



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO DE UN TRATAMIENTO ACARICIDA EN
COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS (*Apis mellifera*
L.) SOBRE SU POBLACIÓN Y EN LOS NIVELES DE
INFESTACIÓN DEL ÁCARO *Varroa destructor* Y
DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ALVARADO AVILA LAURA YAVARIK

ASESORES

PhD. GUZMÁN NOVOA ERNESTO

MVZ. CORREA BENÍTEZ ADRIANA



México, D.F.

Octubre, 2015



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.

DEDICATORIAS

A mis padres

A mi hermano

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser siempre mi ejemplo a seguir, porque sin su amor y apoyo la vida sería mucho más difícil.

A mi hermano, por ser la persona más importante en mi vida.

A las familias Gayosso Velázquez y Molina Obregón, por demostrar que la familia no está siempre compuesta por lazos de sangre.

Al personal del DMZ en ACyOA. A la MVZ Adriana Correa, por la asesoría y oportunidades brindadas. A *Richy*, por los consejos dados, por su apoyo. A Itzel, por ir a los apiarios cuando yo no podía. A *Nuri*, porque sin su ayuda y paciencia no hubiéramos terminado. A la Dra. *Laurita* por corregir y ordenar mi lluvia de ideas.

Al Dr. Guzmán por su apoyo durante todo el trabajo. A *Hamid*, por enseñarme las técnicas de laboratorio. A Hailey, Jaqueline y Hannan por ayudarme a procesar las muestras. A la Universidad de Guelph, por las facilidades brindadas.

A todos los que se desvelaron muestreando o procesando muestras para ayudarme.

Al MVZ Ángel López y al Sr. Bonilla por permitirme muestrear sus apiarios.

A Aldo, por escucharme, aconsejarme y también por ayudarme con la tecnología.

A Tania y Clau, por estar conmigo desde hace años, por apoyarme, impulsarme, regañarme.

A *Ger*, por estar aquí.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 <i>Varroa destructor</i> y sus efectos en la salud de las abejas	7
1.3 Virus de las abejas	11
1.4 Virus de las alas deformes (VAD) y sus efectos en la salud de las abejas	17
1.5 Interacción entre Varroa y el Virus de las alas deformes	20
1.6 Efecto de acaricidas sobre el VAD	22
1.7 Justificación	26
2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS	28
4.1 Área de estudio	28
4.2 Selección de colonias experimentales	28

4.3 Determinación de la población de abejas	29
4.4 Determinación de niveles de varroosis	30
4.5 Tratamiento con tau-fluvalinato	31
4.6 Muestreos de abejas adultas y cría	31
4.7 Diagnóstico y cuantificación del VAD	33
4.7.1 Extracción de ARN	33
4.7.2 Síntesis de ADNc	34
4.7.3 RT-PCR	35
4.7.4 Cuantificación relativa de la carga viral	36
4.8 Análisis estadístico	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre los niveles de parasitismo de <i>V. destructor</i>	37
5.2 Efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre la población de abejas adultas	38
5.3 Efecto de la reducción de varroosis sobre los niveles del virus de las alas deformes en abejas	38
6. DISCUSIÓN	39

6.1 Efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre los niveles de parasitismo de <i>V. destructor</i>	39
6.2 Efecto de la reducción de varroosis sobre los niveles del virus de las alas deformes en abejas	39
6.3 Efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre la población de abejas adultas	42
7. CONCLUSIONES	43
8. REFERENCIAS	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1	Determinación de la población de abejas adultas en las 16 colonias de estudio en cada uno de los muestreos	45
Cuadro 2	Determinación del nivel de infestación de <i>Varroa destructor</i> en abejas adultas de cada colonia en cada uno de los cuatro muestreos	46
Cuadro 3	Muestras analizadas en la Universidad de Guelph, Canadá	46
Cuadro 4 (ANEXO)	Análisis de varianza de los niveles porcentuales de infestación de <i>V. destructor</i> en abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento	47
Cuadro 5 (ANEXO)	Análisis de varianza para el número promedio de bastidores cubiertos con abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento	47
Cuadro 6 (ANEXO)	Análisis de varianza de la cuantificación relativa del VAD en abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento	47
Cuadro 7 (ANEXO)	Análisis de varianza de la cuantificación relativa del VAD en cría de abejas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	Ácaro hembra, adulto de <i>Varroa destructor</i>	49
Figura 2	Pupa infestada con el ácaro <i>Varroa destructor</i>	49
Figura 3	Abeja deforme, probablemente a causa del ácaro <i>Varroa destructor</i>	49
Figura 4	<i>Aethina tumida</i> , el pequeño escarabajo de la colmena	49
Figura 5	Identificación de una colmena con tratamiento	50
Figura 6	Aplicación de tiras con tau-fluvalinato en una colmena sometida a tratamiento	50
Figura 7	Espectrofotómetro <i>Nanovue GE Healthcare</i> indicando una concentración de ARN de 320.8ng/μl	50
Figura 8	Selección de las bandas tanto del ADNc (banda superior) como del gen de referencia (banda inferior) de 3 muestras positivas al VAD para el posterior conteo de píxeles utilizando el programa <i>Scion Image</i>	50
Figura 9	Medición de la carga viral relativa utilizando el programa <i>Scion Image</i> . El pico superior representa al VAD, mientras que el inferior al gen de referencia	51
Figura 10	Porcentaje de infestación de <i>V. destructor</i> en abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento	51
Figura 11	Número promedio de bastidores cubiertos con abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento	52
Figura 12	Cuantificación relativa promedio del VAD en abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento	52
Figura 13	Cuantificación relativa promedio del VAD en cría de abejas melíferas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento	53

RESUMEN

ALVARADO AVILA LAURA YAVARIK. Efecto de un tratamiento acaricida en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) sobre su población y en los niveles de infestación del ácaro *Varroa destructor* y del virus de las alas deformes. **Asesores:** PhD Guzmán Novoa Ernesto. MVZ Correa Benítez Adriana.

Los objetivos de este estudio fueron determinar el efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre los niveles de parasitismo de *Varroa destructor* y sobre la población de obreras de las colonias tratadas, así como determinar el efecto de reducir los niveles de varroosis sobre los niveles del virus de las alas deformes (VAD). Muestras de obreras y cría fueron obtenidas de 16 colonias a las que se midió el nivel de parasitosis con varroa y fueron seleccionadas aquellas con niveles de infestación mayores al 3%. De igual manera se determinaron la población y fortaleza de las colonias, para seleccionar ocho colonias como grupo testigo, mientras que a las ocho colonias restantes se les trató con Apistan® (tau-fluvalinato) por un periodo de seis semanas. Después de los tratamientos, las muestras de abejas se analizaron por RT-PCR para detectar la presencia del VAD. Las colonias tratadas tuvieron cuatro veces menos infestación de *V. destructor* que las no tratadas. Las colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato no difirieron en cuanto a su población de abejas adultas. Los niveles relativos de infección del VAD tanto en abejas adultas como en cría fueron significativamente menores en colonias tratadas que en colonias no tratadas, antes y hasta un mes después de terminados los tratamientos. Esto

pudo deberse en parte al tratamiento y en parte a que al momento de hacer los dos grupos de estudio desde el inicio el grupo a ser tratado tenía menor número de colonias infectadas con el VAD y por lo tanto, menores niveles del mismo. Por lo anterior no es claro si al controlar al ácaro, también se puede controlar al VAD. Estudios posteriores son necesarios para despejar esta duda.

Palabras clave: *Apis mellifera* L., *Varroa destructor*, Virus de las alas deformes (VAD), tratamiento, México

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La apicultura es una actividad pecuaria que se ha practicado en México desde antes de la llegada de los españoles principalmente por la cultura maya. Los mayas utilizaban un tipo diferente de abeja conocida comúnmente como “abeja sin aguijón” (abejas de la tribu Meliponini) sobre todo en la región de la Península de Yucatán.¹

La introducción de *Apis mellifera* a nuestro país se da a mediados del siglo XVIII, con excepción de la región de la Península de Yucatán, ya que los meliponicultores de dicha región se reusaban a trabajar con una abeja con aguijón. Hasta el siglo XIX la abeja melífera es introducida a la Península aunado a todo esto la expansión del uso de colmenas con bastidores móviles.¹

En nuestro país la apicultura es una actividad de suma importancia en términos biológicos, económicos y sociales.²

El 80% de las plantas que florecen están especializadas para ser polinizadas principalmente por insectos. La importancia biológica de la apicultura radica en que la mayoría de las aproximadamente 20,000 especies de abejas que existen son polinizadores eficaces y junto con otros insectos como moscas, avispas, escarabajos y mariposas, constituyen la mayor parte de las especies polinizadoras. La polinización es esencial para el mantenimiento general de la biodiversidad. Se estima que el valor económico total de la polinización a nivel mundial es de aproximadamente 153,000 millones de euros, lo que representa el 9.5% del valor de la producción agrícola utilizada para la alimentación humana en 2005.³ La polinización es considerada la actividad más valiosa de las abejas.²

Desde el punto de vista económico ésta actividad se ubica como la tercera fuente generadora de divisas dentro del subsector agropecuario.⁴ En el año 2010 las exportaciones de miel permitieron el ingreso de divisas de aproximadamente 85.6 millones de dólares.⁵ De enero a agosto del 2014 México exportó 33.1 mil toneladas de miel. En este mismo año las ventas de miel alcanzaron un valor superior a los 123 millones de dólares. En los últimos ocho años se han producido alrededor de 56 mil 500 toneladas de miel, por lo que México se ubica en el 5° lugar como productor a nivel mundial. Además, la miel mexicana es considerada de excelente calidad, por lo que los principales países importadores son Alemania, Estados Unidos y Bélgica.⁶ Aunado a todo esto, los apicultores también se dedican a la obtención y procesamiento de otros productos apícolas como polen, jalea real, propóleos y veneno.⁷

Desde el punto de vista social, existen alrededor de 43 mil apicultores distribuidos en todo el país y el inventario apícola es de 1.9 millones de colmenas. Los productos y subproductos apícolas son una fuente directa de ingresos y trabajo para los habitantes del medio rural. Tan solo el estado de Yucatán da ocupación a más de 11,000 productores, con más de 300, 000 colmenas.⁶

A pesar de todos los beneficios que la apicultura brinda a los ecosistemas y a la economía global, las abejas no están exentas de problemas, plagas y enfermedades, ya sean bacterianas, parasitarias, fungales o virales.² Una de las principales enfermedades por las que son afectadas es la varroosis.⁸

La varroosis es una parasitosis externa y contagiosa⁹ causada en *Apis mellifera*, por el ácaro *Varroa destructor* que afecta tanto a la cría como a las abejas adultas¹⁰ (Figura 1).

