



## Ascosferosis en abejas melíferas y su relación con factores ambientales en Jalisco, México



José María Tapia-González <sup>a</sup>

Gustavo Alcazar-Oceguera <sup>a</sup>

José Octavio Macías-Macías <sup>a\*</sup>

Francisca Contreras-Escareño <sup>b</sup>

José Carlos Tapia-Rivera <sup>a</sup>

Tatiana Petukhova <sup>a,c</sup>

Ernesto Guzmán-Novoa <sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Universidad de Guadalajara. Centro Universitario del Sur. Departamento de Ciencias Económicas Administrativas y Departamento de Ciencias de la Naturaleza. Centro de Investigaciones en Abejas (CIABE). Av. Enrique Arreola Silva no. 883. CP 49000. Cd. Guzmán, Jalisco. México.

<sup>b</sup> Universidad de Guadalajara. Departamento de Producción Agrícola. Centro de Investigaciones en Abejas (CIABE). Centro Universitario de la Costa Sur. México.

<sup>c</sup> University of Guelph. Department of Population Medicine. Guelph, Ontario, Canada.

<sup>d</sup> University of Guelph. School of Environmental Sciences. Guelph, Ontario, Canada.

\*Autor de correspondencia: joseoc@cusur.udg.mx

### Resumen:

La ascosferosis o cría de cal, es una enfermedad infecciosa de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) causada por el hongo *Ascosphaera apis* que ocasiona la muerte a sus larvas. En casos severos puede

causar disminución de la población de abejas adultas y de productividad de la colonia. Este es el primer estudio que se realiza en México con la finalidad de determinar la prevalencia de *A. apis* en colonias de abejas melíferas en una región apícola. Se llevó a cabo en nueve municipios del sur de Jalisco, distribuidos en dos zonas climáticas (cálida subhúmeda y templada subhúmeda) y se analizó la relación del hongo con factores como altura sobre el nivel del mar, precipitación pluvial y temperatura ambiental. Se tomaron muestras de cría de abejas de 365 colonias, de las cuales, el 74.1 % fueron positivas a ascosferosis mediante análisis microscópico. El 75.6 % de las colonias de la zona cálida y el 72.2 % de la templada resultaron positivas a *A. apis*, respectivamente, y no fueron significativamente diferentes en la prevalencia de este hongo ( $P>0.05$ ). El análisis de regresión logística indicó que al incrementarse la precipitación pluvial también se incrementa significativamente el número de colonias infectadas por *A. apis* (odds= 3.53;  $P<0.01$ ). Hubo una correlación significativa entre precipitación pluvial y proporción de casos positivos a ascosferosis ( $r= 0.87$ ,  $P= 0.003$ ). Los otros factores estudiados no tuvieron relación significativa con casos de ascosferosis. Debido a los altos porcentajes de colonias infectadas con *A. apis* encontrados en este estudio, debieran considerarse investigaciones posteriores para determinar cuáles son las causas de la alta prevalencia de este hongo en colonias de abejas del estado de Jalisco.

**Palabras clave:** *Ascosphaera apis*, *Apis mellifera*, Efectos ambientales, Jalisco.

Recibido: 05/06/2018

Aceptado: 18/04/2019

## Introducción

La ascosferosis o cría de cal es una enfermedad fúngica de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) causada por el hongo *Ascosphaera apis*<sup>(1)</sup>. El hongo que causa la ascosferosis afecta principalmente a larvas, pero también a las pupas de las abejas. Las dos vías principales de contagio son digestivas a través del consumo de alimentos contaminados con esporas del hongo, o éste puede penetrar a través de la cutícula de las crías mediante el tubo germinativo que sale de las esporas. Ambas formas de infección producen micelios que penetran el cuerpo de las larvas, ocasionando su muerte y confiriéndoles la característica de momias<sup>(2)</sup>. Existen factores predisponentes que favorecen la presentación de brotes de ascosferosis, como son el exceso de humedad en el interior de la colmena, bajas temperaturas o el manipular las colonias más de lo necesario<sup>(3)</sup>. Observaciones empíricas sugieren que la ascosferosis se incrementa con el estrés causado por la frecuente transportación de colmenas para polinizar cultivos agrícolas, por la exposición a los pesticidas usados en los sitios

