESIS	17
6 MATERIAL Y MÉTODOS	17
6.1 LUGAR DE TRABAJO	17
6.2 DESCRIPCIÓN	17

6.3	GRADO DE INFECCIÓN DE LAS COLONIAS SELECCIONADAS	18
6.4	METODOLOGÍA PARTICULAR PARA CADA OBJETIVO	19
6.4.1	CRECIMIENTO Y REPLICACIÓN DE ESPORAS RELACIONADOS CON LA DOSIS INICIAL APLICADA	19
6.4.2	LETALIDAD Y LONGEVIDAD PROMEDIO DE LAS ABEJAS INFECTADAS	20
6.4.3	VIABILIDAD Y POTENCIAL DE PATOGENICIDAD DE ESPORAS ALMACENADAS	21
6.5	METODOLOGÍA EN COMÚN PARA CADA OBJETIVO	22
6.5.1.	TÉCNICA DE INOCULACIÓN POR ALIMENTACIÓN FORZADA	22
6.5.2.	TÉCNICA DE LABORATORIO PARA LA EXTRACCIÓN DE ESPORAS	23
6.5.3.	CONTEO DE ESPORAS	24
6.5.4.	TÉCNICA DE CANTWELL	25
6.6	ANÁLISIS DE DATOS	26
7	RESULTADOS	27
8	DISCUSIÓN	30
9	CONCLUSIONES	33
10	BIBLIOGRAFÍA	35

CUADROS

CUADRO 1. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE INFECCIÓN DE COLMENAS SEGÚN LA CANTIDAD DE ESPORAS ANALIZADAS	14
CUADRO 2. SEIS DILUCIONES CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ESPORAS	19
CUADRO 3. DILUCIONES DE CUATRO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ESPORAS EN DISTINTAS CONCENTRACIONES, DONDE LA DENOMINACIÓN “H” SE REFIERE A ALTAS CONCENTRACIONES EN IDIOMA INGLÉS “ <i>HIGH</i> ”	20
CUADRO 4. TRATAMIENTOS CON 20,000 ESPORAS/ μ L ALMACENADOS POR DIVERSOS PERIODOS DE TIEMPO, DONDE LA DENOMINACIÓN “O” SE REFIERE A ESPORAS VIEJAS EN IDIOMA INGLÉS “ <i>OLD</i> ”	21
CUADRO 5. PORCENTAJE DE ABEJAS QUE RESULTARON INFECTADAS Y NÚMERO DE ESPORAS PROMEDIO POR INDIVIDUO (\pm EE) DE GRUPOS DE ABEJAS, A LOS 18 DÍAS DE HABER SIDO INOCULADAS CON SEIS DILUCIONES CONTENIENDO CANTIDADES VARIABLES DE ESPORAS	28

FIGURAS

- FIGURA 1.** DIAGRAMA DE UNA ESPORA DE MICROSPORIDIO 8
DONDE SE MUESTRA EL DISCO DE ANCLAJE, POLAROPLASMO
LAMINAL, EXOSPORA, ENDOSPORA, POLAROPLASMO
VESICULAR, EL NÚCLEO, FILAMENTO POLAR Y LA VACUOLA
POSTERIOR
- FIGURA 2.** CÉLULA EPITHELIAL DEL VENTRÍCULO DE *Apis ceranae* 8
INFECTADA POR *Nosema ceranae*. NOTA LA CÉLULA INFECTADA
ESTÁ AISLADA DE LOS TEJIDOS SANOS CIRCUNDANTES (HT).
D= MEROZOITO; DM= MEROZOITOS DIVIDIDOS; HC= MEMBRANA
CELULAR DE LA CÉLULA EPITELIAL DEL VENTRÍCULO DE LA
ABEJA; HN= NÚCLEO DE LA CÉLULA DEL VENTRÍCULO DE LA
ABEJA; IS= ESPORA INMADURA; SB= ESPOROBLASTO CON EL
DESARROLLO DEL FILAMENTO POLAR. BARRA= 5 μ M
- FIGURA 3.** PATOGENIA DE LAS ESPORAS DE *Nosema spp* 10
- FIGURA 4.** COLMENA CON HECES COLOR MARRÓN EN LA 12
CÁMARA DE CRÍA
- FIGURA 5.** MACERADO DE ABDÓMENES DE ABEJAS Y 13
OBSERVACIÓN DE ESPORAS EN EL MICROSCOPIO COMPUESTO
CON EL OBJETIVO DE 40X PARA DIAGNÓSTICO DE LA
ENFERMEDAD
- FIGURA 6.** HEMATOCITÓMETRO VISTO CON EL OBJETIVO DE 40X 13
DEL MICROSCOPIO COMPUESTO

FIGURA 7. ESPORAS DE <i>Nosema ceranae</i> EN UNO DE LOS CUADRANTES DE LA CÁMARA DE NEWBAUER CON EL OBJETIVO DE 100X DEL MICROSCOPIO COMPUESTO	14
FIGURA 8. LOTES DE ABEJAS INOCULADAS MANTENIDAS EN JAULAS DE MADERA A UNA TEMPERATURA DE 3.46 °C Y UNA HUMEDAD RELATIVA DEL 58%	18
FIGURA 9. TÉCNICA DE ALIMENTACIÓN FORZADA	22
FIGURA 10. MACERADO, FILTRADO Y CENTRIFUGADO DE LOS ABDÓMENES DE ABEJAS INFECTADAS CON ESPORAS DEL HONGO <i>N. ceranae</i> PARA OBTENER LAS ESPORAS CONCENTRADAS EN UN “PELLET”	23
FIGURA 11. ESPORAS OBSERVADAS EN EL HEMATOCITÓMETRO CON AYUDA DEL MICROSCOPIO COMPUESTO CON EL OBJETIVO DE 100X	25
FIGURA 12. TIEMPO PROMEDIO DE VIDA EN DÍAS (\pm EE) DE ABEJAS INDIVIDUALMENTE INOCULADAS CON MÁS DE 100,000 ESPORAS DE NOSEMA CERANAE Y DE ABEJAS TESTIGO NO INFECTADAS	29
FIGURA 13. VIABILIDAD Y VIRULENCIA DE ESPORAS ALMACENADAS EN DISTINTOS PERIODOS DE TIEMPO	29

RESUMEN

DE LA MORA PEÑA ALVARO. Patogenicidad y virulencia de esporas del hongo *Nosema ceranae* en abejas melíferas (*Apis mellifera* L.); bajo la dirección del PhD Ernesto Guzmán Novoa y de la MVZ Adriana Correa Benítez.

La nosemosis es una enfermedad de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.), causada por *Nosema apis* y *N. ceranae*, hongos microsporidios intracelulares. Por muchos años se creyó que solo *N. apis* causaba la enfermedad, pero *N. ceranae* se descubrió recientemente asociada a casos de mortalidad de abejas. A través de sus esporas, estos microorganismos parasitan las células epiteliales del ventrículo e intestino de las abejas, destruyéndolas y alterando la fisiología digestiva de estos insectos.

En este estudio se prepararon 17 diluciones con distintas concentraciones de esporas de *N. ceranae* (desde 32 a 1'000,000 de esporas por abeja), con las cuales se inocularon 1,560 abejas por vía oral para determinar la patogenicidad y virulencia del microorganismo. También se midió el tiempo de vida de abejas inoculadas con esporas del hongo y de abejas no infectadas, así como el tiempo que las esporas pueden mantenerse viables, a través de inocular abejas con esporas que habían sido almacenadas a distintos intervalos de tiempo.

Se determinó que las esporas de *N. ceranae* son patógenas a *A. mellifera* L., encontrándose que la dosis mínima de infección de esporas a las abejas se ubica entre 0 y 32 esporas por individuo. La correlación entre los niveles de inóculo inicial y nivel de infección de nosemosis a los 18 días fue altamente significativa ($r = 0.66$; $P < 0.0001$; $n=324$). El 98% de las abejas presentaron la enfermedad al ser inoculadas con una dosis de 20,000 esporas/abeja. Al inocular a las abejas con dosis de $\geq 4,000$ esporas de *N. ceranae* por abeja, las esporas tuvieron una replicación de 14.9 ± 1.4 millones de esporas. El tiempo de vida de las abejas infectadas disminuyó en un 14% en relación al tiempo de vida de las abejas no inoculadas con el hongo. Las esporas almacenadas hasta por un periodo de

[Type text]

tiempo de dos años permanecieron viables y potencialmente patógenas, pudiendo generar una replicación promedio de 5,3 millones de esporas por abeja. La información generada en este estudio muestra que las esporas de *N. ceranae* son altamente infectivas, patógenas y virulentas a las abejas. Sin embargo, su efecto sobre el tiempo de vida de las abejas es relativamente menor. Esta información y las metodologías usadas, sientan las bases para realizar más estudios que permitan entender como *N. ceranae* afecta la salud de las abejas melíferas.

Palabras clave: *Nosema ceranae*, esporas, patogenicidad, virulencia, viabilidad.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

A través de la historia, las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.)* han tenido un impacto positivo en el medio ambiente, son responsables de contribuir al equilibrio ecológico del planeta al encargarse de mantener la biodiversidad de especies vegetales, incrementar la producción de alimentos vegetales por medio de la polinización de plantas silvestres y cultivos agrícolas, lo cual incide en la producción de alimentos para muchos seres vivos incluido el hombre. Éste último, al darse cuenta de todas estas cualidades de las abejas, se ha esforzado a través de los años en aprovecharlas para beneficio propio; encargándose de diseñar tecnología aplicable para poder extraerlas de su medio natural (trasiego) y trabajarlas en condiciones controladas mediante el uso de colmenas tecnificadas, poniendo especial interés en reproducirlas, obtener sus productos (miel, polen, propóleos, veneno de abeja, jalea real, entre otros), así como protegerlas del medio ambiente y de las enfermedades que las afectan.

