

# Producción de miel e infestación con *Varroa destructor* de abejas africanizadas (*Apis mellifera*) con alto y bajo comportamiento higiénico

## Honey production and *Varroa destructor* infestation of Africanized honey bee (*Apis mellifera*) colonies with high and low hygienic behavior

Carlos Aurelio Medina-Flores<sup>a</sup>, Ernesto Guzmán-Nova<sup>b</sup>, Carlos Fernando Aréchiga Flores<sup>a</sup>, Héctor Gutiérrez Bañuelos<sup>a</sup>, Jairo Iván Aguilera Soto<sup>a</sup>

### RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar la producción de miel y los niveles de *Varroa destructor* entre colonias de abejas africanizadas (AA) (*Apis mellifera*) con alto y bajo comportamiento higiénico (CH) en el altiplano semiárido de México. Se midió el nivel de CH a 57 colonias por congelamiento de la cría con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>). Las colonias se clasificaron en dos grupos: alto CH (> 95 %) y bajo CH (< 50 % de remoción de la cría muerta por congelamiento en 48 h). La producción de miel se evaluó durante el otoño y la primavera y el nivel de infestación por *Varroa* en abejas adultas se determinó antes y durante las cosechas de miel. En primavera, las colonias con CH alto produjeron significativamente más miel que las de CH bajo (21.4 ± 4.7 vs 13.4 ± 5.0 kg; *P*<0.01). No hubo diferencias entre los dos grupos de colonias para los niveles de *Varroa* (*P*>0.05). Estos resultados sugieren que aparentemente el comportamiento higiénico no tiene un efecto mayor en la resistencia de las AA al crecimiento poblacional del ácaro. También sugieren que el comportamiento higiénico alto podría contribuir a incrementar la producción de miel en épocas del año con flujo reducido de néctar.

**PALABRAS CLAVE:** Abejas melíferas, Comportamiento higiénico, Varroosis, Tolerancia, Cosecha de miel.

### ABSTRACT

The aim of this study was to compare the honey yields and levels of *Varroa destructor* between colonies of Africanized honey bees (AHB) (*Apis mellifera*) showing high and low hygienic behavior (HB) in Mexico's semi-arid high plateau. The degree of HB of 57 colonies was measured using the liquid nitrogen (N<sub>2</sub>) brood-freezing technique. The colonies were categorized into two groups: high HB (> 95 %) and low HB (< 50 % removal of freeze-killed brood at 48 h). Honey production was evaluated in fall and spring and the level of *Varroa* on adult bees was determined before and during the honey harvests. The colonies with high HB produced significantly more honey than the colonies with low HB only during the spring crop (21.4 ± 4.7 vs 13.4 ± 5.0 kg; *P*<0.01). There were no significant differences between the two groups of colonies for levels of infestation by *V. destructor* (*P*>0.05). These results suggest that apparently HB does not have a major role in restraining the growth of *Varroa* populations in AHB. They also suggest that high levels of HB could contribute to increase honey production in AHB colonies during times of the year with limited nectar flow.

**KEY WORDS:** Honey bee, Hygienic behavior, Varroosis, Tolerance, Honey harvest.

### INTRODUCCIÓN

El comportamiento higiénico (CH) de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) es la habilidad de

### INTRODUCTION

The hygienic behavior (HB) of honey bees (*Apis mellifera*) is the ability of some workers to

Recibido el 21 de agosto de 2013. Aceptado el 7 de enero de 2014

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Carretera Panamericana Zacatecas Fresnillo Km 31.5, El Cordovel, Enrique Estrada, Zacatecas, México. carlosmedina1@hotmail.com. Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> School of Environmental Sciences, University of Guelph, Guelph, ON N1G 2W1, Canada.

algunas abejas obreras, de detectar, desopercular y remover cría enferma, muerta o parasitada del interior de las celdas de un panal. Este mecanismo, interrumpe el ciclo de algunas enfermedades y limita sus posibilidades de dispersión<sup>(1-4)</sup>.

La expresión del CH en una colonia de abejas depende de factores como la proporción y edad de las abejas que realizan tareas higiénicas<sup>(5-7)</sup>, la entrada de néctar y polen colectados por las obreras<sup>(8-11)</sup> y la fortaleza de la colonia<sup>(5)</sup>. Pero el factor más importante en la expresión de este comportamiento, es su componente genético. Numerosos estudios han demostrado que los efectos genéticos sobre este comportamiento influyen más que los ambientales<sup>(12-16)</sup>. Los valores de heredabilidad del CH que se han publicado han sido variables, pero lo suficientemente altos (>0.5) como para establecer que esta característica puede ser usada como criterio de selección en un programa de mejoramiento genético<sup>(17-20)</sup>.

La identificación de colonias que expresan CH se basa en provocar enfermedad o muerte de las crías operculadas y evaluar el tiempo que las abejas tardan en removerlas. Esto se ha realizado infectando a la cría con esporas de *P. larvae*<sup>(1)</sup>, insertando un alfiler a través del opérculo de celdas de cría<sup>(21)</sup> y congelando cría operculada<sup>(22)</sup>. Utilizando estas técnicas, se ha encontrado una baja frecuencia (10 a 20 %) de colonias comerciales con alto CH (que remueven > 95 % de cría congelada en 48 h) en poblaciones de abejas europeas (AE)<sup>(23,24)</sup>.

El CH es considerado un mecanismo importante de resistencia y tolerancia a enfermedades de la cría, ya que se ha observado que colonias altamente higiénicas presentan menos problemas relacionados con las enfermedades de la cría como la loque americana (*Paenibacillus larvae*)<sup>(1,10,25)</sup> y cría calcárea (*Ascosphaera apis*)<sup>(26-28)</sup>. Aunado a lo anterior, existen evidencias con resultados muy variables en diferentes partes del mundo respecto a la

detect, uncap, and remove diseased, dead, or parasitized brood inside comb cells. This mechanism interrupts the cycle of some diseases and limits their ability to spread<sup>(1-4)</sup>.