de polinización y por los nuevos patógenos que afectan a las abejas. Todos estos factores deprimen el sistema inmune de la abeja y favorecen el desarrollo de patógenos como *A. apis*<sup>(4)</sup>. La mortalidad por ascosferosis en las crías de las abejas generalmente es baja, pero hay ocasiones en que llega a sobrepasar el 30 %<sup>(5)</sup>. La enfermedad se ha reportado en casi todos los países en el mundo, incluyendo México<sup>(5-9)</sup>. Es importante resaltar que la prevalencia de la ascosferosis en algunos países aumentó considerablemente, al grado que se ha llegado a considerar una amenaza casi tan seria como la infestación del acaro *Varroa destructor*<sup>(10)</sup>. La ascosferosis en México ha sido poco estudiada y no se le ha dado la importancia que requiere. Sin embargo, Medina y Mejía<sup>(11)</sup> en Yucatán, encontraron que la ascosferosis está asociada al colapso de colonias. Fuera de estudios aislados como el realizado en Yucatán, puede decirse que no hay datos para saber qué tan prevalente y generalizada está la ascosferosis en México, ya que nunca se ha llevado a cabo un estudio epizootiológico para determinar su prevalencia en el país o en algún estado del país. Además, no se conoce cuál es la situación de la ascosferosis y las relaciones que puede tener con variables geográficas y climáticas en apiarios de México, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de la enfermedad en colonias de abejas melíferas y determinar su relación con variables geográficas y climáticas en los municipios de la región sur-sureste del estado de Jalisco, México.

## Material y métodos

El trabajo se realizó en nueve municipios ubicados en dos zonas climáticas consideradas templada y cálida (climas templado subhúmedo y cálido subhúmedo, respectivamente) con el fin de determinar la prevalencia de *A. apis* y si existe una relación entre el clima y prevalencia del hongo en colonias de abejas melíferas. Los municipios se ubican en el occidente de México (19° 24', 21° 14' N; 101° 59', 104° 5' O). Los municipios de Gómez Farías, Zapotlán el Grande, Tapalpa y Unión de Guadalupe, tienen clima templado sub-húmedo y los municipios de Tecalitlán, Tamazula, Zacoalco de Torres, Sayula, y Cocula, presentan clima cálido subhúmedo<sup>(12)</sup>. Los municipios con clima cálido subhúmedo tienen una temperatura media anual de 21 °C. Este clima no presenta cambio térmico invernal bien definido<sup>(13)</sup>. El régimen de lluvias se registra de junio a septiembre, con una precipitación promedio de 801 mm y la altitud promedio es de 1,495 msnm<sup>(12)</sup>. Los municipios con clima templado subhúmedo presentan un cambio térmico invernal bien definido; la temperatura media anual es de 14.4 °C y la precipitación media anual de 1,117 mm; la altitud promedio es de 1,711 msnm<sup>(13)</sup>. En las dos zonas geográficas se tomaron al azar entre marzo y mayo, muestras de 365 colonias de abejas melíferas ubicadas en 145 apiarios. El tamaño de la muestra se calculó con base de 4,950 colmenas de las regiones seleccionadas del estado de Jalisco. De ellas se tomaron para su análisis 365 colmenas (13.56 %). Este cálculo se realizó con la fórmula de estudios transversales y se utilizó un muestreo aleatorio estratificado desproporcionado a un nivel de confianza del 95% y poder estadístico del 80 %. El resultado fue 21 muestras por municipio

incluyendo 15 % por pérdidas, para un total de 160 colmenas. Sin embargo, se decidió tomar un total de 365 colmenas para tener una mayor precisión en el análisis (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Número de apiarios y colonias muestreadas para diagnóstico de *Ascosphaera apis* por municipio y zona climática, en el sur de Jalisco

Municipio	Apiarios	Colonias	Zona climática
Cocula	17	41	Cálida subhúmeda
Sayula	21	52	Cálida subhúmeda
Tamazula	36	93	Cálida subhúmeda
Tecalitlán	21	54	Cálida subhúmeda
Zacoalco de Torres	14	39	Cálida subhúmeda
Gómez Farías	6	15	Templada subhúmeda
Tapalpa	12	37	Templada subhúmeda
Unión de Guadalupe	8	20	Templada subhúmeda
Zapotlán el Grande	10	14	Templada subhúmeda
Total	145	365	

Se obtuvieron muestras de panal de los bastidores centrales de la cámara de cría donde se encontraba cría sin opercular de las abejas y en algunos casos se observaron signos de ascosferosis (momificación de las crías). Se cortó un trozo de panal de 10 x 10 cm de cada colonia evaluada, que fueron envueltos en hojas de papel y mantenidos en cajas de cartón para ser transportadas al laboratorio donde fue realizado el diagnóstico. De cada apiario se registró la siguiente información: altitud (msnm), con un GPS (Sportrack-color, Magellan, USA), mientras que los datos de la temperatura ambiental (°C) y precipitación pluvial (mm), se tomaron de los registros de la Comisión Nacional del Agua para cada municipio<sup>(14)</sup>.