Este parásito es considerado el problema más grande que afecta a la apicultura a nivel mundial ya que se ha diseminado en un tiempo muy corto. Lo anterior no ha permitido que se desarrolle un equilibrio parásito-hospedero en el cual las abejas puedan defenderse exitosamente de esta enfermedad. Tampoco ha permitido que el apicultor tenga una experiencia significativamente larga para contrarrestar este parásito, por lo cual se necesita el empleo de medicamentos que aumentan los costos de producción para los apicultores. Una colonia que no sea tratada periódicamente se perderá en un lapso de dos a tres años después de iniciada la infestación.⁸

Actualmente varroa se encuentra diseminado por todo el territorio nacional causando pérdidas por mortandad de colonias de un 5 a 80%^{11, 12} así como diferencias en la producción de miel de hasta el 65% entre colonias infestadas y colonias tratadas contra el ácaro.¹³

Varroa ha sido asociado al llamado Síndrome de Colapso de las Colonias (CCD por sus siglas en inglés), aunque éste es considerado como un problema de origen multifactorial.⁹ En este síndrome se puede ver una pérdida significativa en la población de abejas adultas de una colonia sin ninguna razón aparente y en un periodo corto de tiempo.¹⁴ Este problema ha afectado principalmente a EUA, Canadá, España, Italia e Inglaterra.⁹ La relación entre *Varroa destructor* y el CCD ha sido fuertemente asociada a que se considera que varroa es vector de virus que afectan a las abejas, tales como el virus de Kashmir (VK), el virus de la

parálisis aguda (VPA), el virus de la parálisis aguda israelí (VPAI) y el virus de las alas deformes (VAD). Se considera que varroa puede causar inmunosupresión en pupas, lo cual favorece la infección. Además de la replicación de algunos virus, por ejemplo cuando en una colonia está presente el VAD no suelen presentarse signos clínicos aparentes, siempre y cuando la colonia se encuentre libre de varroa. En el caso de que la colonia esté infestada por el ácaro entonces se produce la muerte de las abejas.¹⁵ Diversos estudios han demostrado que la infestación con varroa afecta negativamente el periodo de vida de las abejas, pues se ha visto que las abejas que están infestadas con varroa y que además presentan signos de alas deformes tienen una vida más corta que la esperada.¹⁵ Los signos típicos que presenta una colonia que está a punto de perderse (las obreras dejan de atender a la reina, no hay comportamiento higiénico ni de acicalamiento, hay una rápida disminución de la población o cría muy salteada) se asocian directamente a la presencia de una infección viral en la colonia que probablemente fue consecuencia de una infestación previa con varroa.¹⁵

De manera individual varroa afecta a las abejas al alimentarse de su hemolinfa. Si esto sucede durante la etapa de cría se tiene como resultado abejas deformes y con un peso menor a las abejas adultas no afectadas (Figura 2). En las pecoreadoras provoca que tarden más en regresar a la colmena y el número de abejas que regresa es menor. De esta manera acorta significativamente la vida de las abejas.⁸

A nivel de la colonia, varroa provoca la disminución en la cantidad de zánganos y los que están presentes tienen menos posibilidades de aparearse. Uno de los

principales problemas es que en las etapas iniciales de la infestación no hay signos clínicos y éstos se hacen evidentes cuando la infestación está en una etapa media o avanzada. Cuando el problema es grande se pueden observar abejas deformes y que no pueden volar, el número de individuos en la colonia disminuye significativamente y se observa cría salteada⁸ (Figura 3).

1.2 *Varroa destructor* y sus efectos en la salud de las abejas

La transmisión y dispersión de varroa depende de factores biológicos y de manejo. Dentro de los biológicos se pueden encontrar factores de comportamiento como el pillaje (considerado el principal mecanismo de transmisión), la deriva, la enjambrazón, entre otros. Dentro de los factores de manejo se encuentran el intercambio de material biológico entre colonias parasitadas y colonias no parasitadas o la trashumancia de colonias parasitadas a apiarios con bajos niveles de infestación.⁹

Este ectoparásito afecta a las abejas adultas y se alimenta de su hemolinfa (fase forética), el estrecho contacto entre las abejas de la colonia permite la diseminación del ácaro hacia las abejas nodrizas, por medio de las cuales un ácaro hembra puede ingresar a una celda de cría 15 a 30 h antes, en caso de obreras, o 40 a 60 h antes, en caso de zánganos, de que sean operculadas (fase reproductiva).⁹ Esta hembra se alimenta de la hemolinfa de la prepupa e inicia la postura de huevo, el primer huevo será un macho. Cuando las abejas han terminado su periodo de metamorfosis y emergen como adultas lo hacen junto con las hembras fecundadas que se originaron dentro de la celda.⁹

Varroa es sumamente dependiente de su hospedador y no tiene una etapa en su ciclo de vida donde no dependa de él.⁸

Las hembras de varroa pasan por dos fases diferentes durante su ciclo de vida: una fase forética, la cual toma lugar sobre las abejas adultas y una fase reproductiva, la cual sucede dentro de las celdas con cría operculada. Los machos y todos los diferentes estados de ninfa tienen un periodo de vida corto y sólo pueden encontrarse dentro de las celdas de cría operculadas.⁸

La búsqueda del hospedador está regulada principalmente por una orientación química. Dos etapas del hospedero son de suma importancia para que la reproducción del ácaro sea exitosa: la abeja adulta y la larva que está a punto de ser operculada. Varroa es capaz de reconocer la edad y las diferentes funciones de las abejas, esto puede ser observado cuando, poco después de abandonar la celda en la abeja recién emergida, inician la búsqueda por abejas nodrizas. Se ha visto que el grupo de abejas con mayores niveles de infestación por el ácaro dentro de una colonia son las abejas nodrizas.⁸

El ácaro de varroa tiene preferencia por la cría de zángano, lo cual puede deberse a que el ácaro entra a la celda de cría de zángano entre 40 y 50 h antes de que la misma sea operculada (a diferencia de la cría de obrera, donde la varroa se introduce a la celda entre 15 y 30 h previa operculación), otro de los factores que pueden contribuir a un nivel de infestación mayor en zánganos que en obreras es el hecho de que las larvas de zánganos son visitadas más veces por las abejas nodrizas que las larvas de obrera, por lo que las probabilidades de contraer al parásito aumentan.⁸

En general, el comportamiento que las hembras de varroa siguen para encontrar a su huésped es activado por varios factores, siendo el más importante las señales químicas volátiles producidas tanto por la larva como por la abeja adulta huésped.⁸

Una vez dentro de la celda, varroa se desplaza al fondo de la misma hasta llegar al alimento larval, éste puede ser considerado como un comportamiento de adaptación al tratar de evadir a las abejas que limpian las celdas.⁸ Aproximadamente 5 h después de que la celda ha sido operculada, la larva consume todo el alimento, es entonces cuando varroa puede comenzar a alimentarse de hemolinfa. Pocas horas después de que se comienza a alimentar, la ovogénesis y la vitelogénesis comienzan y aproximadamente 70 h después de que la celda ha sido operculada el primer huevo es depositado, el cual es un huevo sin fecundar que da origen a un macho. Los demás huevos que son depositados con intervalos de aproximadamente 30 h, son fecundados y dan origen a hembras.⁸

El desarrollo del parásito, desde que el huevo es depositado hasta que se considera adulto, es de aproximadamente 5.8 días en el caso de hembras y 6.6 días para machos.⁸

La varroa madre lesiona la cutícula del 5° segmento de la larva, de esta manera permite que las ninfas puedan alimentarse de hemolinfa.⁸

La reproducción se realiza dentro de la celda operculada y el éxito de la reproducción del parásito depende del número de hembras que puedan aparearse exitosamente antes de salir de la celda.⁸

Al ser este un parásito que se alimenta de la hemolinfa tanto de las crías como de las abejas adultas, causa debilidad en estos insectos. Cuando varroa se alimenta de la hemolinfa de las prepupas y pupas perfora la cutícula de éstas y así puede inocular diferentes tipos de patógenos, ya sean virus, bacterias u hongos en la cría, siendo así vector de diseminación de enfermedades. Otra de las consecuencias de que se alimenten de hemolinfa es la disminución del contenido proteico de las abejas, causando una desnutrición, la cual hace que su sistema inmune se vea afectado, haciéndolas más susceptibles a otro tipo de patógenos.⁹

Varroa también causa que las abejas emerjan con un peso y un tamaño menor al normal o incluso deformes; la baja de peso depende directamente del número de hembras que se hayan alimentado de la pupa y de la reproducción del parásito, pero aunque la infestación en la celda haya sido con sólo una hembra, la pérdida de peso puede ser de hasta el 7%; se ha reportado que los zánganos pueden tener una pérdida de peso de entre 11 a 19%, esto afecta su capacidad de volar, lo que reduce las probabilidades de que pueda aparearse.⁸ Todo esto causa el acortamiento de su período de vida.⁹

Las abejas obreras que son infestadas durante la etapa de pupa inician la etapa de pecoreadoras antes que las que no son infestadas y presentan un periodo de vida más corto. Las pecoreadoras infestadas presentan un aumento en el tiempo que permanecen fuera de la colmena así como en el porcentaje de abejas que no regresan a la misma.⁸ El principal signo de una fuerte infestación con *V. destructor* es la presencia de alas deformes en abejas que acaban de emerger.¹⁶

Cuando el porcentaje de infestación de una colonia es moderado puede no haber signos clínicos evidentes; se llega a observar una disminución en la población de esa colonia. Pero conforme la población de abejas disminuye y la de varroa aumenta, los daños se van haciendo cada vez más significativos y evidentes hasta que se presentan signos como reemplazo de la reina, cría dispersa, abejas adultas incapaces de volar, se arrastran y hay una drástica disminución en la población de abejas adultas de la colonia. Sin embargo, el daño causado a la colonia no está sólo determinado por el número de ácaros que la infestan (ya que este puede ser muy variable) sino que también depende de otros factores como la fortaleza de la colonia (en cuanto a población de adultas y cría se refiere), la época del año y la presencia de virus.⁸

1.3 Virus de las abejas

Se han descubierto 18 virus del género *Apis*, la mayoría de los cuales se pueden presentar de forma habitual en las abejas sin observar signos aparentes de enfermedad, aunque algunos de ellos pueden llegar a causar signos evidentes de enfermedad, como es el caso del virus de las alas deformes (VAD) de la abeja melífera.¹⁷

El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular ha permitido saber que la infección con algunos de estos virus es muy común, por lo que se han considerado como inofensivos para las abejas por algunos autores.¹⁷

Algunos de los virus más importantes que afectan a las abejas causándoles problemas perceptibles, son los siguientes:

- **Virus de la parálisis crónica:** es un virus tipo ARN¹⁸ que tiene una distribución mundial;¹⁹ ha sido identificado dentro del territorio nacional²⁰ y puede ser detectado a lo largo de todo el año.¹⁹ Frecuentemente se presenta como una infección cerrada, por lo que no se presentan signos clínicos. Usando técnicas como PCR tiempo real, se ha identificado la presencia del virus en todas las etapas de metamorfosis (desde huevo hasta insecto adulto), así como en las tres castas, sin embargo, los signos clínicos sólo se presentan en adultas. En infecciones abiertas los signos que pueden observarse en abejas adultas infectadas son temblores de las alas y el cuerpo, abdomen abultado, abejas enfermas agrupadas frente a la piquera o arrastrándose en el suelo fuera de la colmena, también puede llegar a presentarse pérdida de vellosidades en el abdomen y en casos muy severos, pocos días después de la infección no pueden volar y mueren. Una infección severa puede resultar en la pérdida de la colonia y estos signos graves de enfermedad pueden aparecer en primavera y verano, cuando el desarrollo de la colonia está en su apogeo, además se ha observado que su manifestación es favorecida por climas calurosos y por colonias cuya reina es altamente consanguínea,⁹ a cambios en los manejos apícolas (como el hecho de que varios apiarios compartan la misma zona de floración) sin que haya ningún cambio aparente en la relación hospedero-patógeno o en la forma en la que este virus es transmitido.¹⁷ Se conocen dos tipos de transmisión para este virus: contacto directo entre abejas adultas, el cual sucede cuando abejas sanas y abejas infectadas se agrupan y la dispersión de partículas infecciosas por medio de las heces de abejas paralizadas, las cuales son ingeridas

por abejas adultas sanas.¹⁹ Se puede aislar principalmente de zonas con una alta concentración neuronal. Hay evidencia experimental que sugiere que el virus de la parálisis crónica y *Nosema ceranae* actúan en conjunto y causan la muerte de las abejas en experimentación. En un estudio reciente se observó una cantidad de hasta 10^4 partículas virales en ácaros de varroa.¹⁹

- **Virus de la parálisis aguda israelí:** este es un virus ARN perteneciente a la familia Dicistroviridae. Tiene una distribución mundial con una mayor frecuencia en Australia y en el Medio Este²¹ y ha sido encontrado en el territorio nacional.²² Este es un virus que está muy relacionado con los virus de parálisis aguda y el virus de Kashmir²¹ por lo que se supone que ha sido subdiagnosticado al confundirse con alguno de estos otros virus.¹⁷ Los tres pueden encontrarse de manera común como infecciones cerradas que no causan ningún signo clínico aparente, ya sea a nivel individual o de colonia. Sin embargo, bajo condiciones de laboratorio, resultan extremadamente virulentos cuando son suministrados a pupas o abejas adultas, causando la muerte de las mismas pocos días después.²¹ Bajo estas condiciones, la muerte de las abejas es precedida por signos clínicos como parálisis que va progresando rápidamente, temblores, incapacidad para volar, obscurecimiento y pérdida de vellosidades tanto en tórax como en abdomen. No obstante, es difícil observar la presentación de la parálisis a nivel de toda la colonia, a pesar que se tenga comprobado que dicha colonia haya muerto a causa de este virus. Una posible explicación para este fenómeno puede ser que la rápida evolución

de la parálisis a la muerte de la abeja impide la acumulación de suficientes abejas vivas con parálisis para ser notadas a nivel de la colonia. Cuando la parálisis se llega a notar en toda la colonia, usualmente es asociado al virus de la parálisis crónica. Se considera un indicador de mayor riesgo para el CCD.²¹ Este es otro virus que necesita que *V. destructor* sea su vector y que le permita replicarse para que pueda alcanzar títulos letales.¹⁷