Dentro de las enfermedades y problemas que afectan a las abejas melíferas, encontramos enfermedades virales, bacterianas, fungales y parasitarias; además de la africanización, problemas ambientales y depredadores, que afectan su biología, su comportamiento y su ciclo de vida.

Una nueva amenaza a la que se enfrentan las abejas actualmente es conocida como el Síndrome del Colapso de las Colonias (SCC).^{†1,2,3} Este síndrome es un fenómeno a nivel mundial, apareció en el invierno de 2006 en Estados Unidos de América, Canadá, Europa, Asia, África y Australia;² el SCC ha consternado a apicultores, científicos, autoridades y al público en general, debido a que este fenómeno ha causado grandes pérdidas económicas

* *Apis mellifera* L. Clasificación taxonómica: Reino Animalia, Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Hymenoptera, Suborden Clistogastra, Superfamilia Apoidea, Familia Apidae, Género *Apis* y especie *mellifera* L.

† SCC. Síndrome del Colapso de las Colonias, internacionalmente el fenómeno es nombrado como *Colony Collapse Disorder* por lo cual se identifica por sus siglas CCD conocido a nivel mundial en idioma inglés^{2,4}

en el sector apícola,³ equivalentes a los 1,000 millones de dólares al año; este fenómeno se caracteriza por que las colonias se debilitan y se despoblan hasta desaparecer en el invierno e inicio de la primavera sin una posible causa que lo ocasione.^{2,3,4} Al inicio de la primavera, las colmenas se encuentran vacías sin la presencia de cadáveres de abejas adultas y la cría en diferentes estados de desarrollo está muerta.² Este síndrome desde su aparición, ha llegado a afectar a más del 30% de las colonias y su impacto es tres veces mayor al valor considerado como normal (10 %) de pérdida en invierno. Actualmente se desconoce su origen.³

Diversos estudios han encontrado que dentro de los posibles factores implicados en el despoblamiento de las colmenas se encuentran: la parasitosis causada por el ácaro *Varroa destructor*, la cual se ha asociado al 85% de los casos en el norte de América, debido a la resistencia que ha generado varroa a los acaricidas comerciales (Amitraz),³ lo cual disminuye considerablemente el control de la enfermedad, debido al uso indiscriminado de éstos en el mundo.³ Higes reportó en 2008 que el microsporidio *Nosema ceranae* fue el principal agente encontrado en las colmenas afectadas en Europa matando del 34% al 80% de las colonias; observó también en 2009 que las abejas infectadas con nosema salen de la colmena para morir en el exterior y así evitar que la enfermedad se siga diseminando dentro, ese comportamiento es llamado “eliminación de patógenos suicida”.⁴ Entre otros factores relacionados con el SCC encontramos virus, bacterias, parásitos, acaricidas, estrés, poblaciones débiles, falta de alimento proteínico, mal manejo, pesticidas y cambios climáticos;^{1,2,3,5,6} asimismo se ha encontrado que en el invierno la reducción de la población en las colonias es del 42%, mientras que las reservas de alimento se reducen más del 47%.³ Todos estos factores actúan en combinación y deterioran la calidad de vida de las colonias, debilitándolas hasta matarlas.³

1.2 NOSEMOSIS

Dentro de los diversos problemas que enfrenta la apicultura se encuentra la nosemosis, que es una enfermedad que afecta la calidad de vida y productividad de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.), es causada por microsporidios intracelulares del género *Nosema* (*Nosema Apis* Zander 1909 y *Nosema ceranae* Fries 1994).^{7,8,9}

1.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La nosemosis está distribuida a nivel mundial^{4,3,8} y es conocida también como nosemiasis o enfermedad de la desaparición espontánea. La enfermedad se caracteriza porque el microorganismo daña el tracto digestivo de las abejas adultas, las debilita y las vuelve menos productivas ocasionando grandes pérdidas en las poblaciones apícolas cuando los niveles de infección son altos.^{3,9} Actualmente esta enfermedad se ha asociado con el SCC, debido a que en 2006 *N. ceranae* y el síndrome comenzaron a afectar a las abejas melíferas.^{10,11,12}

1.2.2 NOSEMOSIS EN MÉXICO Y EN EL MUNDO

Nosema apis fue descubierta por primera vez en el año de 1857 por Dönhoff y Leuckart. En 1909 el alemán Enoch Zander la nombró como nosemosis demostrando que era una enfermedad enzootica de las abejas causada por esporas, a las que clasificó como microsporidios y dio al patógeno el nombre de *Nosema apis*. Zander descubrió que las esporas alteran el epitelio del intestino medio de las abejas. En el año de 1952 los investigadores Katznelson y Jamieson encontraron que la enfermedad podía ser tratada con éxito empleando fumagilina.^{4,9,10}

En el año 2007 se encontró que la subespecie *Nosema ceranae* causante de la enfermedad en las abejas asiáticas *Apis cerana* Fabricius, también afectaba a las abejas europeas (*Apis mellifera* L.).^{4,3,8} Sin embargo Yakobson en 1992 había observado que este microorganismo estaba presente en ambas especies de abejas, sin embargo, no había reportado los daños que le ocasionaba a *A. mellifera*.⁸ El diagnóstico para determinar la presencia de *N. ceranae* se

determinó por medio de técnicas moleculares como la reacción en cadena polimerasa (PCR), esto es debido a que a pesar de que las esporas de *N. ceranae* son de menor tamaño que las de *N. apis*, no existe una diferencia significativa entre ellas, mientras que con esta técnica molecular el diagnóstico es más efectivo. Esta prueba es una técnica diagnóstica con mayor sensibilidad y especificidad al microorganismo, además de ser rápida, económica y sencilla.^{2,13,14} La especie *Nosema ceranae* se considera más patógena para *Apis mellifera* que *N. apis*, hasta la fecha ha sido localizada en Canadá, Estados Unidos, al sur y este de Europa, Asia y México.^{2,4,9,13} Se ha argumentado que la estrecha relación que existe en Asia entre las abejas *Apis cerana* y *Apis mellifera*, propició que el patógeno cambiara de huésped. Debido a su patogenicidad se considera una seria amenaza para la apicultura mundial, sobre todo porque el microsporidio se ha implicado en algunos casos del SCC en diversas regiones del mundo (Europa),^{1,2,4,9,13,15,16,17} a diferencia de *N. apis*, la cual no ha tenido una correlación estadística positiva ni significativa con la mortalidad de las colonias en Canadá.³

La nosemosis causada por *N. apis* fue reportada en México en el año 1965 por Zozaya.^{1,13,18} En la década de los 80's su incidencia era del 9 %, teniendo reportes de su presencia en distintas zonas del país; de hecho en 1981 se encontraron positivas 40% de las colmenas evaluadas por Guzmán-Novoa en la península de Yucatán,^{1,13} mientras que Wilson y Nunamaker la encontraron en 117 colonias distribuidas en todo el territorio nacional.¹ En el año 1993 la prevalencia aumentó al 13% y en 2006 se incrementó hasta el 75%.¹¹ Martínez y Medina encontraron en 2007 que la prevalencia era del 74.07% en colmenas tecnificadas y del 53.06% en enjambres silvestres en el estado de Yucatán, a pesar de que se considera que el impacto de la enfermedad en climas tropicales no es de gran magnitud.^{1,15,19} Guzmán-Novoa reportó que la subespecie *N. ceranae* afecta también a la abeja africanizada (*Apis mellifera scutellata*,) y que existe en México en los estados de México, Morelos, Hidalgo y Distrito Federal por lo menos desde 2004.^{9,13}

1.2.3 ETIOLOGÍA

Nosema apis y *Nosema ceranae* son parásitos microscópicos intracelulares obligados, pertenecientes al Reino *Fungi* (hongos) del *Phylum* de los microsporidios que son microorganismos unicelulares. Su mecanismo de reproducción e infección se caracteriza por formar esporas como uno de sus estadios de resistencia, debido a que su material vegetativo es incapaz de reproducirse fuera de la célula, que gracias a la formación de la espora permanece viable hasta por un periodo de un año.^{1,7,8,9,10,12,13,16}

Las esporas tienen una pared interna compuesta de alfa-quitina y proteínas, mientras que la externa es una matriz densa proteica y granulofibrosa que carece de cilios;^{1,9} las esporas son ovaladas y miden de cuatro a siete micrómetros (μm) de largo por dos a cuatro micras de ancho, aunque las esporas de *N. ceranae* son ligeramente más pequeñas (de 3.3 a 5.5 μm).^{1,8,9,10} En su interior se encuentra el esporoplasma que es la parte infecciosa, así como la forma vegetativa (merozoito) la cual tiene dos núcleos llamados “diporoclarion”.¹ Además, la espora está formada por tres estructuras especializadas de infección: un filamento con luz llamado filamento polar, el poroplasto y la vacuola posterior. El filamento polar mide 420 μm (70 veces más que la espora), está enroscado y se encuentra unido a un disco de anclaje; el filamento polar de *N. ceranae* es 20 o 30 μm menor que el de *N. apis*. El poroplasto es una extensión de la membrana ubicada al interior de la espora formado por el poroplasto laminar y el poroplasto vesicular.^{1,9} La espora presenta en uno de sus polos un micrópilo que permite la salida de la forma vegetativa a través del filamento polar.¹⁰ Su reproducción es sexual o asexual y carece de mitocondrias y de peroxisomas[‡] (Figuras 1 y 2).^{1,8,10,12,13} La viabilidad de la espora de *N. ceranae* como ya se ha mencionado, se puede mantener por meses incluso hasta un año, pero si se expone a temperaturas mayores a los 37°C, menores a 0°C o a fumigantes como el ácido acético, se reduce considerablemente.^{1,9,10}