The expression of HB in a honey bee colony is affected by factors such as the proportion and age of the bees performing hygienic tasks<sup>(5-7)</sup>, the entry of nectar and pollen collected by workers<sup>(8-11)</sup> and the strength of the colony<sup>(5)</sup>. But the most important factor influencing the expression of this behavior is a genetic component. Numerous studies have shown that genetic effects influence this behavior more than environmental effects<sup>(12-16)</sup>. The published heritability values for HB are variable, but high enough (>0.5) to establish that this trait can be used as selection criteria in breeding programs<sup>(17-20)</sup>.

The identification of colonies expressing HB is done by inducing disease and death in capped brood, and by evaluating the time it takes for the bees to remove the brood. This has been done by infecting brood with spores of *P. larvae*<sup>(1)</sup>, inserting a pin through brood cappings<sup>(21)</sup> and freezing capped brood cells<sup>(22)</sup>. Using these techniques, a low frequency (10 to 20 %) of commercial colonies expressing high HB (which remove > 95 % of freeze-killed brood in 48 h) has been found in populations of European honey bees (EHB)<sup>(23,24)</sup>.

HB is considered an important mechanism of resistance and tolerance to brood diseases of honey bees, since it has been observed that highly hygienic colonies have fewer instances of brood diseases such as American foulbrood (*Paenibacillus larvae*)<sup>(1,10,25)</sup> and chalk brood (*Ascosphaera apis*)<sup>(26-28)</sup>. Additionally, evidence about the importance of HB on the control of varroosis (*Varroa destructor*) in different parts of the world shows very variable results<sup>(29-32)</sup>.

It has been reported that Africanized honey bees (AHB) from South America have lower *V. destructor* infestation levels than EHB<sup>(33)</sup> and it has been speculated that the tolerance of

importancia del CH sobre el control de la varroosis (*Varroa destructor*)<sup>(29-32)</sup>.

Se ha reportado que en AA de Sudamérica, los niveles de infestación del ácaro *V. destructor* son menores que en AE<sup>(33)</sup> y se ha especulado que la tolerancia de las AA hacia el ácaro pudiera ser en parte atribuible a su alto CH<sup>(34)</sup>. Sin embargo, es necesario realizar estudios que revelen el impacto relativo del CH sobre la tolerancia a *Varroa* en AA de México.

Por otro lado, la alta expresión del CH en una colonia, teóricamente pudiera contribuir a la obtención de una mayor producción de miel como consecuencia de una menor frecuencia de enfermedades de la cría. Sin embargo, aun cuando existen múltiples evidencias de la importancia del CH sobre el control de enfermedades bacterianas y micóticas de la cría, la relación de este comportamiento con la producción de miel aún no es clara, ya que existen pocos trabajos con resultados variables y que se han realizado con AE<sup>(24,31,35)</sup>.

No existen trabajos que muestren la influencia del CH sobre la producción de miel y sobre el grado de infestación de *V. destructor* en colonias de AA. Además, para la implementación de programas de mejoramiento genético, es importante conocer la proporción de colonias altamente higiénicas en poblaciones de AA de distintas regiones, lo cual presumiblemente podría contribuir a incrementar su resistencia a enfermedades y su producción de miel.

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de colonias de AA que expresan alto y bajo CH, y si existen diferencias significativas entre estos dos grupos de colonias para los niveles de infestación de *Varroa*, y para la producción de miel en el altiplano semiárido de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Ubicación*

El presente trabajo se realizó en laboratorios y colonias pertenecientes a la Unidad Académica

AHB to the mite may be partly attributable to their high expression of HB<sup>(34)</sup>. However, studies are needed to reveal the relative impact that HB has on *Varroa* tolerance in AHB of Mexico.

In addition to the above, a high expression level of HB in a colony, could theoretically contribute to more honey production because of a lower frequency of brood diseases. However, even when there are multiple evidences about the importance of HB on the control of fungal and bacterial brood diseases, the relationship of this behavior with honey production is not yet clear, since few studies, showing variable results, have been conducted, and have been done with EHB<sup>(24,31,35)</sup>.

There are no studies that show the influence of HB on honey production and on the degree of infestation by *V. destructor* in AHB colonies. Moreover, it is important to know the proportion of highly hygienic colonies in AHB populations from different regions, to implement breeding programs, which, presumably could contribute to increase their disease resistance and honey production.

The objectives of this study were to determine the frequency of AHB colonies that express high and low HB, and if there are significant differences between these two groups of colonies for levels of *Varroa* infestation and honey yields at the semiarid high plateau of Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

### *Location*

This study was carried out in laboratories and hives of the Veterinary Medicine Academic Unit at the Autonomous University of Zacatecas. The experimental apiary was installed in the municipality of Jalpa, Zacatecas, Mexico, 21° 38' N, 100° 51' W, at 1,380 m asl. This area has low forest deciduous vegetation and a semi-warm, semi-dry climate. The average annual temperature in Jalpa is 21.2 °C and the average annual rainfall is 700 mm<sup>(36)</sup>.

de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas. El apiario experimental fue instalado en el municipio de Jalpa, Zacatecas, México, ubicado a 21° 38' N y 100° 51' O, a 1,380 msnm. El área de estudio presenta una vegetación de tipo selva baja caducifolia y un clima semiseco semicálido. La temperatura media anual es de 21.2 °C y una precipitación media anual de 700 mm<sup>(36)</sup>.

#### *Evaluación del comportamiento higiénico (CH)*

Se evaluó el nivel de CH a 57 colonias de abejas alojadas en colmenas tipo Jumbo. Inicialmente y con la finalidad de establecer la relación entre el tamaño poblacional de las colonias con la expresión del CH, al momento de realizar las pruebas (dos meses previo a la cosecha de otoño), a cada colonia le fue registrado el número de panales cubiertos con abejas y con cría.

El método utilizado para medir el grado de CH en las colonias fue el descrito por Spivak y Reuter<sup>(10)</sup>, el cual consiste en congelar con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) una sección de panal conteniendo cría operculada. A cada colonia se le realizaron dos pruebas entre las 10 y 13 h, y hubo un lapso de siete días entre las dos pruebas.