- **Virus de la parálisis aguda:** pertenece a la familia Dicistroviridae, y al igual que los virus de Kashmir y parálisis aguda israelí, tiene un distribución mundial, encontrándose con frecuencia en Europa y América del Sur¹⁷ y se encuentra presente dentro del territorio nacional.²² Como se mencionó anteriormente, bajo condiciones de laboratorio la muerte de las abejas es precedida por signos clínicos como parálisis que va progresando rápidamente,²¹ tanto en el cuerpo como en las alas,¹⁷ temblores, incapacidad para volar, obscurecimiento y pérdida de vellosidades tanto en tórax como en abdomen²¹ y la muerte se presenta de uno a dos días después de la administración del virus;¹⁷ sin embargo, es difícil observar la presentación de la parálisis a nivel de toda la colonia, a pesar que se tenga comprobado que dicha colonia haya muerto a causa de este virus.²¹ Los problemas que este virus causa a las abejas aumentaron significativamente con la diseminación mundial de *V. destructor*, por lo tanto, ha aumentado su virulencia cuando se asocia con varroa¹⁷ ya que se ha visto esta asociación en la pérdida de colonias causada por varroa, principalmente en Europa entre 1980 y 1990.²¹ A

pesar de que se considera que varroa transmite este virus tanto a adultas como a pupas (con una eficacia de 50 a 80%), se cree que no hay replicación de dicho virus en el ácaro.²¹ Al igual que el virus de la parálisis crónica su transmisión es favorecida por épocas de calor y por reinas con alta consanguinidad⁹ y está dada por las secreciones de las glándulas salivales que las abejas adultas dan al alimento.²³

- **Virus de Kashmir:** se trata de un virus ARN de la familia Dicistroviridae que tiene una distribución mundial,²¹ con excepción del continente africano⁹ y se ha visto que se presenta con una mayor frecuencia en Norte América y Nueva Zelanda.²¹ No se cuenta con datos de la presencia de este virus en territorio nacional.^{21,24} En colonias con presencia de este virus se observa una baja drástica en la población de abejas adultas, lo cual puede dar como resultado que aparentemente haya enfermedad en la cría, pero se debe a la falta de abejas nodrizas.²¹ Se ha demostrado que el grado de patogenicidad y su virulencia depende de su forma de transmisión.¹⁷ Algo importante es que este virus ha sido detectado en la saliva de varroa,²¹ por lo que es considerado un vector del virus de Kashmir, que también se ha visto asociado en casos de nosemosis y loque europea.⁹ Por lo tanto, el control de estas enfermedades ayuda al control del virus mismo.⁹ Se ha observado su implicación en la pérdida de colonias a causa de dicho ácaro por lo que es considerado un marcador significativo en las colonias con signos de CCD.²¹

- **Virus de las celdas reales negras:** se trata de un virus ARN²⁵ perteneciente a la familia Dicistroviridae.²⁶ Este virus está presente dentro del territorio mexicano, de hecho, el primer reporte en nuestro país fue hecho recientemente (2013).²⁷ Recibe su nombre a causa de las áreas oscuras en las paredes de las celdas que contienen a las pupas infectadas.¹⁹ Es común en abejas adultas, afecta principalmente a prepupas y pupas de abejas reinas, sobre todo durante la primavera y el verano. Las obreras infectadas no presentan signos clínicos, pero transmiten el virus a las larvas de reina por medio de la jalea real.²⁷ La infección con este virus se da de manera frecuente en conjunto con infestaciones del microsporidio *Nosema* spp.,¹⁹ pero se ha ligado con mayor frecuencia específicamente a *Nosema apis* ^{28, 29} y se cree que puede estar relacionado con la mortalidad de adultas que presenten este parásito,²³ ya que este microsporidio es considerado la principal vía de transmisión del virus de las celdas reales negras.²⁶
- **Virus de la cría sacciforme:** este virus ARN pertenece a la Familia Iflaviridae³⁰ y se ha reportado presente dentro de la República Mexicana.²² La infección se presenta con mayor frecuencia durante la primavera cuando la población está creciendo rápidamente. Este es un virus que afecta a la cría y resulta en la muerte larval. La larva infectada no llega a convertirse en pupa y el líquido ecdisial, el cual está lleno de partículas virales, se acumula debajo de la cutícula, formando un saco que le da nombre a la enfermedad. La larva sufre un cambio de coloración de blanco

aperlado a un tono amarillento y poco después de la muerte la larva se seca, formando una “escama” obscura de color café. Este virus también puede llegar a afectar a las abejas adultas, aunque en ellas no se observan signos clínicos evidentes, pero puede acortar el periodo de vida de las adultas.³¹

1.4 Virus de las alas deformes (VAD) y sus efectos en la salud de las abejas

El VAD es un Iflavirus perteneciente a la familia Iflaviridae, que tiene forma icosaédrica y está compuesto por una hebra simple de ARN.^{17, 32} Fue identificado por primera vez en 1973, en abejas adultas de colonias ubicadas en Egipto, razón por la que en un principio se denominó virus egipcio de las abejas.³³ Posteriormente, en 1982, se aisló el virus en una muestra de abejas adultas deformes colectadas en Japón, comenzando así a asociarse estas deformidades con la presencia del virus;³⁴ en 1989 Ball relaciona los signos de deformidad en las abejas con un virus que había descubierto años antes, por lo que le denomina “virus de las alas deformes”.¹⁷ En 2012 Guzmán-Novoa *et al* hacen el primer reporte de la presencia de este virus en México.²²

Este virus es uno de los más importantes para la apicultura por el impacto que tiene, por ejemplo, en algunas partes de Europa y en algunas épocas del año, se puede encontrar que el 100% de las colonias están infectadas con VAD. El principal huésped de este virus es la abeja europea y se ha distribuido mundialmente gracias a su relación tan cercana con el ácaro *V. destructor*,

aunque también ha sido aislado de *Apis cerana*, *Apis florea* y algunas especies de abejorros. Recientemente se ha demostrado que el VAD es capaz de afectar al pequeño escarabajo de la colmena, *Aethina tumida*¹⁷ (Figura 4).

Las anomalías asociadas a la presencia de este virus en colonias de abejas melíferas son: malformación de apéndices (principalmente alas), disminución en el tamaño del abdomen o abultamiento del mismo, peso corporal y despigmentación; todo esto tiene como consecuencia disminución en la longevidad de la abeja adulta acortando su vida a menos de 67 h.^{34, 35} También se observa mortalidad de las pupas. Todos estos problemas son signos de las últimas etapas reportadas en el Síndrome del Colapso de las Colonias.³⁴

De manera reciente, se ha mostrado en nuestro país evidencia de una baja replicación viral tanto del VAD como del virus de celdas reales negras en abejas africanizadas, en comparación con abejas de origen europeo, lo cual sugiere que hay una mayor resistencia viral por parte de las abejas de origen africanizado a la replicación del virus.³⁶

El VAD puede ser transmitido de manera vertical por el ácaro *V. destructor*,¹⁷ y se debe considerar un punto clave en la biología y comportamiento de las abejas: de manera individual las abejas se reproducen gracias a una reina fértil que pondrá huevos fecundados (que dan origen a hembras) o sin fecundar (machos),³⁴ donde juega un papel importante la transmisión tanto de la reina como del zángano a su descendencia pero también debe tomarse en cuenta la reproducción de la colonia gracias a la enjambrazón.^{17, 34} Esta forma de transmisión no provoca ningún signo clínico ni ningún tipo de impacto negativo en la colonia.³⁴

La transmisión horizontal se da principalmente a través de las abejas nodrizas hacia las larvas por medio de la alimentación,¹⁷ dando también infecciones cerradas.³⁴

La presencia del VAD con ausencia de signos clínicos de enfermedad ha sido demostrada para todas las etapas de metamorfosis en las tres castas así como en secreciones glandulares utilizadas para alimentar a las larvas y a la reina, lo cual sucede de manera aislada, es decir sin la presencia de varroa; ésta condición es conocida como una infección cerrada y consiste en la ausencia de signos clínicos de la enfermedad en presencia de partículas virales.³⁴ Además, se cree que dicha infección es persistente, esto se refiere a que existe una producción baja pero constante de partículas virales dentro de la célula infectada.³⁴ Dicha persistencia del virus va más allá del tiempo de vida del individuo afectado, lo cual puede ser atribuido a la transmisión vertical y la presencia de virus viables que pueden causar una infección abierta en un momento determinado.³⁴

Se considera que puede llegar a haber un cierto balance entre el hospedador y el virus aun cuando éste se esté replicando persistentemente, ya que no llega a destruir la célula infectada y, en caso de que sí se produzca la muerte celular, ésta es compensada por la producción de nuevas células, por lo tanto, no hay una pérdida celular significativa. Sin embargo, sí causa enfermedad y sí altera la homeostasis del individuo, por lo que su condición se ve desmejorada.³⁴

Se han reportado casos en Inglaterra y Sudáfrica, donde aún en la ausencia de una infestación con *Varroa destructor* el VAD ha causado problemas serios como la muerte de reinas y de colonias sin signos clínicos de enfermedad (lo único

perceptible fue la muerte).³⁴ Por otro lado, Dainat y colaboradores encontraron que *Varroa destructor* y el virus de las alas deformes reducen el tiempo de vida de las abejas durante el invierno por lo que puede ser un mecanismo por el cual se pierdan las colonias.³⁷

1.5. Interacción entre Varroa y el Virus de las Alas Deformes (VAD)

Estudios epidemiológicos demuestran que el VAD es el virus con mayor prevalencia dentro de las colonias infestadas con ácaros sin importar si las colonias son fuertes, débiles o incluso a punto de colapsar.³⁴

La forma de transmisión más estudiada de este virus ha sido la vectorial, por medio de varroa, en donde el ácaro se infecta al alimentarse de pupas o abejas adultas infectadas (fase forética).¹⁷

Algunos investigadores han hecho estudios para conocer la relación entre el VAD y *V. destructor* y la importancia del papel que éste juega en la replicación del virus. Se ha visto que *V. destructor* causa inmunosupresión a las abejas, lo cual permite la replicación del virus; también se ha encontrado una correlación positiva entre el nivel de infestación en las pupas con la probabilidad de que las abejas presenten alas deformes cuando emerjan, pero no sólo esto, sino también con la severidad en la deformidad de las alas.¹⁷

Esta inmunosupresión en pupas parasitadas puede llegar a activar la infección cerrada y presentar los signos clínicos de la enfermedad (infección abierta).³⁴

Las infecciones de tipo abiertas se presentan cuando la replicación y transmisión del VAD se da principalmente por parte de varroa, aunque recientemente se ha demostrado que el ectoparásito *Tropilaelaps mercedesae* (que también afecta a *Apis mellifera*) transmite el VAD a pupas y resulta en infecciones abiertas, lo cual sugiere que es la ruta de transmisión y no la especie del ácaro lo que determina el resultado de la infección.³⁴ La mayoría de las veces las infecciones abiertas son infecciones agudas, ya que se produce un alto nivel de partículas virales en un periodo corto de tiempo y se manifiestan signos evidentes de la enfermedad.³⁴ Bajo ciertas circunstancias la transmisión del VAD por parte de un vector puede dar como resultado infecciones abiertas crónicas que pasan desapercibidas en condiciones naturales y sólo se vuelven notorias cuando el mal rendimiento de las pecoreadoras infectadas afecta la producción de la colonia.³⁴

En las infecciones abiertas las abejas adultas que emergen con deformidades, así como la pérdida prematura de las abejas obreras y la cantidad de energía invertida en criarlas, junto con la notoria deficiencia en el aprendizaje causada por la transmisión vectorial, tienen como resultado un impacto negativo en la colonia cuando se producen demasiadas abejas no viables.³⁴