Las crías contenidas en las muestras de panales se procesaron en el Laboratorio de Microbiología del Centro Universitario del Sur (CUSur) de la Universidad de Guadalajara, en donde se utilizó la técnica de azul de lactofenol para el diagnóstico de hongos. Los portaobjetos utilizados se limpiaron con solución de éter etílico y una vez secos, se les agregó una gota de solución salina fisiológica, donde se colocó un pequeño trozo de una larva sospechosa de ascosferosis. La muestra larvaria se expandió con un palillo, hasta que ésta absorbió la gota de agua, después se depositó sobre la muestra de la larva una gota de azul de lactofenol y se cubrió con un cubreobjetos. Posteriormente, se buscaron micelios y esporocistos de *A. apis* bajo el objetivo seco débil de un microscopio (40 X). La presencia de *A. apis* se determinó con base en el hallazgo de esporocistos típicos del hongo en las muestras analizadas<sup>(15)</sup> y se calculó el porcentaje de colmenas con ascosferosis para cada uno de los municipios.

En el análisis estadístico, la variable de respuesta fue el número de colonias de abejas infectadas con el hongo *A. apis* entre diferentes municipios. Los predictores (variables explicativas) incluidos en el análisis fueron: temperatura ambiental, precipitación pluvial y altura sobre el nivel del mar. Para reducir problemas de multicolinealidad, las variables explicativas fueron estandarizadas. El análisis estadístico se efectuó empleando las siguientes técnicas. Las proporciones de colonias infectadas entre municipios y entre zonas fueron comparadas utilizando la prueba de Ji-cuadrada con ajuste de Bonferroni para identificar diferencias significativas. Con el propósito de identificar factores asociados con la infección del hongo, se llevó a cabo un análisis de regresión logística múltiple siguiendo los criterios de Hosmer y Lemeshow<sup>(16)</sup>; este análisis permitió obtener el radio de probabilidad de encontrar colonias positivas a ascosferosis (*odds*) y su correspondiente intervalo de confianza (IC) al 95%. También se hizo una correlación de Pearson entre la proporción de casos positivos a ascosferosis y los factores. Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete R versión 3.3.2<sup>(17)</sup>.

## Resultados

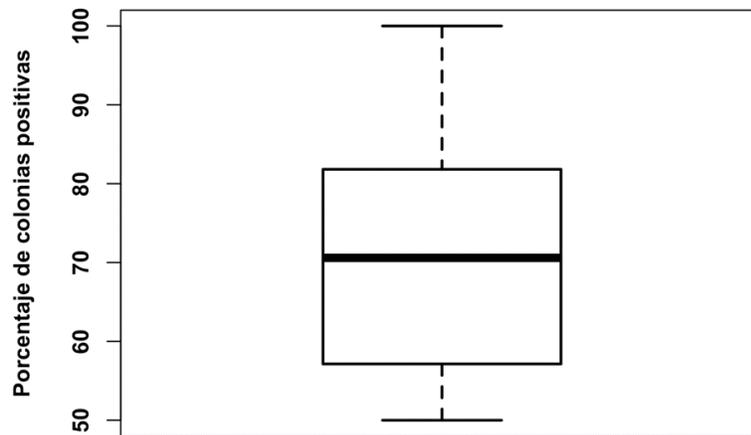
De 365 muestras evaluadas, el 74.1 % resultaron positivas a *A. apis*. Los municipios con porcentajes más altos de muestras positivas fueron Gómez Farías y Zacoalco de Torres, con 93.3 y 92.3 %, respectivamente, mientras que los que tuvieron porcentajes más bajos, fueron Zapotlán el Grande, Unión de Guadalupe y Tecalitlán, con 57.1, 60.0 y 61.1 %, respectivamente (Cuadro 2).