En cada colonia, se seleccionó un panal de cría operculada con pupas de 3 a 4 días<sup>(37)</sup>, ya que esta etapa es la más adecuada para la evaluación del CH<sup>(38)</sup>. El panal se identificó con el mismo número de la colonia y posteriormente se insertó un cilindro metálico de 8 cm de diámetro x 10 cm de altura, sin tapa en ambos extremos, que abarcó aproximadamente 200 celdas operculadas. Colocado el cilindro en el área seleccionada se agregaron 300 ml de N<sub>2</sub> (a -195 °C) para congelar y matar las pupas. Posteriormente, el cilindro se retiró del panal y se registró el número de celdas congeladas. Finalmente, los panales se regresaron a las colonias de origen. Cuarenta y ocho (48) horas después de la congelación, los panales se

#### *Evaluation of hygienic behavior (HB)*

The HB of 57 honeybee colonies housed in jumbo-size hives was evaluated. Initially, and to establish the relationship between the population size of the colonies with the expression of HB during testing times (two months before the autumn harvest), the number of combs covered with bees and brood was recorded in each colony.

The degree of HB in the colonies was measured following the method by Spivak and Reuter<sup>(10)</sup>, which involves freezing a section of comb containing capped brood with liquid nitrogen (N<sub>2</sub>). Each colony was tested twice during mornings, between 10 and 13 h, and with a 7 d period between tests.

In each colony, a brood comb containing 3 to 4-d old capped pupae<sup>(37)</sup> was selected because this is the most appropriate stage to evaluate HB<sup>(38)</sup>. The comb was identified with the number of the colony and then a metal cylinder of 8 cm (diameter) x 10 cm (height) open at both ends, was inserted on an area of the comb containing about 200 capped brood cells. Three hundred (300) ml of N<sub>2</sub> (at -195 °C) were poured through the cylinder to freeze and kill the pupae. Subsequently, the cylinder was removed from the comb and the number of frozen cells was recorded. Finally, each comb was returned to its colony of origin. Forty eight (48) hours after freezing, the combs were removed again from their colonies to record the number of freeze-killed pupae that were removed by the bees.

The percentage of HB was estimated by dividing the number of pupae that were removed, by the total number of cells that were initially frozen, and the result was multiplied by 100. Colonies that in the two tests uncapped and removed 95 % or more of the frozen brood were classified as of high HB, while those that removed 50 % or less of the frozen brood were classified as of low HB<sup>(22)</sup>. Hence, two groups were formed from the results of these evaluations, one integrated with 18 colonies

retiraron nuevamente de las colonias para registrar el número de pupas que fueron removidas por las abejas del área congelada.

El porcentaje de CH se estimó mediante el conteo de las celdas que se removieron entre el total de las celdas que se congelaron inicialmente, y el resultado se multiplicó por 100. Las colonias que en las dos pruebas realizadas desopercularon y removieron el 95 % o más de la cría congelada se clasificaron como de CH alto, mientras que aquéllas que removieron 50 % o menos de la cría congelada fueron clasificadas como de CH bajo<sup>(22)</sup>. Por ello, a partir de los resultados obtenidos en estas evaluaciones, se formaron dos grupos; uno de ellos integrado con 18 colonias que presentaron un CH alto y otro con 11 colonias que mostraron un CH bajo.

Las reinas de cada una de las colonias seleccionadas fueron marcadas con tinta indeleble en el tórax para su identificación. Además, se realizó un análisis morfométrico a las abejas<sup>(39)</sup>, con el propósito de confirmar la africanización de las colonias.

#### *Evaluación de la producción de miel en las colonias con alto y bajo CH*

Posteriormente, con el propósito de identificar una posible asociación entre el CH y la producción de miel, se registró el número de panales de alza con miel colectados de cada colonia durante las cosechas de otoño y primavera. El total de miel cosechada (kg) de todas las colonias se dividió entre el número de panales colectados al momento de las cosechas, para así obtener un promedio de miel por panal. Este peso promedio se multiplicó por el número de panales cosechados de cada colonia, con la finalidad de estimar el rendimiento individual de las mismas<sup>(40)</sup>.

#### *Evaluación del nivel de infestación de *V. destructor**

Se determinó el nivel de infestación del ácaro *V. destructor* en abejas adultas en cada una de

showing high HB and another with 11 colonies showing low HB.

The queens of each of the selected colonies were marked with indelible ink on the thorax for identification. Further, with the purpose of confirming africanization of the colonies, morphometric analysis of bees<sup>(39)</sup> was performed.

#### *Evaluation of honey production of colonies with high and low HB*

To identify a possible association between HB and honey yield, the number of combs with honey collected from supers of each colony during the autumn and spring blossoms was recorded. The total amount of honey harvested (kg) from all colonies was divided by the total number of combs collected and an average weight of honey per comb was obtained. This average weight was then multiplied by the number of combs harvested for each colony to estimate the individual yields of the colonies<sup>(40)</sup>.

#### *Assessment of *V. destructor* infestation levels*

The level of *V. destructor* infestation of each colony was determined on adult bees for the two colony groups (high and low HB) 60 d before honey harvests and during them, as per de Jong *et al*<sup>(41)</sup>. This technique involves collecting a sample of approximately 300 adult bees in a vial containing 75 % ethanol; mites are detached from the bees through mechanical agitation and the total number of both mites and bees are recorded. The infestation rate was determined by dividing the mite count by the number of bees and then, multiplying the resulting figure by 100.

#### *Statistical analysis*

In order to normalize the data on percentages for HB and for *Varroa* infestation levels, they were arcsine square-root transformed. The data analysis was performed using SAS statistical software<sup>(42)</sup>. To compare the two groups of colonies for number of combs with brood and

las colonias de los dos grupos (alto y bajo CH) 60 días antes de las cosechas y durante éstas, mediante la metodología descrita por de Jong et al.<sup>(41)</sup>. Esta técnica consiste en coleccionar una muestra de aproximadamente 300 abejas adultas en un recipiente con etanol al 75 %, para posteriormente mediante agitación mecánica desprender los ácaros adheridos a las abejas. El porcentaje de infestación por el ácaro se determinó mediante el conteo total de ácaros, divididos entre el número de abejas que fueron analizadas y el resultado se multiplicó por 100.