Un estudio demostró que hay niveles menores de transcripción de genes que codifican para péptidos antimicrobianos en pupas con niveles bajos de infestación; en las pupas con altas infestaciones se encontró menor número de estos péptidos.³⁴

Sin embargo, aun cuando se tenga una colonia altamente infestada con *V. destructor* y que el 100% de estos ácaros sean transmisores del VAD, la mayoría de las abejas que fueron infectadas en la etapa de pupa, emergen sin ningún

tipo de deformidad,¹⁷ por lo que la transmisión del VAD hacia las pupas es necesaria más no suficiente para que se presenten las alas deformes;³⁴ esto ha dado pie a que se realicen estudios donde se ha demostrado que *V. destructor* no es sólo un vector mecánico, sino también funciona como vector biológico del virus al permitir la replicación del mismo antes de transmitirlo, en estos estudios se ha visto que las infecciones con VAD en donde las abejas muestran signos clínicos evidentes están relacionados con infestaciones con varroa en donde el virus se replicó, por lo que el ácaro tiene altos títulos virales; mientras que las infecciones con VAD donde las abejas no muestran signos clínicos evidentes se relacionan con infestaciones de ácaros donde el virus no se replicó y sus títulos virales son significativamente menores.¹⁷ Esto sugiere que la replicación del VAD en los ácaros puede resultar en títulos virales superiores a cierto umbral, esto seguido de la transmisión por parte del vector la cual es necesaria y suficiente para que las abejas infectadas emerjan con signos de deformidad en las alas.³⁴

Los virus con menor virulencia, como es el caso del VAD, son mayormente asociados (en conjunto con varroa) al Síndrome del Colapso de las Colonias, ya que los virus más virulentos matan a la pupa, y por lo tanto, al ácaro antes de que éste pueda completar su ciclo reproductivo.³⁴

1.6. Efecto de acaricidas sobre el virus de alas deformes (VAD)

Hay pocos estudios que se refieren al efecto que tienen ciertos acaricidas sobre el VAD, uno de los cuales fue realizado por Locke, *et al.*¹⁵

Recientemente se ha demostrado que hay pesticidas que son un factor de estrés extra para las abejas y que pueden influir en su susceptibilidad hacia las infecciones con diferentes patógenos,¹⁵ este estudio fue realizado en Uppsala, Suecia (2008). Se escogieron nueve colonias con características similares en cuanto a proporciones de abejas adultas, cría, miel, polen e infestación con el ácaro *Varroa destructor*. Tres de estas colonias sirvieron de grupo testigo, es decir no se les aplicó ningún tipo de tratamiento; a las otras seis colonias se les aplicó un tratamiento acaricida con Apistan®¹. Se tomaron cuatro tipos de muestras: pupas infestadas, pupas sin infestar, abejas adultas y ácaros.¹⁵

Se trabajó principalmente con VAD, virus de las celdas reales negras y virus de la cría ensacada.¹⁵

El porcentaje de infestación con el ácaro, en un inicio, fue más grande en el grupo tratado que en el grupo no tratado, tanto en la cría como en las abejas adultas. El tratamiento acaricida redujo el porcentaje de infestación de manera significativa aunque no lo eliminó por completo. La población tanto de abejas adultas como de cría de las colonias testigo se redujo a casi la mitad de la población inicial. Los signos clínicos para VAD fueron observados con cada vez más frecuencia en las colonias sin tratamiento, mientras que en las colonias tratadas esa frecuencia iba disminuyendo. Todas las colonias sin tratamiento murieron antes o durante el invierno.¹⁵

¹**APISTAN NOVARTIS SALUD ANIMAL S.A de C.V.** Tiras de plástico impregnadas con 10 g de tau-fluvalinato, utilizadas para el control de la parasitosis externa de las abejas y varroa. Se recomienda dejar el tratamiento por un periodo no menor a 6 semanas y no superior a 8 semanas. (<http://www.medicamentos.com.mx/DocHTM/26210.htm>)

Inicialmente se observó un aumento de los títulos del VAD en las colonias tratadas en las pupas y abejas adultas tanto infestadas como no infestadas, esto no se observó en las colonias no tratadas. El efecto más notorio del acaricida fue la reducción en los títulos del VAD en las muestras de ácaros de las colonias tratadas alrededor de la 4ª o 5ª semana de tratamiento.¹⁵

En cuanto a los virus de celdas reales negras y cría ensacada se observó que los títulos virales fueron más altos en las abejas de las colonias tratadas que en las que no tuvieron tratamiento; también se observó que las fluctuaciones de los títulos virales, en los diferentes tipos de muestras parece ser que son azarosos en lugar de progresivos. Respecto a estos virus no se observaron diferencias entre la cría infestada y la no infestada. Tampoco se encontró una relación de títulos virales entre la cría infestada y sus ácaros, lo que sugiere que la cría, ya sea infestada o no infestada, no es afectada por la infestación con varroa.¹⁵

Por otro lado, los títulos virales del VAD entre la cría infestada y sus ácaros están altamente relacionados.¹⁵ En este estudio se observó un incremento significativo en los títulos virales del VAD cuando se inició el tratamiento con el tau-fluvalinato en las abejas adultas y en la cría tanto infestada como no infestada. Posteriormente hubo una ligera y progresiva reducción en los títulos virales de las colonias con tratamiento. Las abejas y la cría sin infestar nunca tuvieron títulos virales más bajos que las colonias sin tratamiento durante el periodo de tratamiento. Fue sólo hasta la cuarta semana de tratamiento que títulos de las pupas infestadas alcanzaron un nivel por debajo de aquellas sin tratamiento. Esto demuestra los cambios que se ven a corto plazo en los títulos virales durante el tratamiento acaricida.¹⁵

El incremento en los títulos virales al inicio del tratamiento puede ser atribuido a que esta es la etapa en que el Apistan tiene el mayor efecto químico, lo que pudiera traer como consecuencia un debilitamiento en el sistema inmune de las abejas, haciéndolas más susceptibles a la infección por VAD. El decremento posterior en los títulos puede deberse a la disminución del ácaro, así como a una posible adaptación por parte del sistema inmune de las abejas a la presencia del acaricida. Ha sido demostrado que el tau-fluvalinato interfiere con los canales de sodio de las células, los cuales son un blanco para los virus, ya que muchas veces estos interfieren con la presión osmótica para reventar a la célula y liberar nuevas partículas virales.¹⁵ Algunos ácaros de varroa son hospederos del VAD y aunado al tratamiento acaricida puede ser que suceda lo mismo y el tratamiento también interfiere en los canales de sodio de varroa, por lo que los ácaros que sobreviven son aquellos que tienen bajos títulos virales y en los cuales no sucede la replicación.¹⁵

Otra de las observaciones inesperadas de este estudio fue que los títulos virales de las colonias tratadas siguieron siendo altas aún después de la remoción de ácaros, lo mismo sucedió con las pupas no infestadas, las cuales tuvieron altos títulos virales durante todo el estudio a pesar de no haber tenido ningún contacto con varroa; esto sugiere que el VAD puede mantenerse en la colonia por algún tiempo incluso después de haber eliminado al ácaro, esto se puede deber a otras vías de transmisión como la vertical o la oral. Esta reducción en el número de abejas deformes de las colonias tratadas puede deberse a que durante el tratamiento acaricida la población de adultas se deriva, cada vez con mayor frecuencia, de pupas sin infestar, lo cual no siempre quiere decir que los títulos virales en la colonia hayan bajado.¹⁵

El hecho de que los signos clínicos de esta enfermedad hayan desaparecido paulatinamente de las abejas de las colonias tratadas y que en las abejas sin tratamiento hayan aumentado aun cuando los títulos virales entre ambas muestras no variaron significativamente, puede ser indicio de las circunstancias particulares que se necesitan para que se presente la deformidad en las abejas; por lo tanto no son sólo los títulos los que dan deformidad, también juega un papel sumamente importante el momento y el modo en que es transmitido el virus, es decir, la deformidad aparece cuando el VAD es transmitido por varroa durante la etapa de pupa, ya que la transmisión por varroa en adultas también resulta en títulos virales altos, pero no en deformidad.¹⁵

1.7 JUSTIFICACIÓN

Al no haber medicamentos antivirales disponibles para el sector apícola y dado que recientemente se ha generado evidencia que muestra que el virus de las alas deformes (VAD) puede causar daños serios a las colonias de abejas, es importante encontrar alternativas para mantener bajos los niveles de infección del VAD en las colonias de abejas. En este sentido y dado que varroa es un importante vector del virus, es razonable asumir que si se controla al ácaro, indirectamente se controlarían los virus que transmite, incluido el VAD. Por ello, probar esta hipótesis es relevante. Sin embargo, existen pocos estudios que la han intentado probar, pero éstos fueron realizados bajo condiciones ecológicas y climáticas muy diferentes a las del altiplano mexicano y además se realizaron con abejas europeas y no africanizadas como con las que trabaja el apicultor mexicano. Se sabe que el clima y la raza de abejas tienen efecto sobre los

niveles de parasitismo de varroa en las abejas. Por otro lado, se ha observado que los acaricidas pueden tener algún efecto sobre la población de abejas adultas. Por estas razones, se propuso probar el efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre las dinámicas de la infestación de varroa y la relación de ésta con la carga viral del VAD, para determinar si al controlar varroa se controla también, de manera indirecta, la infección por virus. Asimismo se propuso probar el efecto que tiene el acaricida en la población de abejas adultas de las colonias con tratamiento. Todo esto realizado bajo las condiciones tanto climáticas como de manejo del altiplano mexicano.

2. HIPÓTESIS

El acaricida tau-fluvalinato reduce significativamente los niveles de parasitismo de *Varroa destructor* y del virus de las alas deformes e incrementa la población de colonias de abejas melíferas en el altiplano mexicano.

3. OBJETIVOS

3.1. Determinar el efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre los niveles de parasitismo de *Varroa destructor* en colonias de abejas melíferas.

3.2. Determinar el efecto de reducir los niveles de varroosis sobre los niveles de parasitismo del virus de las alas deformes en abejas melíferas.

3.3. Determinar el efecto de tratar colonias de abejas melíferas con el acaricida tau-fluvalinato sobre su población de obreras.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Las muestras fueron obtenidas de diferentes apiarios separados entre sí por una distancia aproximada de 3 km ubicados en la delegación Milpa Alta en la Ciudad de México. Este lugar está ubicado al sur de la misma, con temperaturas de 8 – 14 °C y la altitud entre 3250 a 3700 metros sobre el nivel del mar.³⁸

La preparación de las muestras fue realizada en el Laboratorio de diagnóstico perteneciente al Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos (DMZ de ACyOA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), ubicado en Ciudad Universitaria (CU) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en la ciudad de México.

El procesamiento de las muestras (extracción de ARN, producción de ADN complementario y amplificación por PCR) se realizó en el Laboratorio de Investigaciones en Abejas, ubicado en el edificio *Edmund C. Bovey* de la Universidad de Guelph en la provincia de Ontario, Canadá.

4.2 Selección de colonias experimentales

Se seleccionaron 16 colonias con niveles de infestación de varroa mayores al 3% y de cada una de ellas se midió la fortaleza de la colonia, cuidando que todas las colonias tuvieran una fortaleza similar, para de esta manera hacer dos grupos de estudio: un grupo de ocho colonias que fue el grupo testigo al que no se le proporcionó ningún tratamiento, mientras que al grupo de las ocho colonias

restantes se les trató con Apistan® (tau-fluvalinato) por un periodo de seis semanas.

Estas colonias fueron identificadas con las siglas **Tx** para las colonias con tratamiento y **STx** para las colonias sin tratamiento, además se les dio un número de identificación para diferenciarlas unas de otras. De esta manera se contó con 8 colonias con tratamiento (Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5, Tx6, Tx7 y Tx8) y 8 colonias del grupo testigo (Stx1, Stx2, Stx3, Stx4, Stx5, Stx6, Stx7 y Stx8) (Figura 5).