[‡] **Peroxisomas.** Organelo celular de las células eucarióticas que contiene catalasas y peroxidases, enzimas necesarias para la detoxificación celular

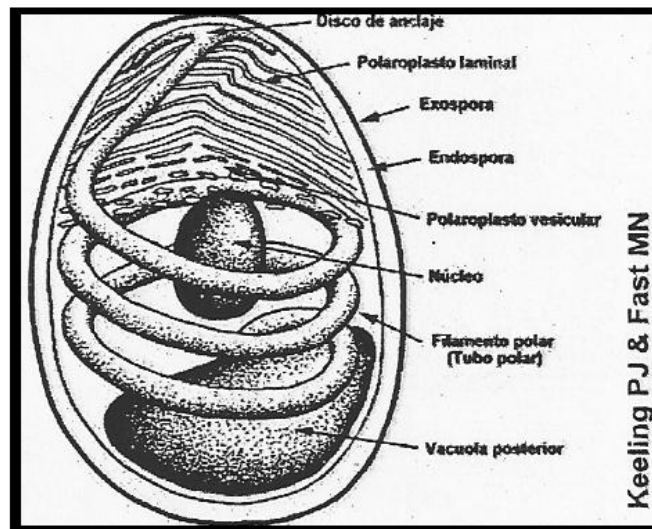


Figura 1. Diagrama de una espora de microsporidio donde se muestra el disco de anclaje, polaroplasmo laminar, exospora, endospora, polaroplasmo vesicular, núcleo, filamento polar y la vacuola posterior¹

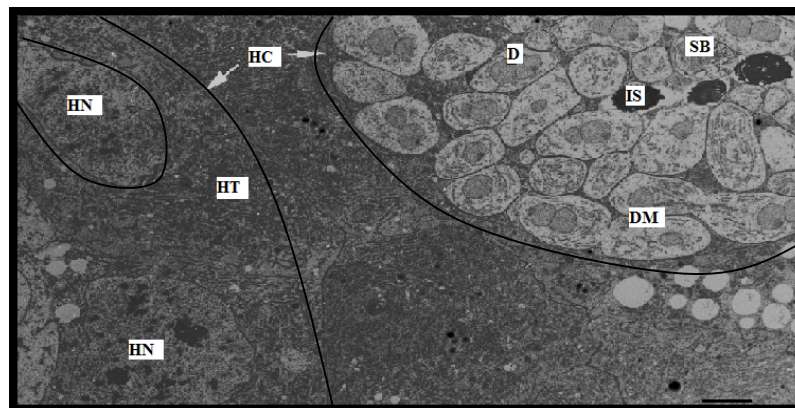


Figura 2. Célula epitelial del ventrículo de *Apis ceranae* infectada por *N. ceranae*. Nota: la célula infectada está aislada de los tejidos sanos circundantes (HT).

D= Merozoito; DM= Merozoitos divididos; HC= Membrana celular de la célula epitelial del ventrículo de la abeja; HN= Núcleo de la célula del ventrículo de la abeja; IS= Espora inmadura; SB= esporoblasto con el desarrollo del filamento polar. Barra= 5 μm ^{1,8}

1.2.4 EPIZOOTIOLOGÍA

Se cree que la nosemosis es la enfermedad de las abejas con mayor diseminación en el planeta y afecta las tres castas de abejas (reina, obreras y zánganos). Las esporas se encuentran viables dentro de la colmena durante todo el año, incrementando su presencia después de temporadas climáticas críticas (inviernos, nevadas, vientos, lluvias) obligando a

las abejas a permanecer en el interior; determinándose así que cuando las abejas permanecen en el interior por periodos largos de tiempo, los niveles de infección se incrementan entre ellas considerablemente por transmisión horizontal, debido al estrecho contacto que existe entre las abejas.^{1,7,10,15} Las colmenas con mayores niveles de infección son aquellas que se ubican en lugares húmedos, fríos y sombreados;^{9,10} asimismo las abejas se contagian por el pillaje, la deriva, contacto con reinas infectadas, panales y equipo de la colmena contaminados con excretas.¹⁰ Se ha observado que las colonias infectadas pueden transmitir la enfermedad a otras colonias sanas en un periodo de tres a cinco meses.⁴ Higes⁴ demostró que el 50% de la población infectada con *N. ceranae* de las colmenas afectadas murió en el interior de las colmenas y encontró que esas abejas tenían una replicación de esporas entre 3.5³ y diez millones de esporas en el invierno,⁴ mientras que a principios del verano los niveles de infección bajaron debido a que las abejas recién emergidas no se encuentran infectadas.^{3,4} Fries descubrió que el incremento de los niveles de infección de *N. ceranae* en la primavera se debe a que las abejas jóvenes consiguen la enfermedad al estar limpiando las celdas contaminadas.^{7,9,13}

Las abejas en condiciones normales defecan fuera de la colmena pero cuando las condiciones climáticas son adversas o cuando están enfermas lo hacen dentro de la misma, contaminando los panales con esporas, por lo que las abejas al limpiarlos adquieren la enfermedad y contaminan a sus compañeras a través de la trofolaxia,[§] la reina también se contamina al ser alimentarla con jalea real contaminada.^{7,9,10,}

1.2.5 PATOGENIA

Nosema spp. tiene un ciclo de vida de siete días, pero en un periodo de dos a cinco días se pueden desarrollar nuevas esporas las cuales marcan el inicio y fin del ciclo; las esporas son el mecanismo de diseminación de la enfermedad.^{1,10,16}

[§] **Trofolaxia.** Mecanismos de comunicación entre las abejas que sirve para transmitir feromonas y alimento de boca a boca

Una vez que las abejas han ingerido las esporas, éstas llegan al buche melario, al proventrículo y el ventrículo** donde tienen contacto con las secreciones gástricas.^{7,12} Estas secreciones aumentan la presión osmótica de las esporas y abren el micrópilo para que salga el filamento polar que se adhiere a la pared de la célula epitelial e inyecta la forma vegetativa o filamentosa del microsporidio al interior de la célula. Una vez dentro, se lleva a cabo el estadio de “planonte” donde la espora se alimenta y se reproduce a costa de la célula (Figura 3); una vez finalizado pasa al estadio de “meronte”, en el cual el núcleo de la célula de la forma vegetativa se divide en dos,²⁰ luego pasa a “esporoblasto” y finalmente se transforma en “espora”.^{9,10,20} Las esporas son liberadas a la luz del tracto intestinal conforme van destruyendo la célula epitelial. Las esporas replicadas pueden infectar más células epiteliales adyacentes o acumularse en el recto para posteriormente ser eliminadas en las heces, lo que ocasiona que las funciones digestivas de las abejas sean inhibidas dos o tres semanas post-infección para finalmente debilitarse y morir.^{1,10} Cuando las infecciones llegan a su máximo nivel pueden replicarse de 30 a 50 millones de esporas en una sola abeja, sin embargo, cuando ésta no defeca puede albergar hasta 250 millones de esporas.^{1,9,16}

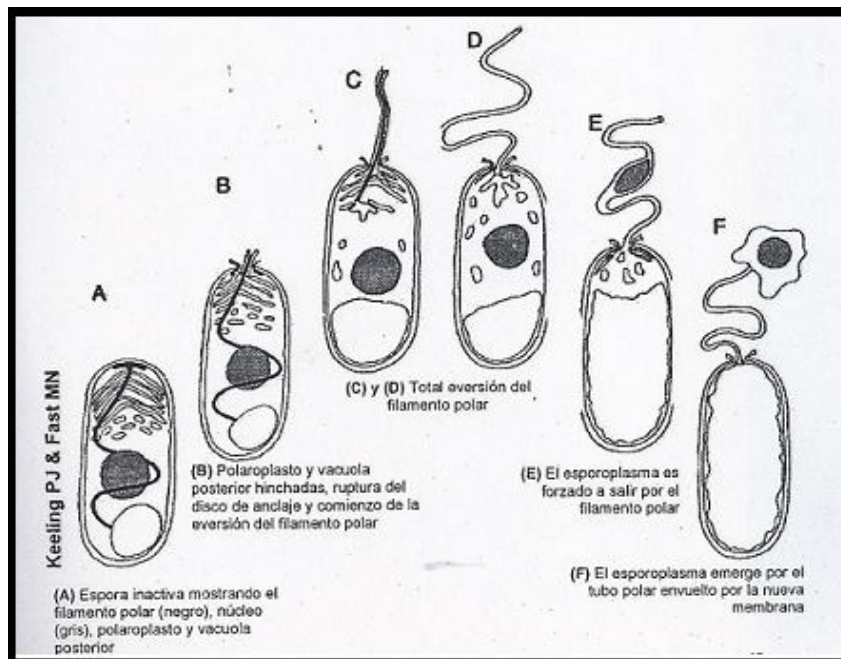


Figura 3. Patogenicidad de las esporas de *Nosema* spp.¹

** **Ventrículo.** Considerado el estómago verdadero de las abejas, en donde inicia el proceso de la digestión

Una vez replicadas las esporas, pueden pasar del tracto digestivo a otros órganos alterando sus funciones como es el caso de los túbulos de Malpighi, tejido adiposo, músculos torácicos, glándulas hipofaríngeas y ovarios, ocasionando que las abejas nodrizas disminuyan la producción de jalea real por la involución de las glándulas hipofaríngeas y no alimenten adecuadamente a las reinas ni a las larvas; las reinas disminuyen la postura de huevos y los que ponen son menos viables, los ovocitos se reabsorben y los ovarios involucionan, finalmente las reinas se vuelven incapaces de repoblar la colonia.^{1,2} Todo esto disminuye la población de la colonia, su productividad, debilitando la colonia hasta llevarla a la muerte.^{2,10}