#### *Análisis estadístico*

Con la finalidad de normalizar los datos porcentuales de los valores del CH y de los niveles de infestación por *Varroa* de las colonias, estos fueron transformados con la función arcoseno de la raíz cuadrada. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa estadístico SAS<sup>(42)</sup>. Para comparar los dos grupos de colonias en cuanto al número de panales con cría y con abejas (población), en cuanto a la producción de miel, y en cuanto a los niveles de varroosis, se utilizó una prueba "t" de Student. Además, se utilizó la prueba de correlación de Pearson para determinar la relación entre el número de panales con cría y con abejas sobre la expresión del CH, así como para determinar la relación de los datos del CH entre la primera y la segunda evaluación de las colonias.

## RESULTADOS

Los resultados del análisis morfométrico mostraron que todas las colonias experimentales eran africanizadas y que después de realizar dos pruebas de CH a 57 colonias, se encontró una correlación positiva y significativa en el nivel de CH registrado entre la primera y la segunda evaluación ( $r=0.62$ ,  $n=57$ ,  $P= 0.0001$ ), lo cual indica que las colonias que remueven un alto porcentaje de la cría congelada en la primera prueba, lo realizan de una manera similar en la segunda. El 31.5 % de las colonias

bees (population), for honey production, and for varroosis levels, a Student "t" test was used.

In addition to the above, the Pearson correlation test was used to determine the relationship between the number of combs covered with brood and bees and the expression of HB, and to determine the relationship between the data of the first and the second HB tests.

## RESULTS

The results of morphometric analysis showed that all of the experimental colonies were Africanized. After performing two tests of HB to 57 colonies, a significant positive correlation in the level of HB recorded between the first and second test was found ( $r= 0.62$ ,  $n= 57$ ,  $P= 0.0001$ ), indicating that the colonies that remove a high percentage of freeze-killed brood during the first test, perform similarly in the second test. Of the colonies tested 31.5 % (18 out of 57) expressed high HB ( $> 95$  %), while 19.2 % of them (11 out of 57) showed low HB ( $<50$  %). The average level of HB in both tests for the 57 colonies was  $75 \pm 3.24$  % with a range of 19 to 100 %.

Due to the loss of two queens in each group, the comparative analysis between the two groups of colonies regarding honey production and infestation levels of *V. destructor* was done with 16 and 9 colonies of the high and low HB groups, respectively.

No correlation between HB and the number of combs with brood ( $r=0.15$ ,  $n= 57$ ,  $P= 0.47$ ) or between HB and the number of combs covered with bees was found ( $r=0.16$ ,  $n=57$ ,  $P= 0.44$ ). Moreover, no significant difference between the two groups of colonies was detected for the number of combs with brood ( $t=1.58$ ,  $df= 23$ ,  $P= 0.52$ ); colonies with high HB had  $9.31 \pm 0.14$  (mean $\pm$ se) combs with brood, whereas the low HB colonies had  $9.29 \pm 0.23$ . Likewise, the number of combs covered with bees did not differ ( $t= 1.26$ ,  $df= 23$ ,  $P= 0.77$ ) between the colonies with high ( $6.6 \pm 0.05$ ) and low HB

evaluadas (18 de 57) expresaron un CH alto (>95 %), mientras que 19.2 % de ellas (11 de 57) mostraron un CH bajo (<50 %). El promedio general del CH en ambas pruebas realizadas a las 57 colonias fue del  $75 \pm 3.24$  % con un rango de 19 a 100 %.

Debido a la pérdida de dos reinas en cada grupo, el análisis comparativo entre ambos grupos de colonias respecto a la producción de miel y los niveles de infestación de *V. destructor* se realizó con 16 y 9 colonias con CH alto y bajo, respectivamente.

No se encontró correlación entre el nivel de CH y el número de panales con cría ( $r= 0.15$ ,  $n= 57$ ,  $P= 0.47$ ) ni entre el CH y el número de panales cubiertos con abejas ( $r= 0.16$ ,  $n= 57$ ,  $P= 0.44$ ). Tampoco hubo diferencia significativa entre los dos grupos de colonias con respecto al número de panales con cría ( $t= 1.58$ ;  $gl= 23$ ;  $P= 0.52$ ); en las colonias con CH alto se registraron  $9.31 \pm 0.14$  (media  $\pm$  ee) y en las de CH bajo  $9.29 \pm 0.23$  panales con cría. Así mismo, el número de panales cubiertos con abejas no varió ( $t= 1.26$ ;  $gl= 23$ ;  $P= 0.77$ ) entre las colonias con CH alto ( $6.6 \pm 0.05$ ) y CH bajo ( $6 \pm 0.09$ ), lo cual permite relacionar las diferencias de producción de miel con el CH y no con la población de las colonias.

Respecto a la producción de miel, la época del año influyó en su producción, siendo el otoño la época de mayor producción ( $t= 9.51$ ;  $gl= 48$ ;  $P<0.001$ ). Sin embargo, sólo durante la primavera las colonias con CH alto produjeron

( $6 \pm 0.09$ ), which allows relating differences in honey production with HB and not with the bee population of the colonies.

Harvest season influenced honey production, with autumn being the period of greatest production ( $t= 9.51$ ,  $d= 48$ ,  $P<0.001$ ). However, high HB colonies produced significantly more honey than colonies with low HB only during the spring season ( $t= 6.29$ ,  $df= 23$ ,  $P= 0.001$ ). The production values of both groups of colonies for both harvests are shown in Table 1.

The average *V. destructor* infestation rate of colonies with low HB was  $5.3 \pm 0.03$  % (range: 0.0 to 17.2 %), whereas for colonies with high HB it was  $6.7 \pm 0.08$  (range: 0.4 to 31.3 %), and no significant difference for this variable was found between the two groups of colonies before and during harvests (Table 2).

## DISCUSSION

Although considerable variability was found in HB expression levels among the colonies evaluated, similar percentages between the first and second HB tests were observed, evidence that supports the reliability and discriminatory ability of the N<sub>2</sub> freeze-killing test, as reported previously by Espinosa-Montaño *et al*<sup>(43)</sup>.