4.3 Determinación de la población de abejas

La determinación de población de abejas y fortaleza de las colonias se realizó en cada uno de los cuatro muestreos (Cuadro 1). La determinación inicial se hizo para poder hacer los dos grupos de estudio y que éstos tuvieran características y condiciones similares. Esto se hizo al revisar la colmena, cuando se abrió, en la cámara de cría se utilizó muy poco humo para impedir que las abejas adultas se alejaran. De esta manera se pudo contar el número de bastidores que se encontraron cubiertos de abejas adultas. En caso de que sólo una cara del bastidor tuviera abejas, este se contó como medio bastidor.³⁹

Este procedimiento se realizó en los cuatro muestreos para poder comparar cómo fue variando la fortaleza de cada colonia antes y después de la aplicación del tratamiento.

4.4 Determinación de niveles de varroosis

Se determinó el nivel de infestación de varroa en abejas adultas de cada colonia en cada uno de los cuatro muestreos usando el método De Jong⁴⁰ (Cuadro 2).

Para este procedimiento se tomaron muestras de abejas adultas (aproximadamente 200) en un frasco de plástico de boca ancha que contenía alcohol al 70%. Para realizarlo se sacaron varios bastidores de cámara de cría y se eligió el que mayor número de abejas adultas tenía, se revisó que no estuviera la reina en ese bastidor y se deslizó la boca del frasco de plástico sobre las abejas, tocándolas ligeramente y sin tener contacto con la cera, este movimiento se realiza de arriba hacia abajo y de esta manera las abejas caen dentro del frasco con alcohol.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Se agitó la muestra dentro del frasco de plástico por un minuto. Esto con el fin de que se desprendiera el mayor número de varroas posibles.
2. La muestra, junto con el alcohol, se transfirió a un embudo de PET, verificando que la tapa estuviera cerrada. A este embudo se le colocó un fondo con alambre de malla con aberturas de 4 mm en donde se colocaron las abejas y se le agregó el alcohol al 70% necesario para cubrir por completo la muestra.
3. La muestra se agitó de manera circular, con la ayuda de una varilla de vidrio, por un minuto.
4. Debajo del embudo se colocó una tela de algodón, de donde se obtuvieron las varroas en las muestras positivas.

5. Se abrió la tapa lentamente, de manera que el contenido cayera sobre la tela de algodón (la malla de 4 mm impidió que las abejas cayeran a la tela).
6. Se contó el número de varroas en la tela de algodón o que quedaron en la tapa.
7. En los casos donde la muestra fue positiva se contaron todas las abejas de la muestra y se dividió el número de varroas entre el número de abejas y después se multiplicó por 100, ya que se estaba sacando un porcentaje.⁴¹

4.5 Tratamiento con tau-fluvalinato

El acaricida comercial utilizado fue el Apistan® que consiste en tiras de plástico con tau-fluvalinato, un potente pesticida piretroide, no volátil, con 98% a 100% de eficacia contra el ácaro varroa, excepto cuando hay resistencia por parte del ácaro¹⁵ (Figura 6).

Este tratamiento se administró el 09 de septiembre del 2013 a ocho colonias diferentes (Tx1-Tx8) y se dejó ininterrumpido durante seis semanas, se retiró el 21 de octubre del 2013.

4.6 Muestreos de abejas adultas y cría

Se realizaron cuatro muestreos en total: uno antes de iniciar el tratamiento (07 de septiembre del 2013), el segundo se realizó justo cuando se retiró el tratamiento (21 de octubre del 2013), el tercero fue dos semanas posteriores al

retiro del tratamiento (04 de noviembre del 2013) y el último un mes después del retiro del tratamiento (20 de noviembre del 2013).

Para el muestreo de abejas adultas para la determinación de los niveles de varroosis se siguieron las indicaciones de De Jong *et al.*⁴⁰

Para el muestreo de abejas adultas destinadas al diagnóstico del VAD se utilizaron tubos Falcon de 50 mL a los cuales se les hicieron pequeños orificios en la tapa para que las abejas pudieran respirar; el procedimiento fue el mismo para la recolección de abejas para el diagnóstico de varroosis (se deslizó el tubo sobre las abejas, de arriba a abajo para que las abejas cayeran dentro del tubo) sólo que en esta ocasión no se utilizó alcohol, ya que se requería que las abejas estuvieran vivas. Cada tubo se identificó con la fecha y el número de la colonia para su posterior procesamiento. Se colectaron un aproximado de 30 abejas obreras adultas por frasco, por colonia, por cada muestreo realizado. Estos tubos fueron colocados en una bolsa con refrigerante, de esta manera las abejas bajaron su metabolismo y permanecieron con vida hasta llegar al Laboratorio del DMZ de ACyOA en la FMVZ-UNAM.

El muestreo de cría se realizó al escoger un bastidor de cámara de cría que tuviera la mayor cantidad de cría operculada posible. Se cortó un cuadro de panal con cría cerrada de aproximadamente 10 X 10 cm, se colocó sobre una hoja de papel bond con su correspondiente identificación y se envolvió en una franela para conservarlo caliente, cada uno de estos trozos de panal fueron introducidos en una hielera de unicel para que conservaran la temperatura y la cría sobreviviera el tiempo necesario para llegar a la FMVZ-UNAM.

Las abejas, tanto crías como adultas, se transportaron al Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de Guelph, Canadá en tubos de centrifuga de 1.5 mL con 1.5 mL de RNALater^{®2} para su conservación. Cada tubo contenía tres abejas adultas o tres pupas que se puncionaron para que el RNALater[®] penetrara a los tejidos y así se facilitó la conservación del ácido nucleico. Cada tubo se identificó, por dentro y por fuera, con una etiqueta que indicaba el nombre del apiario, número de colonia, fecha de muestreo y contenido del mismo. En total se transportaron 1,280 tubos, divididos en 10 tubos de cría y 10 tubos de adultas por colonia por muestreo (Cuadro 3).

4.7 Diagnóstico y cuantificación del VAD

Esto fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones en Abejas de la Universidad de Guelph en Ontario, Canadá. Para esto se realizó la extracción de ARN, la síntesis de ADN complementario (ADNc), la amplificación de un fragmento del ADNc mediante la Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y la semicuantificación relativa de ARN viral.

4.7.1 Extracción de ARN

Para la extracción se homogeneizaron tres abejas adultas o tres pupas (dependiendo de la muestra) con la ayuda de mortero, pistilo y nitrógeno líquido,

² **RNALater[®] Solution.** RNA *Stabilization Solution* 500mL. Solución utilizada para estabilizar y proteger el ARN celular.

todos los materiales usados para la homogenización fueron lavados y esterilizados antes de ser utilizados. A este homogeneizado se le agregaron 800 μ l de una mezcla de Fenol, Cloroformo y Alcohol Isoamílico (proporción 25:24:1) y 800 μ l de *buffer* de extracción y se centrifugó a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos. Al sobrenadante se le agregó la misma cantidad de una mezcla de Cloroformo, Alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13,000 rpm (aproximadamente 16,600 g) durante 5 minutos. Al sobrenadante, resultado de esta centrifugación, se le agregó $\frac{1}{4}$ de su volumen de Cloruro de litio (LiCl) para precipitar el ARN a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, se centrifugaron los microtubos a 13,000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet de ARN, el cual se lavó con 500 μ l de etanol al 70%, se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 minutos, se desechó el sobrenadante y se secó el pellet de ARN durante aproximadamente 30 minutos en una campana de flujo laminar. Posteriormente se le agregaron 25 μ l de agua tratada con dietilpolicarbonato. Se incubaron las muestras en baño maría por 3 minutos a 60 °C y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 segundos. La cantidad total de ARN extractado fue determinado con un espectrofotómetro (*Nanovue GE Healthcare; Cambridge, UK*)³⁵ (Figura 7). El ARN se conservó en un congelador a -20 °C.

4.7.2 Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2 μ g del ARN extractado previamente (sólo las muestras de las que se obtuvieron concentraciones de ARN mayores a 190 ng/ μ l). Esta cantidad de ARN fue retrotranscrito usando Oligo (dT)₁₈ y M-MuLV

RT con el RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (*Fermentas Life Sciences*; Burlington, Ontario), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.7.3 RT-PCR

El VAD fue detectado usando el *primer* de ida por Chen *et al* (2005) y un *primer* de reversa diseñado por Guzmán-Novoa *et al* (2012), así como un gen de referencia propio de la abeja (RPS5) que se utilizó en todas las reacciones de RT-PCR como un control con el cual, posteriormente, se realizó la cuantificación relativa del virus.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas con un termociclador (*Mastercycler, Eppendorf, Mississauga, Ontario*). Cada 15 µl de reacción contenía 1.5 µl de 10x PCR buffer (*New England BioLabs; Pickering, Ontario*) 0.5 µl 10 mM de dNTPs (*Bio Basic Inc.; Markham, Ontario*), 1 µl de 10 µM de los *primers* tanto de ida como de reversa, 0.2 µl 5 U/µl de la enzima Taq polimerasa (*New England BioLabs; Pickering, Ontario*), 1 µl de ADNc elaborado previamente y 7.8 µl de agua estéril desionizada.

El termociclador fue programado para correr a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 60 seg a 55 °C y 60 seg a 72 °C y un paso final de extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.1% y fue coloreado con bromuro de etidio. Las bandas amplificadas tanto del gen de referencia como del ADNc viral fueron capturadas en imágenes fotográficas usando una cámara digital con un Transiluminador UV *Benchtop (BioDoc-ItM Imaging System; Upland, CA, USA)*.

4.7.4 Cuantificación relativa de la carga viral

Para la cuantificación de la carga viral, se empleó un método de cuantificación relativa, en donde se utilizó el programa *Scion Image* para la cuantificación de píxeles en las imágenes capturadas de las muestras que resultaron positivas al virus de las alas deformes (VAD)⁴². Este es un programa utilizado para analizar y procesar imágenes, puede usarse para medir áreas, promedios, perímetros, entre otros.

Las imágenes fotográficas de las bandas amplificadas del gen de referencia y del ADNc viral se guardaron en la computadora en la modalidad de mapa de bits (bmp), después se abrieron dichas imágenes en el programa *Scion Image* y se procedió a seleccionar el área de las bandas (tanto la banda del VAD como la banda del gen de referencia) de cada una de las muestras amplificadas (Figura 8). El programa automáticamente crea dos parábolas de cada muestra (una correspondiente a la banda del ADNc y la otra a la banda del gen de referencia), las cuales se delimitan y se le indica al programa que realice las mediciones de ambas bandas. (Figura 9) Estas mediciones se copian al programa de Excel y la cuantificación relativa de la carga viral se obtiene de dividir los resultados del conteo de píxeles de la banda del ADNc entre los resultados del conteo de píxeles del gen de referencia.

4.8 Análisis estadístico

Utilizando el programa *R* (R development Core Team 2012) se realizó un análisis de varianza a los datos obtenidos de los niveles porcentuales de infestación de

V. destructor en abejas adultas de todas las colonias, los cuales se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada antes de ser analizados; al número promedio de bastidores cubiertos con abejas adultas de todas las colonias y a la cuantificación relativa del VAD en abejas adultas y cría de todas las colonias, tanto tratadas como no tratadas con el acaricida, los cuales fueron transformados a logaritmos antes de ser analizados.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre los niveles de parasitismo de *V. destructor*

El acaricida tau-fluvalinato redujo significativamente los niveles de infestación del ácaro *V. destructor* de las colonias tratadas en relación a las no tratadas ($P < 0.001$). A las seis semanas y al final del tratamiento, las colonias tratadas tenían cuatro veces menos infestación de *V. destructor* que las no tratadas y la diferencia en niveles de infestación se mantuvo significativa entre los dos grupos de colonias, por lo menos hasta el último muestreo, el cual ocurrió un mes después de terminados los tratamientos. No hubo efectos de interacción entre tratamiento y periodo de muestreo ($P > 0.05$) (Cuadro 4, Figura 10).

5.2 Efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre la población de abejas adultas

Las colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato no difirieron en cuanto a su población de abejas adultas, ni antes ni hasta un mes después de concluidos los tratamientos ($P>0.05$). Tampoco hubo efectos de interacción entre tratamiento y periodo de muestreo ($P>0.05$) (Cuadro 5, Figura 11).