1.2.6 CUADRO CLÍNICO

La enfermedad puede tener un curso crónico y no manifestarse, pero cuando genera algunos signos significa que la infección es grave.^{9,10}

La reina de una colonia afectada puede presentar retraso y su disfunción se ve reflejada en una mala postura de huevo y en la incapacidad que tiene para repoblar la colonia, la cual ha tenido una gran pérdida de abejas obreras.² Las abejas infectadas disminuyen su longevidad de un 10 a un 50%, donde las abejas jóvenes infectadas comienzan a realizar sus funciones por las de abejas viejas guardianas y pecoreadoras, las cuales al salir de la colmena no son capaces de regresar y mueren fuera de ella.² La colmena se encuentra manchada con heces color marrón ya que las abejas al tener diarrea defecan al salir y al llegar a la colmena (Figura 4).⁷ El 15% de los huevos no llegan a larvas por falta de producción de jalea real para alimentarlas.^{1,2,4,12} Las abejas presentan disentería por la acumulación de agua y esporas en el recto,¹ distensión en el abdomen, las alas parecen dislocadas y por ende tienen dificultad para volar. A nivel histológico el tracto intestinal se aprecia con una coloración blanca, consistencia suave, edematosa y friable con aspecto distendido.^{2,7}



Figura 4. Colmena con heces color marrón en la cámara de cría

A pesar de que existe similitud entre ambas subespecies de nosema, *N. ceranae* no presenta algunos de los signos de *N. apis*, tales como abejas arrastrándose en la piquera. En la infección con ambas especies de nosema, hay presencia de heces color marrón en la colmena, lo que sugiere que cuando las abejas fueron infectadas con 21 millones de esporas y salieron de la colmena, no fueron capaces de regresar muriendo fuera de ésta.^{2,4} Asimismo, ambas especies al dañar las células epiteliales de las abejas, generan que las abejas pierdan resistencia y queden inmunológicamente susceptibles a otros patógenos.^{4,12}

1.2.7 DIAGNÓSTICO

Los signos clínicos nos orientan hacia el diagnóstico, sin embargo las pruebas de laboratorio son las que determinan la presencia del hongo y la severidad de la infección con base en la metodología propuesta por Shimanuki y Knox en el 2000.^{1,21} La severidad de la infección está íntimamente relacionada con la cantidad de esporas existentes y con el estado de salud de la colmena; asimismo, el nivel de infección determina el momento óptimo para la aplicación de tratamiento.⁸

Para realizar el diagnóstico se debe de tomar una muestra de 25 abejas adultas provenientes de la piquera⁴ en un frasco con alcohol al 70%.^{3,7,10} Posteriormente, se usa la técnica de Cantwell la cual consiste en desprender el abdomen de las 25 abejas, colocarlos en un mortero, adicionarles un mililitro de agua destilada por cada abdomen, macerarlos con un pistilo y separar el exoesqueleto del macerado por medio de una coladera. Se toma una gota del sobrenadante y se monta en una laminilla, para buscar en el microscopio compuesto con el objetivo de 40X las esporas del hongo *Nosema spp* (Figura 5). Si la muestra fuese

positiva, se toma otro mililitro del macerado y se coloca en la cámara de Newbauer o hematocitómetro para determinar el nivel de infestación procediendo de la siguiente manera:

Se enfoca en el objetivo de 100X hasta localizar una cuadrícula de 25 cuadros de 0.2 x 0.2 mm cada uno (Figura 6), de éstos se seleccionan 5 cuadros (los 4 de las esquinas y el central). Cada uno de estos cuadros están subdividido en 16 cuadros más pequeños de 0.05 x 0.05 mm cada uno. Se procede a contar el número de esporas presentes en su interior con el objetivo de 400X tomando en cuenta las espore que tengan contacto con el borde izquierdo y superior, pero descartando las que tengan contacto con el borde derecho e inferior (Figura 7).^{1,7,10,12,22}



Figura 5. Macerado de abdómenes de abejas y observación de esporas en el microscopio compuesto con el objetivo de 40X para diagnóstico de la enfermedad

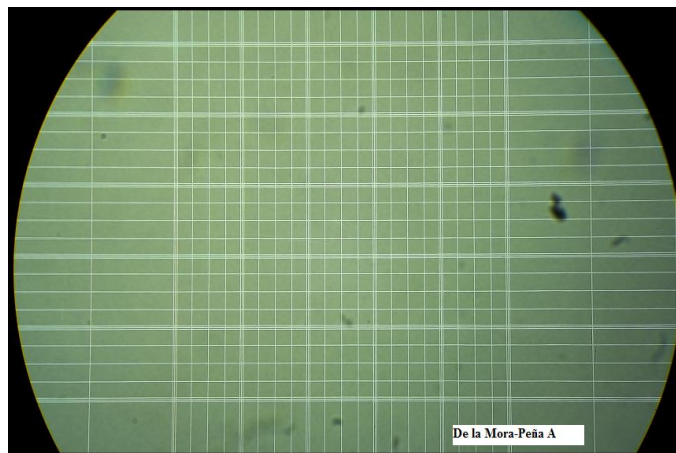


Figura 6. Hematocitómetro visto con el objetivo de 40X del microscopio compuesto

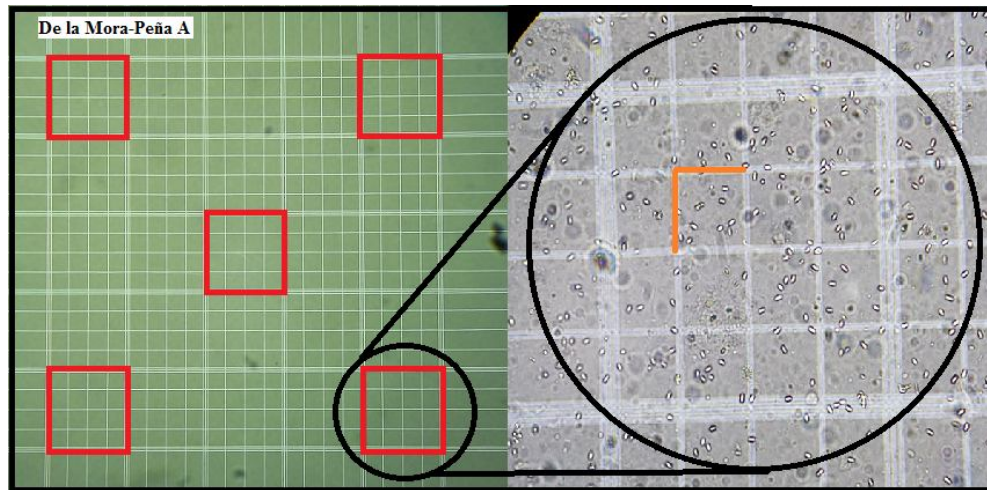


Figura 7. Esporas de *Nosema ceranae* en uno de los cuadrantes de la cámara de Newbauer con el objetivo de 100X del microscopio compuesto

La severidad de la infección se determina con el cuadro propuesto por Jaycox (Cuadro 1) aplicando la fórmula correspondiente para conocer el número promedio de esporas en una muestra.^{1,10,15,21,23}

Cuadro 1. Determinación del grado de infección de colmenas según la cantidad de esporas analizadas^{1,22,23}

Intensidad de la infestación	Millones de esporas por abeja
Nula	< de 0.01
Muy ligera	0.01 – 1.00
Ligera	1.00 – 5.00
Regular	5.00 – 10.00
Semisevera	10.00 – 20.00
Severa	> de 20.00

Para complementar el diagnóstico, es fundamental realizar técnicas moleculares como *PCR* para determinar que el agente etiológico en cuestión es el microsporidio *N. apis* o *N. ceranae*.^{9,14}

1.2.8 TRATAMIENTO

Se recomienda iniciar el tratamiento contra los dos tipos de nosema, cuando las colmenas presentan una infestación “regular” con una infestación mayor de cinco millones de esporas;¹⁰ sin embargo, Guzmán-Novoa y Prieto-Merlos sugieren iniciarlo a partir de una infestación “ligera” de un millón de esporas, aunque este parámetro no está propiamente estudiado.⁹ Para el tratamiento se ha probado que la fumagilina ha evitado desaparición de colonias afectadas con *N. ceranae*, y que fueron susceptibles al SCC.^{2,4,7,8} Se recomienda administrar fumagilina a una dosis de 25 mg por litro en jarabe de azúcar 1:1 suministrando como máximo cuatro litros de jarabe (100 mg de fumagilina) por colmena,⁹ debido a que este medicamento es la mejor opción para tratar a los microsporidios; también se pueden aplicar 120 mg por colmena como preventivo.⁴ Este producto es obtenido a partir del hongo *Aspergillus fumigatus* y ataca la forma vegetativa de la *Nosema spp* alterando su ADN y ARN, sin embargo, no tiene la capacidad de eliminar la enfermedad ya que no destruye las esporas. También se ha tratado la nosemosis con sulfas (trisulfas) a una dosis de siete miligramos por litro de jarabe de azúcar 1:1, sin embargo su efectividad es menor. Es importante considerar que tanto la fumagilina como las sulfas generan residuos en la miel, por lo que ambas sustancias son prohibidas. Otra medida de control en combinación con la fumagilina para destruir a las esporas, es la fumigación del equipo con una dilución con ácido acético con agua al 80% y 20%,^{7,10} durante una semana a una dosis de 150 ml de producto por colmena, este se debe aplicar en las colmenas apiladas, vacías y selladas para evitar que haya fuga de los gases del ácido. También se recomienda exponer las esporas a temperaturas superiores a los 60 °C por quince minutos.^{7,9}