The percentage of colonies with high HB found in this study was 31.5 %, higher than what has been reported in other countries with EHB. Oldroyd<sup>(23)</sup> reported that 20 % of colonies tested in Australia had high HB, while this

Cuadro 1. Producción de miel promedio (kg  $\pm$  ee) de colonias de abejas melíferas con comportamiento higiénico alto (HHB) y bajo (LHB) durante las cosechas de otoño y primavera en Zacatecas, México

Table 1. Average honey yield (kg  $\pm$  se) of honey bee colonies with high (HHB) and low (LHB) hygienic behavior during autumn and spring harvests in Zacatecas, Mexico

Harvest season	HHB (n=16)	LHB (n=9)	DF	t	P
Autumn	$27.48 \pm 18.9$	$21.42 \pm 16.9$	23	1.61	0.50
Spring	$21.65 \pm 14.9$	$13.45 \pm 6.4$	23	6.95	0.01

significativamente más miel que las colonias con CH bajo ( $t= 6.29$ ,  $gl= 23$ ,  $P= 0.001$ ). Los valores de producción en ambos grupos de colonias durante ambas cosechas se muestran en el Cuadro 1.

El grado de infestación promedio de *V. destructor* en las colonias con bajo CH fue de  $5.3 \pm 0.03$  % (rango: 0.0 a 17.2 %), mientras que el de las colonias con alto CH fue de  $6.7 \pm 0.08$  (rango: 0.4 a 31.3 %), sin encontrarse diferencias significativas para esta variable entre ambos grupos de colonias ni en los meses previos a las cosechas, ni durante éstas (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

No obstante que se encontró una considerable variación en el nivel de expresión del CH entre las colonias evaluadas, se observaron porcentajes de CH similares entre la primera y la segunda evaluación, evidencia que respalda la capacidad discriminatoria y de confiabilidad de la prueba de congelamiento con  $N_2$ , como lo reportaron anteriormente Espinosa-Montaña et al<sup>(43)</sup>.

El porcentaje de colonias con alto CH encontrado en el presente trabajo fue de 31.5 %, superior al registrado en otros países con AE. Oldroyd<sup>(23)</sup>

percentage was only 10 % in another study conducted in the USA<sup>(10)</sup>. Results similar to these (12 %) were found in AHB in Yucatan, Mexico<sup>(44)</sup>. However, it is difficult to know what the representative frequency of colonies with high HB in a population of honey bees is, due to the relatively small sample size ( $n= 57$ ) of this study, and that of the above studies, with which it is compared ( $n < 50$  colonies). Future studies should confirm this indicator more accurately.

Although it has been reported that the expression of HB is partly due to various non-genetic factors, including the strength of colony bee populations<sup>(5,45)</sup>, in this study, the expression of HB was not influenced by this factor, since there were no differences in population between colonies with high and low HB, and there was no correlation between HB levels and the number of combs covered with brood or with adult bees. These results allow a more objective analysis of the association of HB expression levels with honey production and with infestation levels of *V. destructor* in honey bee colonies. It could not be speculated that the difference in degree of expression of HB between the two groups of colonies tested may have been influenced by differences in bee population. Furthermore, all of the colonies were subjected to the same management and to the

Cuadro 2. Número promedio de ácaros de *V. destructor*/100 abejas adultas ( $\pm$  ee) para colonias de abejas melíferas con comportamiento higiénico alto (HHB) y bajo (LHB) 60 días previo a las cosechas de miel de otoño y primavera y durante éstas

Table 2. Average number of *V. destructor* mites/100 adult bees ( $\pm$  se) for honey bee colonies with high (HHB) and low (LHB) hygienic behavior 60 d before and during autumn and spring harvest seasons

Season	HHB* (n=16)	LHB* (n=9)	DF	t	P
Preharvest, autumn	2.69 $\pm$ 0.18	1.90 $\pm$ 0.17	23	0.59	0.55
Autumn harvest	6.79 $\pm$ 0.23	7.79 $\pm$ 0.48	23	0.51	0.61
Preharvest, spring	6.58 $\pm$ 0.27	7.72 $\pm$ 0.41	23	0.86	0.39
Spring harvest	5.27 $\pm$ 0.24	5.75 $\pm$ 0.29	23	0.37	0.71

\*Untransformed values.

t and P values were obtained after square root arcsine transformation of the data.



reportó que el 20 % de colonias evaluadas en Australia, presentaron un CH alto, mientras que este porcentaje fue de sólo 10 % en otro estudio realizado en los EUA<sup>(10)</sup>. Resultados similares a estos (12 %) se encontraron en AA de Yucatán, México<sup>(44)</sup>. Sin embargo, es difícil saber cuál es la frecuencia representativa de colonias con alto CH en una población de abejas, debido al relativamente bajo tamaño de muestra (n= 57) de este estudio y de los estudios arriba mencionados, con los que se le puede comparar (n <50 colonias). Futuros trabajos tendrían que confirmar este indicador con mayor precisión.

Aún cuando se ha reportado que la expresión del CH se debe en parte a diversos factores no genéticos, entre ellos la fortaleza de la población de abejas en las colonias<sup>(5,45)</sup>, en este estudio, la expresión del CH no estuvo influenciada por este factor, ya que no hubieron diferencias en población entre colonias con alto y bajo CH, ni tampoco se encontró correlación entre el nivel de CH y el número de panales cubiertos con cría o con abejas adultas. Este resultado permite un análisis más objetivo de la asociación del nivel de CH con la producción de miel y con el nivel de infestación de *V. destructor* en las colonias de abejas. No se podría especular que la diferencia en grado de expresión del CH entre los grupos de colonias pudo haber sido influido por diferencias en población. Además, todas las colonias estuvieron sometidas al mismo manejo y a los mismos efectos ambientales de apiario. Por ello, las posibles influencias ambientales en la expresión del CH de las colonias experimentales fueron limitadas y puede inferirse que las diferencias observadas entre ambos grupos de colonias se debieron más a efectos genotípicos que a ambientales.