5.3 Efecto de la reducción de varroosis sobre los niveles del virus de las alas deformes en abejas (VAD)

Los niveles relativos de infección del VAD en abejas adultas fueron significativamente menores en colonias tratadas con el acaricida tau-fluvalinato que en colonias no tratadas, antes y hasta un mes después de terminados los tratamientos ($P<0.001$). No hubo efectos de interacción entre tratamiento y periodo de muestreo ($P>0.05$) (Cuadro 6, Figura12).

Los niveles relativos de infección del VAD en la cría fueron significativamente menores en colonias tratadas con el acaricida tau-fluvalinato que en colonias no tratadas, antes y hasta un mes después de terminados los tratamientos ($P<0.05$). No hubo efectos de interacción entre tratamiento y periodo de muestreo ($P>0.05$) (Cuadro 7, Figura 13).

6. DISCUSIÓN

6.1 Efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre los niveles de parasitismo de *V. destructor*

En este estudio, el uso del tratamiento con tau-fluvalinato durante seis semanas redujo hasta cuatro veces la infestación por varroa al comparar las colonias tratadas con las no tratadas. Esto coincide con el estudio realizado por Locke *et al*, donde el acaricida (tau-fluvalinato) redujo significativamente el porcentaje de infestación por el ácaro, tanto en cría como en abejas adultas, pero no eliminó por completo su presencia.¹⁵ En este estudio, al final del tratamiento y hasta un mes después del mismo se detectó cero por ciento de infestación en cinco de las ocho colonias que se sometieron al tratamiento con tau-fluvalinato; de las tres colonias restantes, dos de ellas tuvieron bajos porcentajes de infestación (1.84 y 0.96) y una tuvo un alto porcentaje de infestación (7.5). En base a esto, se puede concluir que el tratamiento es una manera efectiva de controlar (ya que no siempre se obtiene un 0% de infestación después del tratamiento) la infestación por varroa y de esta manera reducir los efectos negativos que tiene el ácaro tanto en población de abejas como en producción de miel, entre otros.

6.2 Efecto de la reducción de varroosis sobre los niveles del virus de las alas deformes en abejas

Al inicio de este estudio, se consideró que el tratamiento con tau-fluvalinato reduciría significativamente los niveles de parasitismo por varroa en las colonias tratadas, asimismo, reduciría indirectamente y de manera significativa los niveles

del virus de las alas deformes (VAD) en abejas. Di Prisco *et al* realizaron un estudio en 2011 en donde comprobaron la relación existente entre los niveles de parasitismo de *Varroa destructor* con la infección por VAD. Como resultados obtuvieron que los niveles de virus de alas deformes eran significativamente mayores en colonias que habían sido expuestas a una infestación por varroa, además observaron que en colonias débiles los títulos del VAD fueron aumentando de manera constante hasta alcanzar su punto máximo siete días después de aplicado el tratamiento; mientras que en las colonias fuertes expuestas a varroa hubo un aumento inicial en los títulos del VAD, que fueron disminuyendo después del tratamiento.⁴³

Gregorc *et al* (2012) encontraron que tanto el VAD como el Virus de la Parálisis Aguda Israelí se encontraban en niveles elevados en abejas y larvas que fueron expuestas a varroa. Además de que en larvas expuestas al ácaro se encontraron altos niveles de VAD, en comparación con las larvas que no fueron expuestas al ectoparásito; de estas larvas, 89% de las que fueron expuestas a varroa tenían niveles detectables del VAD, mientras que sólo el 38% de las no expuestas al ácaro tenían niveles detectables del virus.⁴⁴

Estos resultados eran de esperarse, ya que varroa es un vector conocido del VAD y puede causar estrés y reducir la respuesta inmune de las larvas.⁴⁴

En el estudio realizado por Locke *et al* (2012) el efecto más importante del tratamiento con el acaricida tau-fluvalinato se observó en los títulos virales de abejas adultas para el VAD, pupa infestada para el Virus de las Celdas Reales Negras y en pupa infestada y no infestada para Virus de la Cría Ensacada. Sin

embargo, los títulos virales del VAD fueron los únicos afectados por el porcentaje de infestación con varroa.¹⁵

En el estudio realizado por Martin *et al* (2010), se logró observar que una vez que los ácaros fueron removidos por el acaricida no fue posible detectar VAD en cría operculada conforme los ácaros iban siendo eliminados de las colonias a tratar.⁴⁵

En el presente trabajo, los niveles relativos de infección del VAD en abejas fueron significativamente menores en las colonias tratadas que en las colonias no tratadas (tanto en abejas adultas como en cría). Esto indicaría que al remover ácaro, también disminuye los niveles del VAD. De hecho, tanto en abejas adultas como en cría, los niveles del VAD en las colonias tratadas se redujeron casi a 0. Sin embargo, este resultado, además del efecto del acaricida, también se debió a que al momento de hacer los dos grupos de estudio (tratadas y no tratadas), éstos se homogeneizaron en cuanto a población y niveles de infestación con el ácaro *Varroa destructor* y desde el inicio el grupo a ser tratado tenía menor número de colonias infectadas con el VAD y por lo tanto, menores niveles del mismo. En este sentido, otros estudios como el de Guzmán-Novoa *et al* (2012), también observaron que, aunque había presencia de virus (VAD, Virus de la Parálisis Aguda Israelí, Virus de Cría Ensacada y ABPV) en abejas adultas, ácaros y cría de obreras, no había una relación aparente entre los porcentajes de infestación con *Varroa destructor* y el número de virus detectados en las diferentes colonias del estudio.²² Así que la relación varroa-VAD no siempre es clara.

6.3 Efecto del acaricida tau-fluvalinato sobre la población de abejas adultas

Aplicar el tratamiento con tau-fluvalinato durante seis semanas no redujo la población de abejas adultas de las colonias tratadas hasta un mes después de que el tratamiento fue concluido. Las colonias no tratadas tampoco difirieron en cuanto a la población de abejas adultas a lo largo del estudio.

En el estudio realizado por Locke *et al*¹⁵ el número de abejas adultas y de cría de las colonias sin tratamiento se redujeron hasta casi la mitad de la población inicial. Los signos de abejas adultas con alas deformes fueron incrementando en las colonias sin tratamiento; es probable que esto influyera en el bajo número de abejas adultas, así como el porcentaje de infestación por varroa en las colonias sin tratamiento.¹⁵

Esta diferencia puede ser por los climas tan diferentes con los que cuentan los dos lugares de estudio, ya que el realizado por Locke *et al* fue en Suecia donde se tienen inviernos y diferencias climáticas muy marcadas, mientras que en la zona de estudio del presente trabajo (la Ciudad de México) las diferencias climáticas no son tan drásticas y marcadas; de hecho, en el estudio realizado en Suecia, todas las colonias sin tratamiento murieron antes o durante el invierno siguiente, mientras que todas las colonias tratadas lograron sobrevivir.¹⁵

7. CONCLUSIONES

La importancia de este trabajo radica en que no se han realizado muchos estudios que pretendan demostrar las diferentes implicaciones que tiene la aplicación de un acaricida, como el tau-fluvalinato, en los niveles de infestación de un ácaro como *Varroa destructor*, en la población de abejas adultas de colonias que son sometidas a dicho tratamiento y en niveles relativos de virus de alas deformes (VAD) cuando se comparan colonias tratadas contra colonias no tratadas. Se observó que el acaricida fue capaz de reducir significativamente los niveles de infestación por el ácaro en colonias tratadas en comparación con las colonias que no recibieron el tratamiento, esto sin afectar negativamente a la fortaleza de las colonias (población de abejas adultas). Asimismo, se observó que los niveles del VAD fueron significativamente menores, tanto en crías como en obreras de colonias que se sometieron al tratamiento durante un periodo de seis semanas; aunque esto haya estado en parte relacionado con el hecho de que las colonias sin tratamiento tenían una carga viral mayor desde antes de iniciar el tratamiento, por lo que no se encontró una relación clara entre el porcentaje de infestación y la carga viral.

Hoy en día son importantes los estudios de esta índole, ya que, si bien es sabido que las infestaciones por *Varroa destructor* pueden llegar a ser mortales en colonias de abejas, también se ha observado que no es sólo varroa el único factor responsable de esto, sino que puede ser uno de los factores (como pesticidas, patógenos, entre otros) que, en conjunto, causan este resultado negativo, que cuando se ve a gran escala (ya que el parasitismo por varroa es

considerado un problema importante en la apicultura a nivel mundial) trae consecuencias tanto ecológicas como económicas.

Los resultados de este estudio sugieren que sería conveniente realizar estudios posteriores en donde se cuantifiquen los niveles del VAD antes de la aplicación del tratamiento para así tener un punto de comparación cuando se midan los niveles del virus después del periodo de tratamiento y de esta manera poder estimar con mayor exactitud la diferencia y el efecto que tuvo el tratamiento (de manera indirecta al reducir los porcentajes de infestación del ectoparásito) sobre los niveles del Virus de las Alas Deformes. Por ejemplo, Martin *et al* 2010 realizaron un estudio para ver la prevalencia del VAD en colonias tratadas y no tratadas contra el ácaro y antes de iniciar el tratamiento se determinaron los niveles del VAD (por la técnica de ELISA) en ácaros, adultos y cría operculada de cada una de las colonias pertenecientes al estudio para tener un punto de referencia.⁴⁵

CUADROS

Cuadro 1: Determinación de la población de abejas adultas en las 16 colonias de estudio en cada uno de los muestreos

Primer muestreo		Segundo muestreo		Tercer muestreo		Cuarto muestreo	
N° colonia	N° de B	N° colonia	N° de B	N° colonia	N° de B	N° colonia	N° de B
STx1	7.5	STx1	8	STx1	8	STx1	7
STx2	6	STx2	8	STx2	8	STx2	4
STx3	8.5	STx3	8	STx3	8	STx3	8
STx4	4	STx4	8	STx4	6	STx4	8
STx5	6	STx5	9	STx5	8	STx5	5
STx6	7	STx6	5.5	STx6	7	STx6	6
STx7	9	STx7	7	STx7	8	STx7	7
STx8	6	STx8	7	STx8	7	STx8	8
Tx1	7	Tx1	9	Tx1	7	Tx1	5
Tx2	7.5	Tx2	7	Tx2	7	Tx2	6
Tx3	7	Tx3	5	Tx3	7	Tx3	7
Tx4	8.5	Tx4	9	Tx4	9	Tx4	9
Tx5	2.5	Tx5	4.5	Tx5	5	Tx5	4
Tx6	5	Tx6	7.5	Tx6	6	Tx6	8
Tx7	5	Tx7	6	Tx7	6	Tx7	5
Tx8	6	Tx8	5.5	Tx8	8	Tx8	8

N° de colonia = identificación de cada colonia dependiendo de la aplicación o falta de tratamiento. **N° de B** = número de bastidores de cámara de cría cubiertos por abejas adultas. **STx**: colonias sin tratamiento. **Tx**: colonias con tratamiento

Cuadro 2: Determinación del nivel de infestación de *Varroa destructor* en abejas adultas de cada colonia en cada uno de los cuatro muestreos

Primer muestreo		Segundo muestreo		Tercer muestreo		Cuarto muestreo	
N° colonia	% infestación	N° colonia	% infestación	N° colonia	% infestación	N° colonia	% infestación
STx1	4	STx1	7.18	STx1	4.59	STx1	9.4
STx2	1.7	STx2	6.25	STx2	7.38	STx2	2
STx3	3.78	STx3	3.03	STx3	2.87	STx3	3
STx4	3.8	STx4	0	STx4	1.36	STx4	0.88
STx5	3.2	STx5	1.17	STx5	1.47	STx5	4.28
STx6	4	STx6	3.07	STx6	8.66	STx6	8.51
STx7	10	STx7	7.05	STx7	2.68	STx7	1.4
STx8	5.2	STx8	0	STx8	0	STx8	6.7
Tx1	3.1	Tx1	3.29	Tx1	1.06	Tx1	7.5
Tx2	3.52	Tx2	1.94	Tx2	0	Tx2	0
Tx3	4.72	Tx3	0	Tx3	0	Tx3	0
Tx4	6.79	Tx4	0	Tx4	2.96	Tx4	0.96
Tx5	3.6	Tx5	0	Tx5	0	Tx5	0
Tx6	8.7	Tx6	0	Tx6	0	Tx6	0
Tx7	4	Tx7	0.74	Tx7	1.32	Tx7	0
Tx8	4.1	Tx8	0	Tx8	0	Tx8	1.84

N° de colonia = identificación de cada colonia dependiendo de la aplicación o falta de tratamiento. **N° de B** = número de bastidores de cámara de cría cubiertos por abejas adultas. **STx**: colonias sin tratamiento. **Tx**: colonias con tratamiento

Cuadro 3: Muestras analizadas en la Universidad de Guelph, Canadá

Tipo de colonia	Adultas		Cría		
	Tx	STx	Tx	Stx	
Primer muestreo	80	80	80	80	
Segundo muestreo	80	80	80	80	
Tercer muestreo	80	80	80	80	
Cuarto muestreo	80	80	80	80	
Total	640		640		1280

Tx: colonias sin tratamiento. **STx**: colonias con tratamiento. Número de tubos de centrifuga, tanto de abejas adultas como de cría (pupas) que se enviaron a la Universidad de Guelph, Canadá.