Además, es de suma importancia aplicar el manejo adecuado para controlar y evitar la diseminación de la enfermedad. Dentro de las medidas recomendadas está el cambio de reina anualmente, renovar el 20% de los panales viejos, alimentar con jarabe de azúcar a las colonias en épocas de escasez, colocar a las colmenas en sitios soleados, unir colonias débiles, llevar a cabo un muestreo anual del 20 % de las colonias del apiario y flamear la cuña entre colmena y colmena.^{9,10}

2 JUSTIFICACIÓN

Nosema ceranae es un microorganismo que afecta a las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) generándoles problemas sanitarios, así como pérdidas productivas y económicas al sector apícola cuya magnitud se desconoce. También se desconoce la dosis mínima infectiva, patogenicidad,^{††} virulencia,^{‡‡} e infectividad de esporas de *N. ceranae*. Asimismo se desconoce que tanto *N. ceranae* afecta el tiempo promedio de vida de abejas infectadas con el parásito. Estas interrogantes deben ser resueltas para sentar bases que permitan estudiar el efecto que *N. ceranae* tiene sobre la salud de las abejas melíferas.

3 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de la presente investigación fue determinar la patogenicidad y virulencia de esporas (frescas y almacenadas) del hongo *Nosema ceranae*, así como su efecto en el tiempo de vida en abejas melíferas (*Apis mellifera* L.).

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si el hongo *Nosema ceranae* es patógeno a las abejas melíferas analizando si la dosis mínima de infectividad es capaz de provocar la enfermedad.
2. Determinar la virulencia y establecer si existe relación entre los niveles de inóculo inicial (dosis inicial) y el nivel de infección generado.
3. Determinar la dosis que genera mayor mortalidad y conocer por cuánto tiempo las abejas infectadas con esporas pueden sobrevivir.

^{††} **Patogenicidad.** Capacidad de un organismo para generar una enfermedad, la cual está relacionada con la susceptibilidad inherente del huésped^{24,25}

^{‡‡} **Virulencia.** Es la magnitud o severidad con la que un agente causa una enfermedad en términos de frecuencia y gravedad^{24,25}

4. Determinar por cuánto tiempo las esporas almacenadas por refrigeración y congelación son viables y potencialmente patógenas para causar una infección a las abejas melíferas.

5 HIPÓTESIS

El hongo *Nosema ceranae* es patógeno a las abejas melíferas y su grado de virulencia depende del nivel de infección inicial.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 LUGAR DE TRABAJO

La presente investigación fue realizada en instalaciones de la Universidad de Guelph (*UoG*) Guelph, Ontario, Canadá, específicamente en:

- Centro de Investigación Apícola (*Bee Lab*) *Townsend House, Honey Bee Research Centre, 308 Stone Rd east, Guelph, Ontario, Canada.*
- *Laboratory 3244, 3rd floor, Bovey Building, Dept. of Environmental Biology, University of Guelph, Ontario, N1G 2W1.*

6.2 DESCRIPCIÓN

Para cumplir con cada uno de los objetivos se colectaron abejas pecoreadoras de la piquera de cinco colonias (identificadas con los números 10, 37, 98, 118 y 287) del apiario *Bee Lab Back (BLB)* del Centro de Investigación Apícola, esas colonias fueron previamente diagnosticadas mediante *PCR* como positivas para el hongo *Nosema ceranae*.

Se realizaron distintas diluciones con esporas del hongo *N. ceranae* en jarabe de azúcar al 50%,^{§§} las cuales fueron inoculadas por alimentación forzada a abejas recién emergidas de menos de 24 horas de edad agrupadas por lotes. Los lotes de abejas infectadas se mantuvieron en jaulas de madera a una temperatura entre 32 – 35 °C y una humedad relativa de 50 – 60 % con la finalidad de que la enfermedad fuera incubada por un periodo de 18 días o más (Figura 8).



Figura 8. Lotes de abejas inoculadas mantenidas en jaulas de madera a una temperatura de 34.6°C y una humedad relativa del 58%

6.3 GRADO DE INFECCIÓN DE LAS COLONIAS SELECCIONADAS

El grado de infección de las colonias seleccionadas fue asignado conforme al cuadro de Jaycox,²³ teniendo una intensidad de ligera a severa particularmente considerando los valores que van desde los 1.9 millones hasta 140 millones de esporas por abeja.^{1,10,15,22,23}

^{§§} **Jarabe de azúcar al 50%.** Usado para elaborar las diluciones de los tratamientos a inocular, estimulando el consumo de los mismos. Empleado también para alimentar a las abejas durante el tiempo de incubación

6.4 METODOLOGÍA PARTICULAR PARA CADA OBJETIVO

6.4.1 CRECIMIENTO Y REPLICACIÓN DE ESPORAS RELACIONADOS CON LA DOSIS INICIAL APLICADA

Para poder determinar si *Nosema ceranae* es patógena a las abejas melíferas, si existe correlación entre los niveles de inóculo inicial (dosis inicial) y el desarrollo de la infección, o bien, si la dosis mínima de infectividad es capaz de provocar la enfermedad y causar altos niveles de infección, se inocularon 900 abejas divididas en seis lotes de 50 abejas cada uno, con tres repeticiones. A las abejas les inoculó por vía oral diferentes diluciones de esporas (Cuadro 2), dejando incubar la enfermedad por 18 días para que posteriormente se pudiera determinar si hubo replicación de esporas.²⁶

Tal como se mencionó arriba, para cada dilución establecida como tratamiento se realizaron tres repeticiones y durante esos 18 días se les ofreció a las abejas jarabe de azúcar fresco al 50% y agua destilada estéril (*sdH₂O*) a libre acceso (*ad-libitum*). Las abejas muertas durante este periodo se recolectaron diariamente en bolsas individuales identificadas por lote y se almacenaron en congelación.

Una vez pasados los 18 días, las abejas se sacrificaron por congelación y se maceraron individualmente con el fin de conocer si hubo replicación y desarrollo de la enfermedad.

Cuadro 2. Seis diluciones con distintas concentraciones de esporas

Dilución	Concentración en esporas/abeja (esporas/microlitro)
A	20,000 (2,000)
B	4,000 (400)
C	800 (80)
D	160 (16)
E	32 (3.2)
Testigo	0 (0)

6.4.2 LETALIDAD Y LONGEVIDAD PROMEDIO DE LAS ABEJAS INFECTADAS

Con el objetivo de determinar la dosis que genera mayor mortalidad y conocer el tiempo de vida promedio que permanecen las abejas con la enfermedad, se inocularon 240 abejas divididas en cuatro lotes, tres de ellos con una concentración diferente de esporas y el cuarto se consideró como testigo sin la inoculación de esporas (Cuadro 3).²⁷

Cuadro 3. Diluciones de cuatro diferentes concentraciones de esporas en distintas concentraciones, donde la denominación “h” se refiere a altas concentraciones en idioma inglés “*high*”

Dilución	Concentración en esporas/abeja (esporas/microlitro)
A – h	100,000 (10,000)
B – h	500,000 (50,000)
C – h	1'000,000 (100,000)
Testigo – h	0 (0)

Se realizaron dos repeticiones por dilución inoculando 30 abejas para cada una. El periodo de observación estimado fue de cinco semanas (35 días); sin embargo la observación duró por el tiempo máximo que las abejas lograron sobrevivir. Las abejas muertas se recolectaron diariamente en bolsas de plástico individuales identificándolas por concentración por día. A partir del día quince los cadáveres fueron recolectados por lote en la misma bolsa. Las abejas muertas se mantuvieron en congelación.

Una vez que murieron todas las abejas, se disecaron y se maceraron los abdómenes por grupo a partir del día 15 de observación, para poder determinar si hubo replicación y crecimiento de esporas.

6.4.3 VIABILIDAD Y POTENCIAL DE PATOGENICIDAD DE ESPORAS ALMACENADAS

Con el fin de determinar el tiempo en que las esporas de *N. ceranae* permanecen viables y son potencialmente patógenas para generar la enfermedad, las esporas se almacenaron previamente en refrigeración y congelación por distintos periodos de tiempo. Una vez obtenidas estas esporas, se inocularon 420 abejas divididas en siete lotes, cada uno con una dilución de 200,000 esporas por abeja (20,000 esporas/ μ L) pero variando entre sí por el tiempo de almacenaje de las esporas (Cuadro 4).²⁸

Cuadro 4. Tratamientos con 20,000 esporas/ μ L almacenados por diversos periodos de tiempo, donde la denominación “o” se refiere a esporas viejas en idioma inglés “old”

Tratamiento	Tiempo de almacenaje	Temperatura de almacenaje
A – o	1 semana	4°C
B – o	1 semana	-20° C
C – o	1.5 meses	-20° C
D – o	2 meses	-20° C
E – o	1 año	-20° C
F – o	2 años	-20° C
Testigo – o	Jarabe de azúcar al 50% fresco	Recién elaborado

Se inocularon 30 abejas para cada dilución y se realizaron dos repeticiones por cada una, la enfermedad se incubó por 18 días, las abejas muertas se colectaron diariamente en bolsas individuales identificadas por dilución y se mantuvieron en congelación.

Posterior a este periodo, las abejas sobrevivientes se sacrificaron por congelación y se maceraron para determinar el tiempo en que las esporas almacenadas pueden permanecer viables y capaces de replicarse, produciendo la enfermedad.