**Cuadro 2:** Porcentajes promedio de colonias de abejas melíferas positivas a *Ascosphaera apis* en nueve municipios de dos zonas climáticas del sur de Jalisco

Municipio	Porcentaje promedio	Zona climática
Cocula	82.93	Cálida subhúmeda
Sayula	73.08	Cálida subhúmeda
Zacoalco	92.31	Cálida subhúmeda
Tamazula	68.82	Cálida subhúmeda
Tecalitlán	61.11	Cálida subhúmeda
Tapalpa	78.38	Templada subhúmeda
Gómez Farías	93.33	Templada subhúmeda
Unión de Gpe.	60.00	Templada subhúmeda
Zapotlán el Grande	57.14	Templada subhúmeda
Total	74.10	

Se encontraron apiarios con el 100 % de colonias positivas a *A. apis* en los municipios de Gómez Farías, Cocula, Sayula, Tamazula, Tapalpa, Tecalitlán, Zapotlán el Grande y Zacoalco de Torres, pero en Unión de Guadalupe, el porcentaje de colonias positivas más alto en un apiario fue de 60 %. La distribución del porcentaje de colonias infectadas entre los nueve municipios fue examinada por medio de un diagrama de cajas (Figura 1). La figura muestra que la mediana del porcentaje de colonias infectadas fue de 71 %. Considerando todas las colonias muestreadas, la mitad de ellas tuvo valores de prevalencia de ascosferosis de entre 57 y 82 %.

**Figura 1:** Diagrama de caja representando la distribución del porcentaje de colonias de abejas positivas a la infección por el hongo *Ascosphaera apis*



Los valores mostrados incluyen el porcentaje mínimo, el máximo, cuartil 1 (25% de los datos), media (50% de los datos), cuartil 3 (75% de los datos) y el rango entre cuartiles.

En total se realizaron 36 comparaciones de las proporciones de colonias de abejas infectadas con *A. apis* entre los nueve municipios. Al ajustarse el área crítica para comparaciones múltiples, las diferencias entre proporciones no fueron significativas ( $P > 0.05$ ). En cuanto a zonas, los resultados indican que la prevalencia de ascosferosis entre la zona cálida (75.6 %) y la templada (72.2 %) no fue significativamente diferente ( $\chi^2 = 0.86$ ,  $n = 209$ ,  $P = 0.35$ ). Los resultados del análisis de regresión logística se presentan en el Cuadro 3. La ecuación del modelo completo (el modelo incluyendo todos los predictores) de regresión logística fue la siguiente:

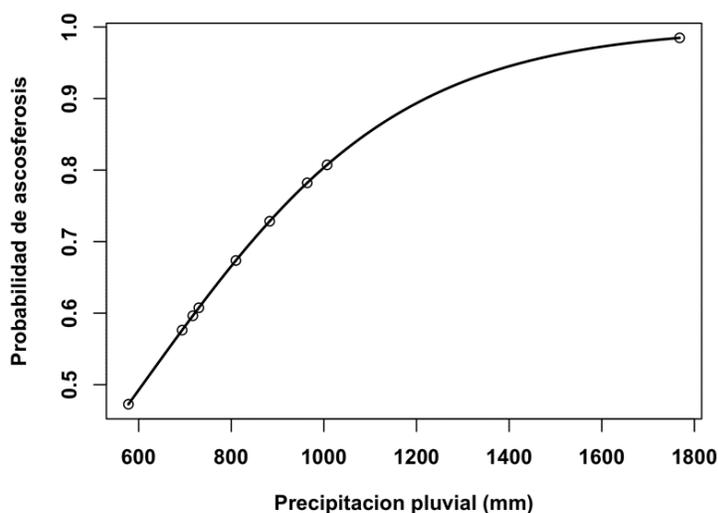
$$\log \text{odds} = 1.04141 - 0.03434 \text{ Temperatura} + 1.2188 \text{ Precipitación pluvial} \\ - 0.02706 \text{ Altura sobre el nivel del mar}$$

**Cuadro 3:** Predictores de la infección de colonias de abejas melíferas con el hongo *Ascosphaera apis* del análisis de regresión logística (modelo completo)

Variables	Probabilidad (Odds )	IC 95%	<i>p</i>
Temperatura	*0.97	(0.69 - 1.37)	0.84
Precipitación pluvial	*3.38	(1.73 - 7.48)	<0.01
Altura sobre el nivel del mar	*0.97	(0.64 - 1.50)	0.89

\*Colonias de *Ascosphaera apis*.