El grupo de colonias de alto CH produjo significativamente más miel (23 % más) que el grupo de colonias con CH bajo durante la cosecha de primavera. Estos resultados coinciden con los reportados en AE por Spivak y Reuter<sup>(24)</sup>, quienes encontraron que las colonias seleccionadas para alto CH, con reinas apareadas naturalmente, produjeron 26 % más

same apiary environmental effects. Thus, the possible environmental influences on HB expression of the experimental colonies were limited, and it can be inferred that the observed differences between the two groups of colonies were due more to genotypic than to environmental effects.

The group of high HB colonies produced significantly more honey (23 %) than the group of colonies with low HB during the spring harvest. These results agree with those reported in EHB by Spivak and Reuter<sup>(24)</sup>, who found that the colonies selected for high HB, with naturally mated queens, produced 26 % more honey than the commercial colonies not selected for this behavior. In another study in which instrumentally inseminated EHB, selected for high and low HB were used, it was also found that the hygienic colonies produced significantly more honey than the non-hygienic ones<sup>(35)</sup>. Moreover, it is well established that HB reduces the manifestation of brood diseases<sup>(26-32,35,46)</sup>. Therefore, the expression of HB may indirectly contribute to obtain greater honey yields, by decreasing disease frequency in bee colonies.

It has been reported that non-hygienic bees can be induced to increase their expression of HB under strong enough environmental stimuli<sup>(22)</sup>. For example, when there is abundant nectar and pollen in the field, the expression of HB also increases, because the need for space to store these products is created in the colony and that also stimulates the queen to lay more eggs in cells that should be clean<sup>(8,9,11,24)</sup>. This agrees with the results of this study, since during the autumn (season with more intense nectar flow than spring) 16.4 % more honey was produced than during the spring, but no differences were found between the two groups of colonies for this variable. Conversely, in the spring, the high HB colonies produced significantly more honey (23 %) than the low HB colonies. These results suggest that high HB may have a greater influence on honey production under conditions where the nectar flow is not very intense.

miel que las colonias comerciales no seleccionadas para este comportamiento. En otro estudio en el que se usaron AE seleccionadas para alto y bajo CH, mantenidas mediante inseminación instrumental, también se encontró que las colonias higiénicas produjeron significativamente más miel que las no higiénicas<sup>(35)</sup>. Además de lo anterior, está bien establecido que el CH reduce la manifestación de enfermedades de la cría<sup>(26-32,35,46)</sup>. Por ello, la expresión del CH puede contribuir indirectamente a la obtención de una mayor producción de miel, al reducir la frecuencia de enfermedades en las colonias.

Se ha reportado que las abejas poco higiénicas pueden ser inducidas a expresar el CH en mayor medida ante un estímulo medioambiental suficientemente fuerte<sup>(22)</sup>. Por ejemplo, cuando hay abundancia de néctar y polen en el campo, se incrementa la expresión del CH de las abejas, debido a que se crea la necesidad de espacio para almacenar estos productos en la colonia y porque ello también estimula a la reina a poner en celdillas que deben estar limpias<sup>(8,9,11,24)</sup>. Lo anterior concuerda con los resultados del presente estudio, ya que durante el otoño (época con flujo más intenso de néctar que en la primavera) se produjo 16.4 % más miel que en la primavera, pero no se encontraron diferencias entre los dos grupos de colonias. Contrario a esto, en la primavera, las colonias con CH alto produjeron significativamente más miel (23 %) que las colonias con CH bajo. Lo anterior sugiere que el CH alto pudiera tener un mayor efecto sobre la producción de miel bajo condiciones donde el flujo de néctar no es muy intenso.

En el presente estudio, no se detectaron diferencias para los niveles de infestación de *V. destructor* entre las colonias con CH alto y bajo. Este resultado abona a la inconsistencia de resultados reportados en la literatura respecto a la influencia del CH sobre el grado de varroosis de las colonias de abejas. A la fecha, resulta difícil afirmar que el CH confiere o no, resistencia a las colonias de abejas contra *V. destructor* de

Under the conditions of this study, no differences in *V. destructor* infestation levels were detected between colonies with high and low HB. This result adds to the inconsistency of results reported in the literature regarding the influence of HB on the degree of varroosis of honeybee colonies. At the present time, it is difficult to say whether or not HB confers resistance to honey bee colonies against *V. destructor* in all cases because as reported in the literature, results of different experiments vary considerably. Even with stock selected during several generations for high HB using instrumental insemination, it has been found that there is variability among colonies for *V. destructor* resistance, which has been attributed to different environmental or methodological conditions in each study<sup>(29,35)</sup>.

Some studies conducted with EHB have concluded that HB is not one of the main mechanisms of resistance against *Varroa*. For example, in an experiment conducted in the USA where colonies were assessed for HB, capped cell period, suppression of *V. destructor* reproduction and grooming behavior of the bees, it was found that the only mechanism of resistance associated with the mite's population growth was the suppression of *Varroa* female reproduction<sup>(47)</sup>; it has also been mentioned that HB is effective against the mite, only when a colony expresses this property at a very high level<sup>(24,35,48)</sup>.

*Varroa* has caused large losses of colonies in temperate and cold climates and has eliminated feral bee populations<sup>(48)</sup>. However, this does not appear to be a serious problem in parts of the world where AHB are present and where low levels of mite infestation and various bee defense mechanisms have been described. Because of this, and based on the results of this study, it can be speculated about the possibility that tolerance mechanisms other than HB are operating against *Varroa* in the semiarid high plateau of Mexico.

Factors contributing to the resistance of bees against *Varroa*, may not be the same for all

acuerdo a lo reportado en la literatura, ya que los resultados de diferentes experimentos varían considerablemente. Aún en trabajos realizados con abejas seleccionadas por varias generaciones para mayor expresión del CH y reproducidas por medio de inseminación instrumental, se ha encontrado variación en la resistencia a *V. destructor* entre colonias con CH alto, lo cual ha sido atribuido a diferentes condiciones ambientales o metodológicas presentes en cada estudio<sup>(29,35)</sup>.