6.5 METODOLOGÍA EN COMÚN PARA CADA OBJETIVO

6.5.1 TÉCNICA DE INOCULACIÓN POR ALIMENTACIÓN FORZADA

Esta técnica permitió asegurar que el inóculo^{***} de diez microlitros de tratamiento administrado por vía oral fuera exitoso. La técnica consistió en tomar a las abejas por las alas, con ayuda de una pipeta micrométrica, se tomaron diez microlitros de cada dilución a inocular, suministrando lentamente y colocando pequeñas cantidades del inóculo en la probóscide de la abeja. Para facilitar la ingestión, se frotaron ligeramente las antenas para que la abeja olfatee y deguste el tratamiento, y así extienda la probóscide (Figura 9). En caso de que no extendiera la probóscide, se estimuló frotándola suavemente o se esperó a que la abeja consumiera el alimento sin la extensión de la misma.²⁶



Figura 9. Técnica de alimentación forzada

^{***} **Inóculo.** Cantidad de tratamiento a administrar a las abejas por vía oral

6.5.2 TÉCNICA DE LABORATORIO PARA LA EXTRACCIÓN DE ESPORAS

Con ayuda de dos pinzas de disección se desprendió el abdomen de cada abeja, lo más cercano al propodeo^{†††} evitando que el buche melario se desprendiera del abdomen. Los abdómenes diseccionados se maceraron en un mortero hasta obtener una pasta con fragmentos pequeños de tejidos, se agregó sdH₂O en diversas cantidades con el fin de obtener la concentración y/o el volumen de macerado deseado (un mililitro por abdomen \pm 0.725ml).^{1,7,10,22,26}

Con la finalidad de obtener esporas viables, el macerado de los abdómenes de las abejas se filtró en dos ocasiones, en la primera el macerado pasó a través de un filtro de tela de trama cerrada (77 perforaciones por cm²);¹⁴ en el segundo filtrado se pasó el primer filtrado por otro filtro de trama más cerrada (1000 perforaciones por cm²).^{14,26}

Este último filtrado se transfirió a tubos de *Eppendorf*, los cuales fueron centrifugados a una velocidad de 4,000 rpm por 8 minutos (en este proceso se obtuvieron todas las esporas en un concentrado llamado “*Pellet*” (Figura 10)). Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante dejando una pequeña cantidad útil para diluir el *pellet* formado, con un agitador mecánico (*Vortex*®).²⁶



Figura 10. Macerado, filtrado y centrifugado de los abdómenes de abejas infectadas con esporas del hongo *N. ceranae* para obtener las esporas concentradas en un “*pellet*”

^{†††} **Propodeo.** Última porción del tórax y primera del abdomen de las abejas melíferas

Los *pellets* diluidos se juntaron para homogenizar la concentración de esporas, posteriormente se tomó una pequeña cantidad de ese centrifugado y se realizaron dos diluciones (10X^{†††} y 100X^{§§§}) para facilitar el conteo de esporas obtenidas, ya que hasta este punto hay una concentración alta de esporas.

Para la dilución 10X se tomaron 90 µl de sdH₂O y 10 µl del centrifugado homogenizado de esporas con una pipeta micrométrica, esta solución se agitó nuevamente para diluirla perfectamente.

Para la elaboración de la dilución 100X se tomaron nuevamente 90 µl de sdH₂O y se le agregaron 10 µl del contenido de la dilución 10X, esta nueva solución se agitó para diluir las esporas perfectamente.

6.5.3 CONTEO DE ESPORAS

El conteo de esporas se realizó usando un hematocitómetro^{****} o cámara de Newbauer y un microscopio compuesto con el objetivo de 40X. Con ayuda de una pipeta micrométrica se depositaron 10 µl de la dilución 100X en cada lado del hematocitómetro. Las esporas contadas dentro de los 5 cuadrantes (el inferior izquierdo, inferior derecho, superior derecho, superior izquierdo y central) a ambos lados de la cámara de Newbauer (Figura 11) se sumaron y dividieron entre dos, para obtener un promedio de las esporas encontradas:

$$\underline{\underline{((\text{No. de esporas contadas del lado 1} + \text{No. de esporas contadas del lado 2}) / 2)}}$$

Debido a que se contaron las esporas de la dilución 100X, se multiplicó el número de esporas encontradas por 100 (No. de esporas X 100), ya que por cada espora encontrada en realidad hay 100 en esa dilución.²⁶

^{†††} **Dilución 10x.** Dilución elaborada con 90% de sdH₂O y 10% del extractado final de esporas.

^{§§§} **Dilución 100x.** Dilución elaborada con 90% de sdH₂O y 10% de la dilución 10x.

^{****} **Hematocitómetro o cámara de Newbauer.** Laminilla de vidrio laboratorio, empleado para realizar conteo de células con el microscopio compuesto

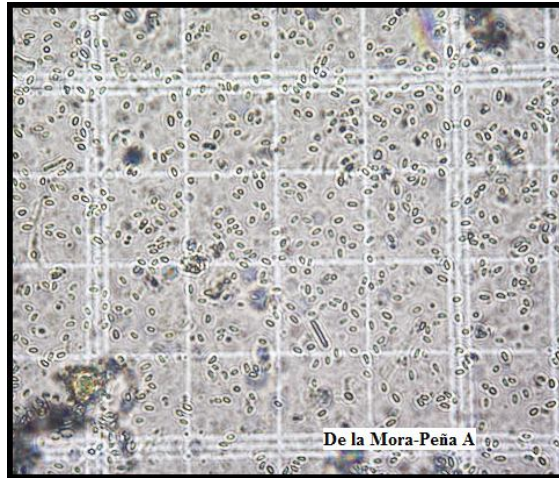


Figura 11. Esporas observadas en el hematocitómetro con ayuda del microscopio compuesto con el objetivo de 100X

6.5.4 TÉCNICA DE CANTWELL

La técnica de Cantwell es un método de diagnóstico cuantitativo para *Nosema spp.* que permite conocer la cantidad de esporas y la severidad de infección que hay en una colmena, y en este caso conocer la cantidad de esporas presentes en las abejas inoculadas.^{1,10,22} El número de esporas real se determina con la siguiente fórmula:

$$\text{No. promedio de esporas por abeja en una muestra} = \frac{(\text{No. de esporas contadas})}{80} \times 4'000,000$$

Con fines prácticos se sintetizó esta fórmula sustituyendo el número de esporas contadas por el valor de uno,²⁶ por el caso de llegarse a encontrar solamente una espora total en la muestra, quedando entonces la fórmula expresada de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} &\rightarrow ((1 / 80) \times 4'000,000) \\ &\rightarrow (0.0125 \times 4'000,000) \\ &\rightarrow 50,000 \text{ esporas/mL o esporas/abeja} \end{aligned}$$

Esta sustitución señala que al encontrar cualquier cantidad de esporas en la cámara de Newbauer, se multiplica por 50,000 y se obtiene el mismo resultado que se obtendría si se aplicara la fórmula completa.

6.6ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron pruebas de normalidad, transformación de datos para ajustarlos a la normalidad, análisis de estadística descriptiva, de correlación lineal simple así como análisis de varianza. Asimismo, se realizaron las pruebas de comparación de medidas de Tukey.

7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la correlación^{††††} entre los niveles de inóculo inicial y el nivel de infección de nosemosis a los 18 días fue altamente significativa ($r = 0.66$; $P < 0.0001$; $n=324$); asimismo en el Cuadro 5 se señala que:

- La dosis mínima de infectividad de las esporas del hongo *Nosema ceranae* se encuentra en un rango mayor a 0 esporas/abeja y menor a 32 esporas/abeja
- El porcentaje de patogenicidad de las esporas del hongo *Nosema ceranae* en una dosis de 32 esporas/abeja es capaz de infectar al 33.9% de la población de abejas inoculadas artificialmente; a partir de una dosis de 4,000 esporas/abeja se consigue infectar al 93.1% de la población, mientras que a una dosis de 20,000 esporas/abeja se logra infectar al 98.1% de la población
- La virulencia de las esporas del hongo de *Nosema ceranae* es capaz de replicar una cantidad máxima de esporas de 14.9 ± 1.4 millones de esporas a partir de una dosis inicial de 4,000 esporas/abeja, observando que a pesar de que la dosis inicial sea mayor, la esporas replicadas no son superiores a 14.9 ± 1.4 millones de esporas.

^{††††} **Correlación.** Parámetro estadístico que determina la relación o dependencia entre dos variables

Cuadro 5. Porcentaje de abejas que resultaron infectadas y número de esporas promedio por individuo (\pm EE) de grupos de abejas, a los 18 días de haber sido inoculadas con seis diluciones conteniendo cantidades variables de esporas

Dilución	No. esporas por dilución	No. abejas infectadas en todas las repeticiones	Abejas infectadas %	No. esporas (millones) \pm Error estándar	Literales
A	20,000	104	98.1	14.9 \pm 1.4	a
B	4,000	81	93.1	14.8 \pm 1.4	a
C	800	74	67.9	10.2 \pm 1.3	b
D	160	59	49.2	6.2 \pm 1.0	c
E	32	37	33.9	1.0 \pm 0.4	d
Testigo	0	0	0	0	

Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) basadas en análisis de varianza con datos transformados a el arco seno de la raíz cuadrada

La mortalidad de las abejas infectadas con una concentración de esporas mayor a 100 mil esporas por abeja se incrementó en un 14% en relación a las abejas testigo, donde el tiempo de vida promedio de las abejas infectadas con 100 mil, 500 mil y 1 millón de esporas por abeja fue de 16.4, 16.9 y 17 ± 0.6 días respectivamente comparado con el testigo que fue de 19.6 ± 0.6 días (Figura 12).