ANEXO

Cuadro 4. Análisis de varianza de los niveles porcentuales de infestación de *V. destructor* en abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento

Fuente de varianza	GL	SC	CM	F	P
Tx	1	73.2	73.2	12.1	0.001
PM	63.3	22.4	3.7		0.016
Tx X PM	3	33.7	11.2	1.9	0.15
Error	56	339.1	6.1		

Los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada antes de ser analizados. **GL**: grados de libertad. **SC**: suma de cuadrados. **CM**: cuadrado medio. **F**: distribución. **P**: probabilidad. **Tx**: tratamiento. **PM**: periodo de muestreo

Cuadro 5. Análisis de varianza para el número promedio de bastidores cubiertos con abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento

Fuente de varianza	GL	CM	F	P
Tx	1	5.3	2.4	0.126
PM	3	2.5	1.1	0.349
Tx X PM	3	0.4	0.2	0.906
Error	56	2.2		

GL: grados de libertad. **SC**: suma de cuadrados. **CM**: cuadrado medio. **F**: distribución. **P**: probabilidad. **Tx**: tratamiento. **PM**: periodo de muestreo

Cuadro 6. Análisis de varianza de la cuantificación relativa del VAD en abejas adultas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento

Fuente de varianza	GL	SC	CM	F	P
Tx	1	0.41	0.41	15.3	<0.001
PM	3	0.09	0.03	1.2	0.334
Tx X PM	3	0.08	0.03	1	0.409
Error	56	1.49	0.03		

Los datos fueron transformados logaritmos antes de ser analizados. **GL**: grados de libertad. **SC**: suma de cuadrados. **CM**: cuadrado medio. **F**: distribución. **P**: probabilidad. **Tx**: tratamiento. **PM**: periodo de muestreo

Cuadro 7. Análisis de varianza de la cuantificación relativa del VAD en cría de abejas de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento

Fuente de varianza	GL	SC	CM	F	P
Tx	1	0.24	0.24	8.4	0.005
PM	3	0.39	0.01	0.5	0.711
Tx X PM	3	0.14	0.05	0.2	0.922
Error	56	1.58	0.03		

Los datos fueron transformados logaritmos antes de ser analizados. **GL:** grados de libertad. **SC:** suma de cuadrados. **CM:** cuadrado medio. **F:** distribución. **P:** probabilidad. **Tx:** tratamiento. **PM:** periodo de muestreo

FIGURAS



Figura 1: Ácaro hembra, adulto de *Varroa destructor*. Foto: Alex Wild



Figura 2: Pupa infestada con el ácaro *Varroa destructor*. Foto: Chandler



Figura 3: Abeja deforme, probablemente a causa del ácaro *Varroa destructor*. Foto: Ricardo Anguiano



Figura 4: *Aethina tumida* el pequeño escarabajo de la colmena



Figura 5: Identificación de una colmena con tratamiento



Figura 6: Aplicación de tiras con tau-fluvalinato en una colmena sometida a tratamiento



Figura 7. Espectrofotómetro *Nanovue GE Healthcare* indicando una concentración de ARN de 320.8ng/μl

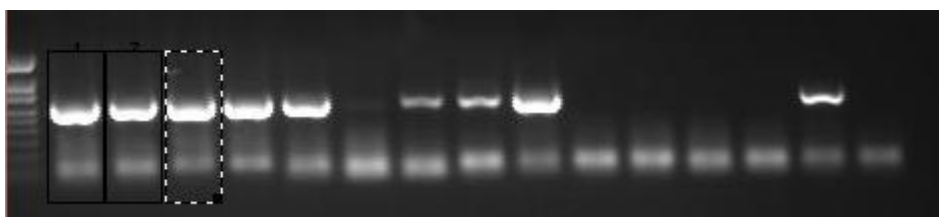


Figura 8. Selección de las bandas tanto del ADNc (banda superior) como del gen de referencia (banda inferior) de 3 muestras positivas al VAD para el posterior conteo de píxeles utilizando el programa *Scion Image*.

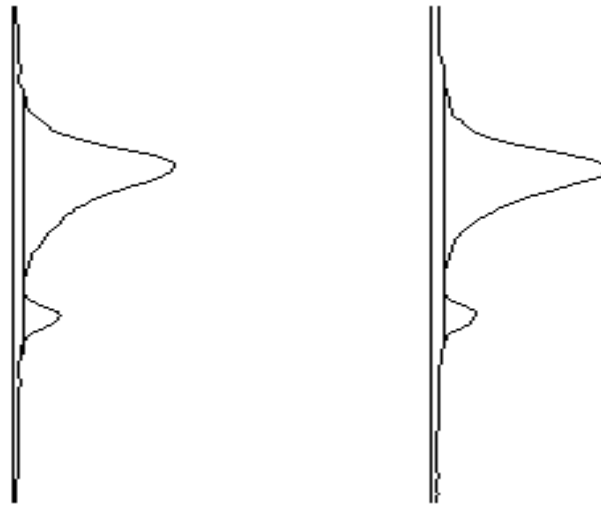


Figura 9. Medición de la carga viral relativa utilizando el programa *Scion Image*. El pico superior representa al VAD, mientras que el inferior al gen de referencia

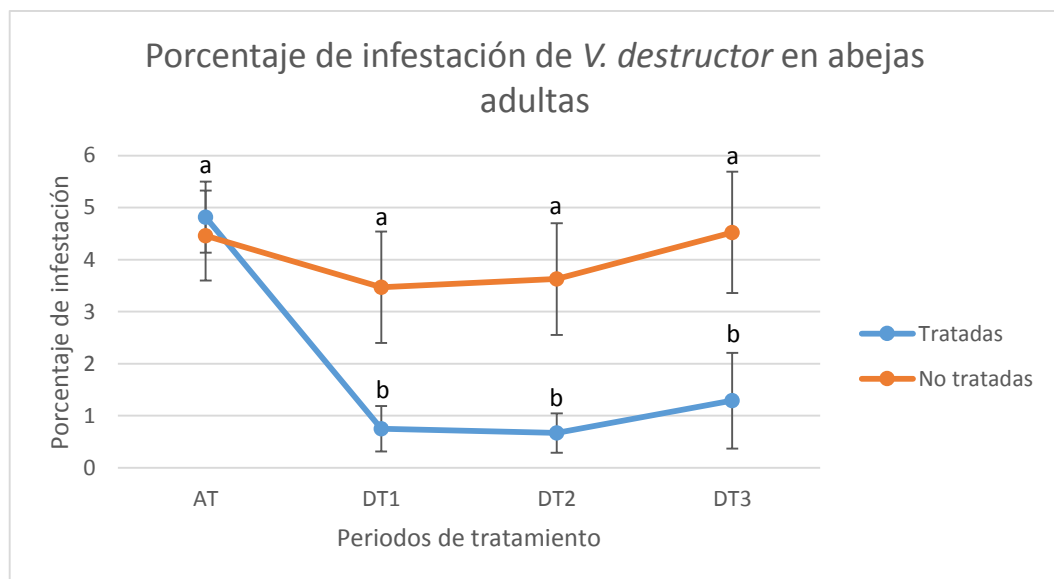


Figura 10. Porcentaje de infestación de *V. destructor* en abejas adultas (\pm EE) de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento (**AT**) y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento (**DT1**, **DT2**, **DT3**). Los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada antes de ser analizados. Literales diferentes sobre las medias muestran diferencias significativas basadas en análisis de varianza y pruebas protegidas de cuadrados mínimos de Fisher. En la figura se muestran los datos sin transformar

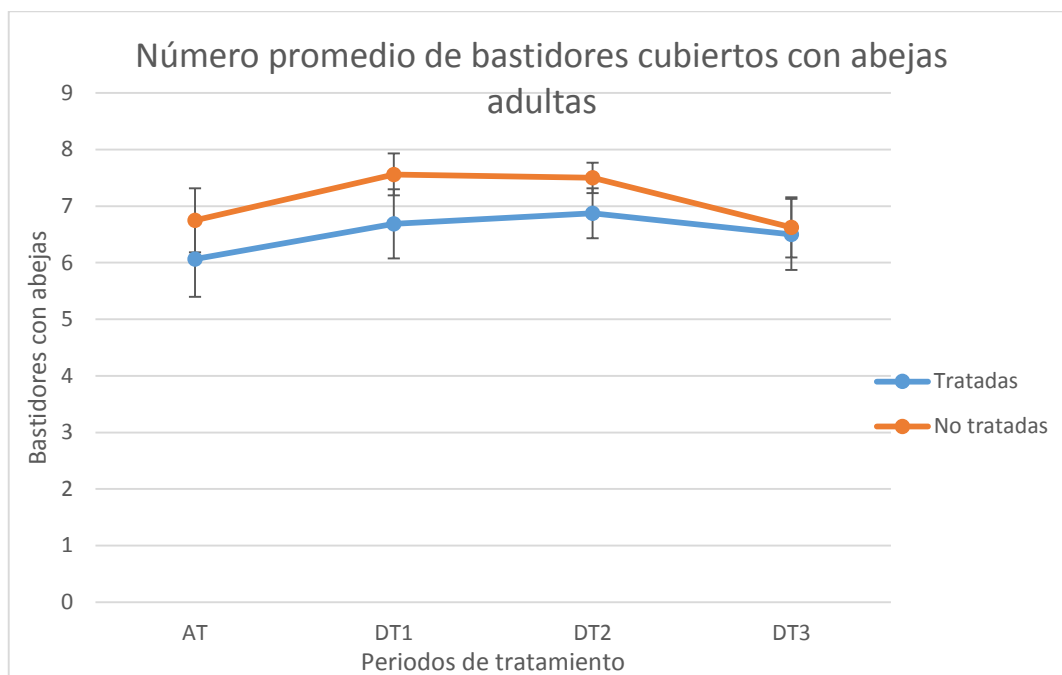


Figura 11. Número promedio de bastidores cubiertos con abejas adultas (\pm EE) de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento (**AT**) y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento (**DT1, DT2, DT3**)

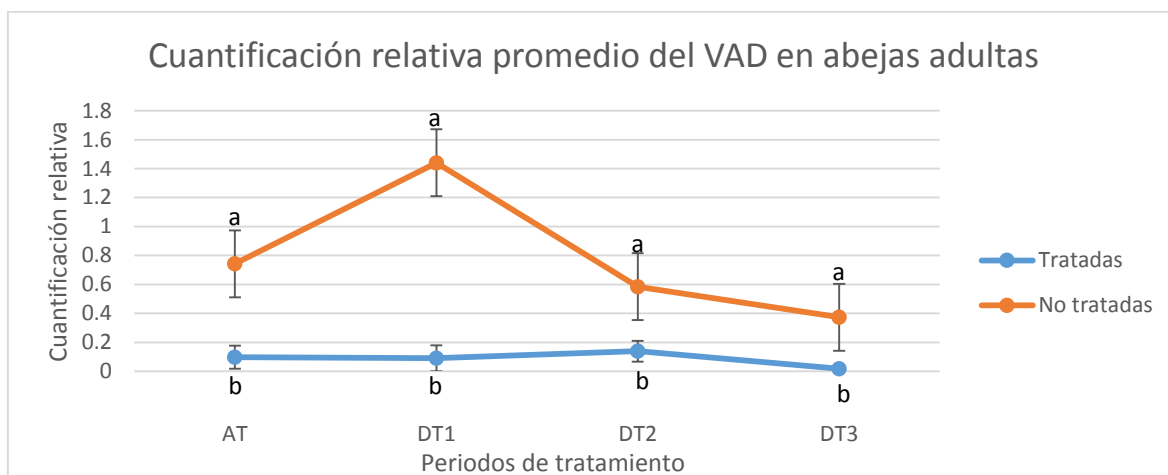


Figura 12. Cuantificación relativa promedio del VAD en abejas adultas (\pm EE) de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento (**AT**) y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento (**DT1, DT2, DT3**). Los datos fueron transformados a logaritmos antes de ser analizados. Literales diferentes sobre las medias muestran diferencias significativas basadas en análisis de varianza y pruebas protegidas de cuadrados mínimos de Fisher. En la figura se muestran los datos sin transformar