Existen estudios realizados con AE en los cuales se concluye que el CH no es uno de los principales mecanismos de resistencia de las abejas contra *Varroa*. Por ejemplo, en un experimento realizado en los EUA donde se evaluó el CH, el periodo de operculación de las celdas, la supresión de la reproducción de *V. destructor* y el comportamiento de acicalamiento de las abejas, se encontró que el único mecanismo de resistencia relacionado con el crecimiento poblacional del ácaro fue la supresión de la reproducción de las hembras de *Varroa*<sup>(47)</sup>; también se ha mencionado que el CH es efectivo sólo cuando una colonia expresa esta característica a un nivel muy alto<sup>(24,35,48)</sup>.

*Varroa* ha ocasionado grandes pérdidas de colonias en países de clima templado o frío y ha eliminado a la población de colonias silvestres<sup>(48)</sup>. Sin embargo, esto no parece ser un serio problema en lugares del mundo donde existen AA, en donde se reportan bajos niveles de infestación del ácaro y diferentes mecanismos de defensa de las abejas han sido descritos. Por lo anterior y basándonos en los resultados del presente estudio, se puede especular sobre la posibilidad de que otros mecanismos de tolerancia diferentes al CH estén operando frente a *Varroa* en las abejas del altiplano semiárido de México.

Los factores que contribuyen a la resistencia de las abejas a *Varroa*, pueden no ser los mismos en todas las poblaciones de abejas. La baja fertilidad del ácaro se ha considerado como el

bee populations. Low mite fertility has been considered as the main mechanism of tolerance to varroosis in the USA<sup>(47)</sup>; however, in other countries, low brood attractiveness to the mite, grooming behavior and HB show association with low infestation levels of *V. destructor*<sup>(30,49)</sup>. Therefore, some traits that have a strong influence in conferring tolerance against the mite in bee populations of certain regions of the world may not have it in others.

The present study shows the first evidence suggesting a possible influence of high HB on honey production in AHB colonies. If this result is confirmed, the selection of colonies with high HB could be an alternative way to contribute to increase honey yields of honeybee colonies, particularly where blooming plants do not generate intense nectar flows. The HB of worker bees is inherited mainly from the mother, rather than from the father, probably through extra-nuclear inheritance<sup>(15)</sup>, therefore, it would be possible to conduct selective breeding programs by using queen sources without selecting the paternal side, which would be easy to adopt by most queen breeders in Mexico.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Based on the results obtained and under the conditions of this study, it is concluded that 31.5 % of the colonies analyzed expressed high HB (> 95 %) and this trait was not influenced by the strength of the colonies. Additionally, the levels of *V. destructor* infestation on adult bees in colonies with high and low HB did not vary significantly. During spring, the high HB colonies produced significantly more honey than the low HB colonies. These results do not support the conclusion that the HB of bees has a significant influence on their degree of infestation by *V. destructor*, although it may have an effect on honey production under conditions of limited nectar flow.

principal mecanismo de tolerancia a la varroosis en los EUA<sup>(47)</sup>, sin embargo, en otros países, la baja atracción de la cría, el comportamiento de acicalamiento y el CH muestran asociación con niveles bajos de infestación por *V. destructor*<sup>(30,49)</sup>, por lo que algunas características que tienen una fuerte influencia en conferir tolerancia al ácaro en ciertas poblaciones de abejas y regiones del mundo, pueden no tenerla en otras.

El presente estudio muestra la primera evidencia que sugiere una posible influencia del CH alto en la producción de miel en colonias de AA. De confirmarse este resultado, la selección de colonias con CH alto pudiera ser una alternativa para contribuir a la obtención de colonias con mayor producción de miel, particularmente donde las floraciones no generan flujos intensos de néctar. El CH se hereda principalmente a través de la madre, probablemente por herencia extra-nuclear<sup>(15)</sup>, por ello, sería posible llevar a cabo programas de selección vía materna sin necesidad de seleccionar el lado paterno, lo cual sería fácil de adoptar por la mayoría de los criadores de reinas en México.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye que el 31.5 % de las colonias analizadas expresaron CH alto (> 95 %), y esta característica no estuvo influenciada por la fortaleza de las colonias. Además, los niveles de infestación por *V. destructor* en abejas adultas de colonias con CH alto y bajo no variaron significativamente. Durante la primavera, las colonias con CH alto produjeron significativamente más miel que las colonias con CH bajo. Estos resultados no permiten afirmar que el CH tiene una influencia significativa sobre su grado de infestación por *V. destructor*, aunque es posible que tenga efecto sobre la producción de miel bajo condiciones de flujo limitado de néctar.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the government of the State of Zacatecas, for funding granted (project FOMIX: ZAC -2003- C01- 0058).

*End of english version*

---

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Gobierno estatal de Zacatecas, por el financiamiento otorgado (proyecto: FOMIX:ZAC-2003-C01- 0058).

## LITERATURA CITADA

1. Rothenbuhler WC. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease - killed brood. *Anim Behav* 1964;12:578-583.
2. Boecking O, Drescher W. *Apis mellifera* removes *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* from sealed brood cells in the tropics. *Am Bee J* 1992;132(11):732-734.
3. Arathi HS, Ho G, Spivak M. Inefficient task partitioning among nonhygienic honeybees, *Apis mellifera* L., and implications for disease transmission. *Anim Behav* 2006;72:431-438.
4. Harbo JR, Harris JW. Responses to *Varroa* by honey bees with different levels of Varroa Sensitive Hygiene. *J Apic Res Bee World* 2009;48(3):156-161.
5. Spivak M, Gilliam M. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *J Apic Res* 1993;32(3/4):147-157.
6. Arathi HS, Burns I, Spivak M. Ethology of hygienic behavior in the bee *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology* 2000;106:365-379.
7. Arathi HS, Spivak M. Influence of colony genotypic composition on the performance of behaviour in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Anim Behav* 2001;62:57-66.
8. Thompson VC. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. *J Apic Res* 1964;3(1):25-30.
9. Palmquist MJ, Rothenbuhler W. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *J Apic Res* 1971;101:11-21.