Para determinar la viabilidad y virulencia de esporas de *N. ceranae* refrigeradas y congeladas, en la Figura 13 se representa que las esporas sometidas a los procesos de refrigeración (4°C) y congelación (-20°C) en distintos periodos de tiempo permanecen viables y potencialmente patógenas para producir la enfermedad infectando a las abejas melíferas. Las esporas que presentaron mayor viabilidad y virulencia fueron las almacenadas por una semana en congelación, seguidas de las que se almacenaron una semana en refrigeración, posteriormente las de dos meses en congelación, en tercer lugar se replicaron las de dos años en congelación, mientras que las esporas que presentaron menor

viabilidad y virulencia fueron las almacenadas 1.5 meses en congelación y finalmente las esporas menos viables fueron las de un año en congelación.

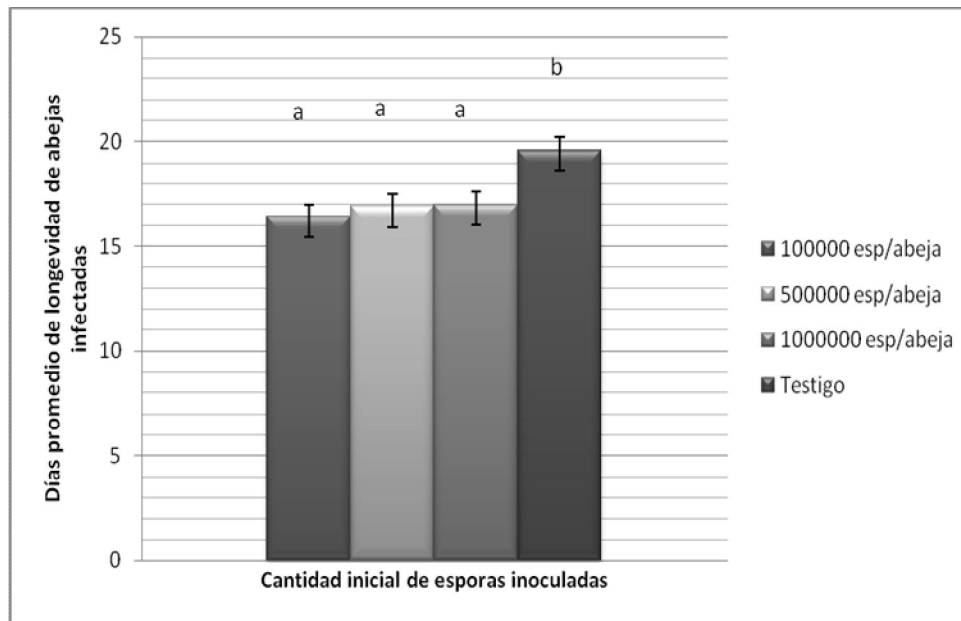


Figura 12. Tiempo promedio de vida en días (\pm EE) de abejas individualmente inoculadas con más de 100,000 esporas de *Nosema ceranae* y de abejas testigo no infectadas. Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) basadas en análisis de varianza y en pruebas de Tukey con datos transformados a el arcoseno de la raíz cuadrada

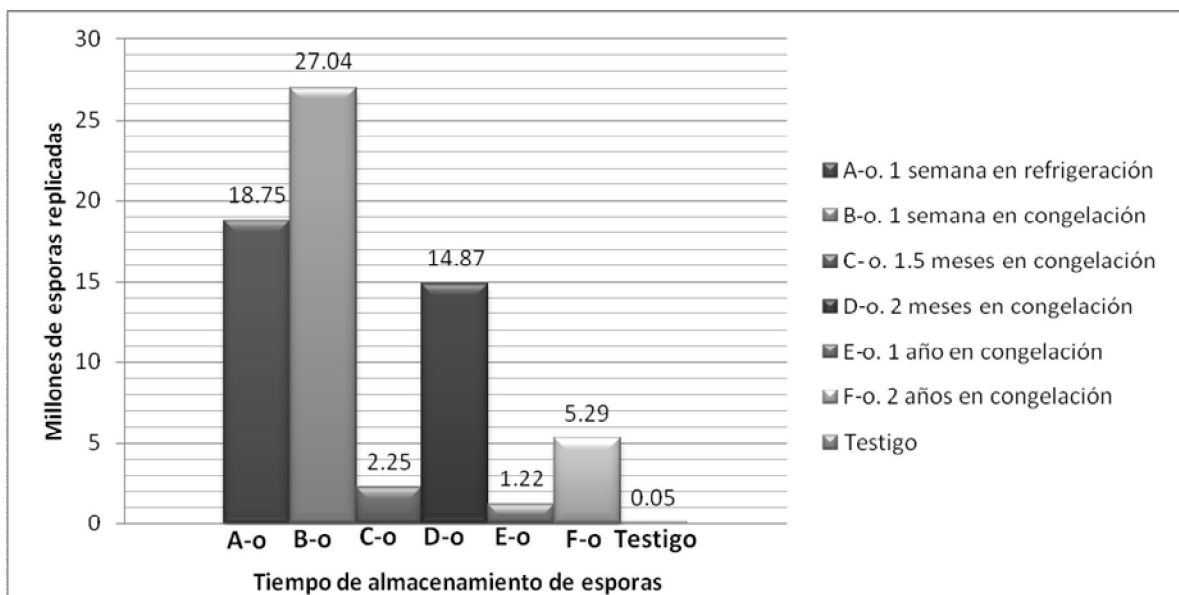


Figura 13. Viabilidad y virulencia de esporas almacenadas en distintos periodos de tiempo

8 DISCUSIÓN

La información obtenida en este trabajo abre las puertas para conocer más acerca de la fisiopatología de *Nosema ceranae*, debido a que la información existente en el mundo sobre nosemosis corresponde a *N. apis*. Gracias a los resultados obtenidos y respondiendo a la principal interrogante de este trabajo, sí las esporas del microsporidio *Nosema ceranae* son patógenas a las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.), se puede decir que las esporas del hongo *Nosema ceranae* son patógenas a *Apis mellifera* L. y capaces de desarrollar la enfermedad. Sin embargo, los resultados obtenidos pueden tener variación en otras regiones del mundo.

Como se ha mencionado, la nosemosis es una enfermedad de curso crónico en la cual las abejas desarrollan signología cuando la infección generada por *N. ceranae* es grave,^{1,16} esta información se aprueba al determinar que la virulencia generada en la enfermedad tiene una íntima relación con la dosis inicial de esporas a la que las abejas son sometidas; el estudio realizado también apoya lo propuesto por Meana en 2010, donde se señala que la severidad de la enfermedad se encuentra íntimamente relacionada con la cantidad de esporas encontradas en las abejas;⁸ siempre y cuando, la dosis inicial de esporas se encuentre entre las cero y las 35 esporas por abeja. A pesar de comprobar que la relación es positiva entre la dosis inicial, la cantidad de esporas replicadas y la severidad de la enfermedad,⁸ se puede agregar que la replicación de esporas llega a un punto máximo de 14.9 ± 1.4 millones de esporas replicadas al aplicar una dosis igual o mayor a 4,000 esporas por abeja.

A pesar de existir similitudes entre ambas especies de *Nosema*, las esporas de *Nosema apis* no se asocian al SCC, teniendo cierta influencia cuando actúan en combinación con otros agentes como *Varroa destructor*.³ En el caso de *N. ceranae*, se ha relacionado esta subespecie como responsable del síndrome.⁴ Asimismo, Higes reportó que las abejas pueden albergar de 40 a 50 millones de esporas,⁹ mientras que en 2010 Meana encontró que la mayor cantidad de esporas generadas en las abejas estudiadas fue de 10.2 millones de esporas en la segunda semana post-infección en España;⁸ sin embargo, como ya se ha

mencionado en el presente trabajo, la máxima cantidad de esporas replicadas fue de 14.9 ± 1.4 (16.3) millones de esporas a partir de una dosis inicial de 4,000 esporas por abeja, obtenidas a las 2.6 semanas (18 días) post-infección en Canadá.

Nosema spp. tiene una letalidad capaz de matar del 10 al 15% de la su población de abejas infectadas.¹ Higes reportó que la mortalidad generada en las colonias infectadas con *N. ceranae* es del 48 al 80 % de la población,⁴ también reportó que las abejas afectadas con esporas de *N. ceranae* reducen su longevidad entre un 10 y 50% del tiempo.² Lo que se puede contribuir con este trabajo, es que las abejas infectadas con esporas de *N. ceranae* a una dosis de 100.000 esporas por abeja, reducen la vida de las abejas infectadas en un 14% después de dos a tres semanas de infectarse; observando también que aunque se inoculen dosis mayores (500,000 y 1,000,000 esporas por abeja), no generará una disminución de la longevidad de las abejas. Con los datos antes mencionados, Higes⁴ señala que la edad a la que las abejas comienzan a desempeñar funciones como pecoreadoras varía, sin embargo puede disminuir cuando no existen pecoreadoras de mayor edad en la colmena; lo que se complementa con el presente estudio, que al disminuir la longevidad de las abejas infectadas en un 14% con el microorganismo *N. ceranae*, obliga a las abejas jóvenes a iniciar actividades de pecoreadoras, las cuales adquieren la enfermedad, se debilitan y mueren fuera de la colmena, volviéndose así un círculo vicioso; que aunado a los demás problemas que genera esta enfermedad en la reina, orillan a la colonia a no poder repoblarse, debilitarse, morir y posiblemente desaparecer.