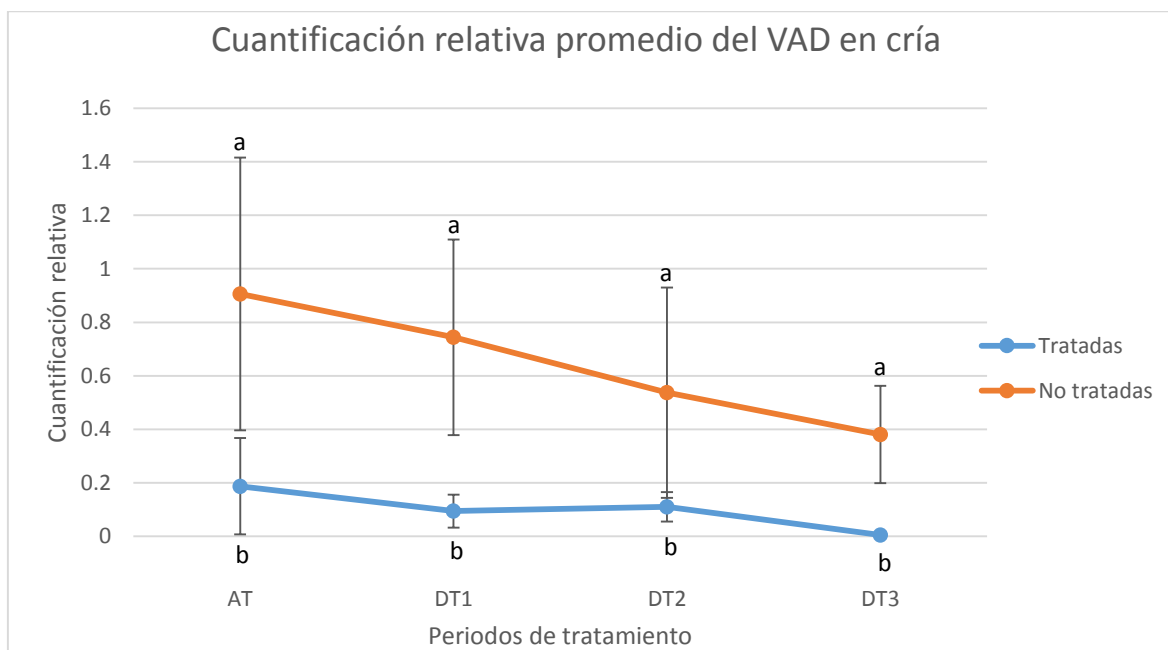


Figura 13. Cuantificación relativa promedio del VAD en cría de abejas melíferas (\pm EE) de colonias tratadas y no tratadas con el acaricida tau-fluvalinato antes del tratamiento (**AT**) y durante tres periodos quincenales de muestreo posteriores al tratamiento (**DT1**, **DT2**, **DT3**). Los datos fueron transformados a logaritmos antes de ser analizados. Literales diferentes sobre las medias muestran diferencias significativas basadas en análisis de varianza y pruebas protegidas de cuadrados mínimos de Fisher. En la figura se muestran los datos sin transformar

8. REFERENCIAS

1. **SAGARPA**. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México 1990-1988
2. **Ponce VJ**. Determinación de la presencia del Virus de las Alas Deformes (VAD) en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en México. (Tesis licenciatura). México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2013
3. **FAO**. Los polinizadores: su biodiversidad poco apreciada, pero importante para la alimentación y la agricultura. Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura 2008; Tratado IT/GB - 3/09/Inf10. FAO. Febrero 2008. Disponible en:
<http://www.planttreaty.org/sites/default/files/gb3i10s.pdf>
4. **Galicia-Morales BE**, De Araujo-Freitas Ch, Marrufo-Olivares J. Sobrevivencia de abejas nodrizas con varios tipos de alimentación en jaulas para el transporte de abejas reinas en *Apis mellifera*. Notiabeja. 2014
5. **SAGARPA**. Apicultura. 2012. Disponible en:
sagarpa.gob.mx/ganadería/Documents/reunionXIII/api.pdf
6. **SAGARPA**. Prevén nuevo récord en las exportaciones de miel. Noviembre 2014. Disponible en:
<http://sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/boletines/Paginas/201411B245.aspx>
7. **Claridades Agropecuarias**. Situación actual y perspectivas de la apicultura en México. 2010; 199:3. Disponible en:
<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/25/sppa9098.pdf>
8. **Rosenkranz P**, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of invertebrate pathology 2010; 103:96-119

9. **Vázquez CR**. Resultados y perspectivas de la campaña nacional contra la varroosis de las abejas. Memorias del XI Seminario Americano de Apicultura; México (DF): Unión Nacional de Apicultores 1997:83-90
10. **Medina ML**. Reproducción del ácaro *Varroa Jacobsoni* Oud. En las celdas de cría de obreras de abejas africanizadas (*Apis mellifera* L.) en Yucatán. Memorias del XI Seminario Americano de Apicultura; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Unión Nacional de Apicultores 1997:92-9
11. **Espinosa ML**, Guzmán-Novoa E, Ramírez LA, Vázquez CR. Enfermedades parasitarias de las abejas adultas. Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades de las abejas melíferas. México D.F: Imagen Editorial Yire 2012; 49-67
12. Varroosis de las abejas melíferas. Manual de la Oie sobre animales terrestres 2008. Disponible en http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.02.07.%20Varroosis.pdf
13. **Arechavaleta ME**, Guzmán-Novoa E. Producción de miel de colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) tratadas y no tratadas con fluvialinato contra *Varroa jacobsoni* Oudemans en Valle de Bravo, Estado de México. Vet Mex 2000; 31:381-381.
14. **Calderón R**, editor. Apicultura y su impacto en la seguridad alimentaria. X Congreso Nacional de Apicultura 2009: Costa Rica
15. **Locke B**, Forsgren E, Fries I, De Miranda J. Acaricide Treatment Affects Viral Dynamics in *Varroa destructor*- Infested Honey Bee Colonies via both Host Physiology and Mite Control. Applied and Environmental Microbiology 2012; 78(1): 227–235
16. **Yang X**, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005; 102:7470-7475
17. **Genersch E**, Aubert M. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Veterinary Research 2010; 41: 54-74
 18. **Medina ML**, May IW. Enfermedades de las Abejas. Universidad Autónoma de Yucatán. Dirección general de desarrollo académico. 2005
 19. **Amiri E**, Meixner M, Büchler R, Kryger P. Choric bee paralysis virus in honeybee queens: evaluating susceptibility and infection routes. Viruses 2014; 6(3):1188-1201
 20. **Bailey L**. The incidence of virus diseases in the honey bee. Ann Appl Biol 1967; 60:43–48
 21. **De Miranda J**, Guido C, Giles B. The Acute Bee Paralysis Virus–Kashmir Bee Virus–Israeli Acute Paralysis Virus Complex. Journal of Invertebrate Pathology 2010; 103:S30–S47
 22. **Guzmán-Novoa E**, Hamiduzzaman M, Espinosa-Montaña L, Correa-Benitez A, Anguiano-Baez R, *et al.* First detection of four viruses in honey bee (*Apis mellifera*) workers with and without deformed wings and *Varroa destructor* in Mexico. Journal of Apicultural Research 2012; 51(4): 342-346
 23. **Benjeddou M**, Leat N, Allsopp M, Davison S. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. Applied and Environmental Microbiology 2001; 67(5): 2384–2387
 24. SAGARPA. Manual de Patología apícola. Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20apcolas/Attachments/5/manpato.pdf>
 25. **Kondreddy ER**, Jin HN, Se EC, Chang HK, Mi SY, Huong TT *et al.* Analysis of the complete genome sequence and capsid region of black queen cell viruses

- from infected honeybees (*Apis mellifera*) in Korea. *Virus Genes* 2013; 47:126–132
26. **Higes M**, Esperón F, Sánchez-Vizcaíno J. Short communication. First report of black-queen cell virus detection on honey bees (*Apis mellifera*) in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2007; 5(3): 322-325
27. **Guzman-Novoa E**, Mollah H, Correa BA, Espinosa ML, Uribe RJ. A scientific note on the first detection of black queen cell virus on honey bees (*Apis mellifera*) in Mexico. *Apidologie* 2013; 44: 382-384
28. **Allen M**, Ball B. The incidence and world distribution of the honey bee viruses. *Bee world* 1996; 77(3):141-162
29. **Bailey L**, Ball B, Perry J. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology (UK)* 1983; 103(1):13-20
30. **Nguyen NTB**, Le TH. Complete genome sequence of sacbrood virus strain SBM2, isolated from the honeybee *Apis cerana* in Vietnam. *Genome Announc* 2013; 1(1): e00076-12. doi:10.1128/genome.
31. **Grabensteiner E**, Ritter W, Carter M, Davison S, Pechhacker H, Kolodziejek J, *et al.* Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): Rapid identification and phylogenetic analysis using Reverse Transcription-PCR. *Clinical and Vaccine Immunology* 2001; 8 (1): 93-104
32. **Lanzi G**, De Miranda J, Boniotti M, Craig E, Lavazza A, Capucci L, *et al.* Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology* 2006; 80: 4998-5009
33. **Bailey L**, Ball B. *Honey Bee Pathology*, 2nd ed. London: Academic Press, 1991
34. **De Miranda J**, Genersch E. Deformed wing virus. *Journal of invertebrate Pathology* 2010; 103: s48-s61

35. **Bowen-Walker P**, Martin S, Gunn A. The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of invertebrate Pathology* 1999; 73: 101-106.
36. **Hamiduzzaman M**, Guzmán-Novoa E, Goodwin P, Reyes-Quintana M, Koleoglu G, Correa-Banítez A, *et al.* Differential responses of Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) to viral replication following mechanical transmission of *Varroa destructor* parasitism. *Journal of invertebrate Pathology* 2015; 126: 12-20
37. **Dainat B**, Evans J, Chen Y, Gauthier L, Neumanna P. Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* reduce the Life Span of Winter Honeybees. *American Society of Microbiology* 2011
38. Clima. Delegación Milpa Alta. Ciudad de México. Disponible en: <http://www.milpa-alta.df.gob.mx/index.php/ven>
39. **Delaplane KS**, Van der Steen J, Guzman-Novoa E. Standard Methods for Estimating Strength Parameters for *Apis mellifera* Colonies. *Journal of Apicultural Research* 2013; 52(1)
40. **De Jong D**, Andrea RD, Gonçalves. A Comparative Analysis of Shaking Solutions for the Detection of *Varroa jacobsoni* on Adult Honeybees. *Apidologie* 2013; 13(3)
41. **Martínez J**, Alcalá K, Leal M, Vivas J, Martínez E. Prevención de Varroosis y Suplementación. SAGARPA-INIFAP. Disponible en: http://utep.inifap.gob.mx/pdf_s/MANUAL%20VARROOSIS.pdf
42. **Guzman-Novoa E**, Anguiano-Baez R, Mollah H, Espinosa-Montaña L, Correa-Benítez A. *Varroa destructor* parasitism differentially influences the prevalence, levels and overt infections of deformed wing virus in honey bees in temperate and tropical climates

43. **Di Prisco G**, Zhang X, Pennacchio F, Caprio E, Li J, *et al.* Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees *Apis mellifera*. *Viruses* 2011; 3:2425-2441
44. **Gregorc A**, Evans J, Scharf M, Ellis J. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology* 2012; 58: 1042-1049
45. **Martin S**, Ball B, Carreck N: Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research* 2010; 49(1): 72-79