PRODUCCIÓN DE MIEL DE ABEJAS AFRICANAS CON ALTO Y BAJO COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO

10. Spivak M, Reuter GS. Honey bee hygienic behavior. *Am Bee J* 1998;138(4):238-286.
11. Janmaat FA, Winston LM. Removal of *Varroa jacobsoni* infested brood in honey bee colonies with differing pollen stores. *Apidologie* 2000;31:377-385.
12. Rothenbuhler WC. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease - killed brood. *Anim Behav* 1964;4:11-123.
13. Moritz RFA. A Reevaluation of the two locus model for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Hered* 1988;79:257-262.
14. Lapidge LK, Oldroyd PB, Spivak M. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften* 2002;89:565-568.
15. Unger P, Guzmán-Novoa E. Maternal Effects on the Hygienic Behavior of Russian x Ontario Hybrid Honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Hered* 2010;101(1):91-96.
16. Oxley PR, Spivak M, Oldroyd BP. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). *Mol Ecol* 2010;19(7):1452-1461.
17. Harbo JR, Harris JW. Heritability in Honey Bees (*Hymenoptera: Apidae*) of Characteristics Associated with Resistance to *Varroa jacobsoni* (*Mesostigmata:Varroidae*). *J Econ Ent* 1999;92(2):261-265.
18. Boecking O, Spivak M. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 1999;30:141-158.
19. Boecking O, Bienefeld K, Drescher W. Heritability of the *Varroa*-specific hygienic behaviour in honey bees (*Hymenoptera Apidae*). *J Anim Breed Genetic* 2000;117:417-424.
20. Stanimirovic Z, Stevanovic J, Mirilovic M, Stojic V. Heritability of hygienic behaviour in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*) *Acta Vet (Beograd)* 2008;58(5-6):593-601.
21. Newton D, Ostasiewski N. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Am Bee J* 1986;126:278-281.
22. Spivak M, Downey DL. Field assays for hygienic behavior in honey bees (*Hymenoptera: Apidae*). *J Econ Entomol* 1998;91:1:64-70.
23. Oldroyd BP. Evaluation of Australian commercial honey bees for hygienic behaviour, a critical character for tolerance to chalkbrood. *Aust J Exp Agric* 1996;36:625-629.
24. Spivak M, Reuter GS. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie* 1998;29:291-302.
25. Palacio MA, Figini EE, Ruffinengo SR, Rodriguez EM, Hoyo ML, Bedascarrasburne EL. Changes in population of *Apis mellifera* L. selected for the hygienic behavior and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* 2000;31:471-478.
26. Gilliam M, Taber S, Richardson VG. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie* 1983;14(1):29-39.
27. Milne CPJr. Honey bee (*Hymenoptera:Apidae*) hygienic behavior and resistance to chalkbrood. *Ann Entomol Soc Am* 1983;76:384-387.
28. Spivak M, Gilliam M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and *Varroa*. Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee World* 1998;79:4:169-186.
29. Spivak M. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 1996;27:245-260.
30. Arechavaleta-Velasco ME, Guzmán-Novoa E. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 2001;32:157-174.
31. Spivak M, Reuter GS. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 2001;32:555-565.
32. Ibrahim A, Reuter GS, Spivak M. Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*. *Apidologie* 2007;38:67-76.
33. Moretto G, Goncalves SL, De Jong D. Africanized bees are more efficient at removing *Varroa jacobsoni*- Preliminary data. *Am Bee J* 1991;131:434.
34. Vandame R, Colin M, Colina OG. Africanized honeybees tolerance to *Varroa* in México: mite infertility is not main tolerance factor. *Apiacta* 1999;34:12-20.
35. Spivak M, Reuter GS. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (*Hymenoptera:Apidae*) colonies selected for hygienic behavior. *J Econ Entomol* 2001;94(2):326-331.
36. INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Municipios de Zacatecas. 2001;234-235.
37. Jay CS. Colour changes in honeybee pupae. *Bee World* 1962;43(4):115-117.
38. Message D, Goncalves LS. Efeito das condicoes climaticas a da colonia no compotamento higienico em abelhas *Apis mellifera* (africanizadas). *Anais do 5º Congresso Brasileiro de Apicultura (Minas Gerais)* 1980:55.
39. Sylvester HA, Rinderer TE. Fast Africanized Bee Identification System (FABIS) Manual. *Am Bee J* 1987;127(7):511-516.
40. Guzmán-Novoa E, Page R. Selective breeding of honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) in africanized areas. *J Econ Entomol* 1999;92:521-525.
41. De Jong D, Roma DA, Goncalves LS. A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. *Apidologie* 1982;13:297-306.
42. SAS. Statistical Analysis System. 2002. version 9.0 , Cary, NC.
43. Espinosa-Montaño LG, Guzmán-Novoa E, Sánchez-Albarrán A, Montaldo HH, Correa-Benítez A. Estudio comparativo de tres pruebas para evaluar el comportamiento higiénico en colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) *Vet Méx* 2008;39(1):39-54.
44. Medina-Flores CA, Medina ML. Frecuencia de colonias altamente higienistas en abejas africanizadas (*Apis mellifera*) de Yucatán. *Seminario Americano de Apicultura; Aguascalientes, México.: Unión Nacional de Apicultores.* 2003:69-72.
45. Najafgholian J, Thahmasbi G, Pakdel A, Nehzati G. Effect of population size on the expression of hygienic behavior in the Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*). *Asiatic J Biotech Res* 2011;2(4):364-373.
46. Spivak M, Gilliam M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and *Varroa*. Part I. Hygienic and resistance to American foulbrood. *Bee World* 1998;79(3):124-134.
47. Harbo JR, Hoopingarner RA. Honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) in the United States that express resistance to

- Varroa jacobsoni* (Mesostigmata:Varroidae). J Econ Entomol 1997;90(4):893-898.
48. Mondragón L, Spivak M, Vandame R. A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. Apidologie 2005;36:345-358.
49. Guzman-Novoa E, Emsen B, Unger P, Espinosa-Montaño LG, Petukhova T. Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). J Invert Pathol 2012;110:314-320.