También se puede señalar que la viabilidad de las esporas de *N. Apis* y *N. ceranae* reportada en 2008 en el *OIE Terrestrial Manual* es de hasta un año;⁷ determinando en el presente estudio que las esporas de *N. ceranae* permanecen viables durante este periodo de un año, generando una replicación de 1.22 millones de esporas a una temperatura de congelación de -20°C ; sin embargo se determinó también que las esporas mantenidas congeladas a la misma temperatura por un periodo de dos años, permanecen viables y generan una replicación de 5.3 millones de esporas en promedio por abeja. La información presente en el libro de patología apícola publicado por OIRSA en 2012,⁹ señala que las esporas de *Nosema* no pueden resistir temperaturas inferiores a los 0°C , sin embargo, como

ya se mencionó en el presente trabajo que las esporas de *N. ceranae* pueden permanecer viables y capaces de generar la enfermedad al resistir temperaturas inferiores a -20°C por un periodo de 2 años. En países como Canadá donde los inviernos son muy crudos, los niveles de infección aumentan en la temporada de primavera y disminuyen a finales de otoño e inicios de invierno; es importante recalcar que en esta última temporada, los niveles de infección de las abejas disminuyen pero a pesar de ello, las esporas permanecen viables.

El tratamiento sugerido para las infecciones de *Nosema spp.* se recomienda comenzar cuando el grado de infección es de ligero o regular (1 o 5 millones de esporas por abeja respectivamente), sin embargo, es necesario conocer cuál es el grado de infección de *N. ceranae* recomendado para iniciar el tratamiento. Asimismo se necesita generar otro tipo de tratamientos, debido a que la fumagilina y las sulfas se encuentran prohibidas en México por los residuos que generan en miel.

9 CONCLUSIONES

Producto de esta investigación se verificó que:

- 1) El nivel de infección con esporas de nosema depende de la cantidad de esporas que ingieren las abejas ya que se encontró una correlación positiva y significativa entre el inóculo inicial y el nivel de nosemosis a los 18 días de incubación, observando que la máxima cantidad de esporas replicadas es de 14.9 ± 1.4 millones de esporas por abeja
- 2) Las dosis infectiva de esporas capaz de desarrollar la enfermedad, puede estar en una dosis de entre una y 32 esporas/abeja
- 3) En cuanto a la patogenicidad del microorganismo se encontró que el 98% de la población de abejas de una colonia puede infectarse con tan solo ingerir una dosis de 20,000 esporas por abeja
- 4) La virulencia de *N. ceranae*, medida en función de la replicación de esporas, reveló que la replicación máxima de esporas por abeja fue de 14.9 millones de esporas a partir de 4,000 esporas inoculadas
- 5) Las abejas inoculadas con 100 mil, 500 mil y 1 millón de esporas vivieron alrededor de tres días menos que las testigos, lo que equivale a una disminución del 14% del tiempo de vida de las abejas inoculadas
- 6) La menor viabilidad y virulencia de esporas se registró en aquellas que se mantuvieron un año en congelación, sin embargo, las esporas que se congelaron por dos años tuvieron mayor replicación que las que estuvieron un año en congelación, a pesar de que su viabilidad disminuye, un porcentaje alto se mantienen infectivas

El presente estudio aporta información útil para el conocimiento de la nosemosis de las abejas melíferas causado por *N. ceranae*; esta información pudiera aplicarse en cualquier parte del mundo y a la vez, pudiera complementar otros estudios realizados. No obstante, con el fin de determinar algunos otros daños así como el impacto económico de *N. ceranae*

sobre las colonias en producción, se recomienda realizar estudios parecidos al de este trabajo en condiciones de campo y en diferentes épocas del año.

Como ya se ha mencionado, los resultados obtenidos de este trabajo dan la pauta para seguir generando información sobre la enfermedad, sobre todo poder conocer la situación sanitaria real de la nosemosis en México, de tal forma que la investigación generada contribuya a mejorar la apicultura nacional

10 BIBLIOGRAFÍA

- 1- CALVETE LYM. Efecto de la Nosemiasis (*Nosema* spp.) sobre la fortaleza poblacional en las colonias de abejas (*Apis mellifera*), la variación en las reservas de alimento recuperación demográfica en la primavera en Guelph, Ontario, Canadá (tesis de licenciatura). México (Distrito Federal) México: UNAM, 2010.
- 2- HIGES M. ET AL. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. Spain. Environmental Microbiology Reports 2009; 1(2): 110–113.
- 3- GUZMÁN-NOVOA E, ECCLES L, CALVETE Y, MCGOWAN J, KELLY PG, CORREA-BENÍTEZ A. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. Apidologie 2010; 41: 443-450.
- 4- HIGES M. ET AL. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Spain. Environmental Microbiology Reports 2008; 10(10), 2659–2669.
- 5- VANENGELSDORP D. Colony Colapse Disorder: A descriptive study. [serial online] 2009 [cited 2009 August 3]. Epidemiological Survey of CCD. Available from: www.prosone.org
- 6- COX-FOSTER DL, ET AL. Colony Colapse Disorder. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee. Science AAAS. 2007: 283, 318.
- 7- NOSEMOSIS OF HONEY BEES. OIE Terrestrial Manual; 2008: 410-414.
- 8- MEANA A, MARTÍN-HERNÁNDEZ R, HIGES M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. Journal of Apicultural Research and Bee World 2010; 49(2): 212-214.
- 9- GUZMÁN-NOVOA E, PRIETO-MERLOS D. Enfermedades micóticas de las abejas adultas. In: GUZMÁN-NOVOA E, CORREA-BENÍTEZ A, editors. Patología, Diagnóstico y Control de las Principales Enfermedades y Plagas de las Abejas Melíferas. San Salvador, El Salvador: OIRSA, 2012: 51-55. En prensa.

- 10- SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Patología Apícola. Programa Nacional para el control de la Abeja Africana. Coordinación General de Ganadería. México (DF): SAGARPA, 2002.
- 11- “VALIDACIÓN DE TECNOLOGÍA PARA EL CONTROL DE NOSEMOSIS EN APIARIOS CRIADEROS DE ABEJAS REINAS” [homepage on the Internet] 2009 [cited 2009]. Available from:
<http://promepca.sep.gob.mx/archivospdf/proyectos/Proyecto186700.PDF>
- 12- DE LA SOTA M. Manual de procedimientos. Enfermedades de las Abejas. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Argentina: SENASA, 2004.
- 13- GUZMÁN-NOVOA E, MOLLAH MH, ARECHAVALETA-VELASCO ME, KOLEOGLU G, VALIZADEH P, CORREA-BENÍTEZ A. *Nosema ceranae* has parasitized Africanized honey bees in Mexico since at least 2004. *Journal of Apicultural Research* 2011; 50(2): 167-169.
- 14- HAMIDUZZAMAN MM, GUZMÁN-NOVOA E, GOODWIN PH. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 2010; 105: 151-155.
- 15- MARTÍNEZ PJF, MEDINA MLA. Prevalencia de *Varroa destructor*, *Nosema apis* Z. y *Acarapis woodi* R. en colonias manejadas y enjambres silvestres (*Apis mellifera*) en la ciudad de Mérida, Yucatán (resultados preliminares). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 2011; 2 (1):25-38.
- 16- HIGES M. ET AL. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 2006; 94: 211 – 217.
- 17- MARTÍN-HERNÁNDEZ R, ET AL. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(20): 6331–6338.
- 18- ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN EPIZOTIOLÓGICA EN MÉXICO Y MUNDIAL DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS NOSEMOSIS [homepage on the Internet]. Comité de enfermedades de las abejas. [cited 2009 Dic]. Available from: <http://www.conasamexico.org.mx>

- 19- RODRÍGUEZ VRI, DOMÍNGUEZ AJ L, COB GLA. Técnicas diagnósticas de parasitología veterinaria. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán: México: 2004: 151-164.
- 20- GRAY FH, CALI A, BRIGCS JD. Intracellular Stages in the Life Cycle of the Microsporidian *Nosema apis*. Journal of invertebrate Pathology 1969; 14: 391-394.
- 21- SHIMANUKI H, KNOX DA. Diagnosis of Honey Bee Diseases. Agriculture Handbook 690. USDA. USA. 2000.
- 22- SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Laboratorio de identificación y diagnóstico apícola. Coordinación del Programa para el Control de la Abeja Africana en el Distrito Federal. México (DF): SAGARPA, 2002.
- 23- JAYCOX ER. Enfermedades de las abejas adultas. Manual de Patología Apícola. México: SAGARPA, 2002.
- 24- THRUSFIELD M. Veterinary epidemiology. 3rd ed. Scotland: Blackwell Science. 2007.
- 25- CARTER GR. Bacteriología y micología veterinaria. 2^a ed. México: El manual moderno, 1994.
- 26- GUZMÁN-NOVOA E, VALIZADEH P. To determine the minimum dose of *Nosema ceranae* spores needed to cause an infection in honey bees (Protocol research). Ontario (Guelph) Canada: UoG, 2011.
- 27- VALIZADEH P. *Nosema* spore dosage and bee mortality rate (High dosage) (Protocol research). Ontario (Guelph) Canada: UoG, 2011.
- 28- VALIZADEH P. Analyzing the viability of old *Nosema* spores by inoculation (Protocol research). Ontario (Guelph) Canada: UoG, 2011.
- 29- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Apicultura Básica. Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. México. SAGARPA: 2001.

- 30- WILLIAMS GR, SHAFER ABA, ROGERS REL, SHUTLER D. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology* 2008; 97; 189–192.
- 31- KEELING PJ, FAST MN. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annu. Rev. Microbiol* 2002; 56:93–116.