Este análisis indicó que la precipitación pluvial se asoció significativamente a la infección de colonias con el hongo. Al incrementarse la precipitación pluvial también se incrementó significativamente el número de colonias infectadas por *A. apis* (odds = 3.53;  $P < 0.01$ ; Figura 2). Asimismo, se encontró una correlación significativa entre precipitación pluvial y proporción de casos positivos a ascosferosis ( $r = 0.87$ ,  $n = 9$ ,  $P = 0.003$ ). Los otros factores estudiados no tuvieron relación significativa con casos de ascosferosis.

**Figura 2:** Relación entre precipitación pluvial y proporción de casos positivos a la infección por el hongo *Ascosphaera apis* en nueve municipios evaluados en Jalisco, México

## Discusión

Este es el primer estudio que se realiza en México con la finalidad de determinar la prevalencia de *A. apis* en colonias de abejas melíferas en varias regiones apícolas de un estado. En un trabajo similar realizado en la región semidesértica de los Altos de Jalisco, México, durante los meses de

julio a octubre (época de lluvias), en el que se monitorearon 42 colonias distribuidas a lo largo de solo 12 km dentro de esta región, se encontró un 67.1 % de muestras positivas a *A. apis*<sup>(18)</sup>. El estudio de la región semidesértica de los Altos de Jalisco representa una muestra muy pequeña (42 colonias) de un área restringida del estado de Jalisco a diferencia de este estudio que incluyó 365 colonias en las dos regiones más productoras de miel del estado de Jalisco. Sin embargo, es importante observar que aun cuando el estudio de los Altos de Jalisco fue llevado a cabo en época de lluvias, el porcentaje de muestras positivas fue similar al encontrado en este trabajo realizado en época de sequía (74.1 %). Lo anterior refuerza la hipótesis de que la prevalencia de ascosferosis en colonias de abejas del estado de Jalisco es alta en diferentes épocas del año. La temperatura ambiental influye en la temperatura y humedad de la colonia, pero las abejas crean su propio microclima interno de humedad y temperatura<sup>(19)</sup>, por lo que es difícil determinar cómo afecta el clima medioambiental externo en épocas de lluvia y sequía. Sin embargo, otras investigaciones mencionan que una reducción de 35 °C a 30 °C en la temperatura interna de la colonia aumenta la prevalencia de *A. apis*<sup>(20)</sup>.

Con respecto a la humedad, otros estudios concuerdan con lo encontrado en este trabajo en cuanto a que la precipitación pluvial está relacionada con una alta prevalencia de ascosferosis. Por ejemplo, en una investigación reciente se determinó que humedades relativas de 85 a 90 %, así como temperaturas internas de 25 a 30 °C en colonias de *A. mellifera* favorecen la presencia y proliferación de esporas de *A. apis*<sup>(21)</sup>. En cambio, colonias que mantienen caliente (> 35 °C) y relativamente seco el nido de cría, limitan significativamente la infección por *A. apis*. También Bamford y Heath<sup>(22)</sup> determinaron que la temperatura y la humedad interna del nido de cría son factores predisponentes para la presencia de *A. apis* en la colonia. Estos autores evaluaron el enfriamiento de la colonia a 25 °C, lo que resultó en un 95 % de momias de cría de cal, mientras que con 30 °C, la momificación disminuyó a 43 %, y con 35 °C, bajó a 29 %. En relación a la humedad relativa, cuando esta superó el 87 % a una temperatura de 30 °C, la momificación aumentó en 7.75 % en relación a solo el efecto de la temperatura a 30 °C. De la misma forma, a 68 % de humedad y 30 °C, las momificaciones de larvas de la colonia solo aumentaron en 0.95 %.

Claramente, bajas temperaturas y humedad elevada, favorecen la presencia de ascosferosis. Otros investigadores han encontrado que otros factores contribuyen a la transmisión y desarrollo de la enfermedad de la cría de cal en las colonias de abejas, como por ejemplo la cera estampada y el polen<sup>(5,23)</sup>. También, una disminución en la proporción de abejas adultas con relación a crías contribuye a la prevalencia de la enfermedad<sup>(24)</sup>. Quizá algunos de estos factores estén contribuyendo a la alta prevalencia de ascosferosis en Jalisco. Sin embargo, solo futuros estudios podrán determinar si estos u otros factores son responsables de esta alta prevalencia de la enfermedad.

## Conclusiones e implicaciones

Se encontró un 74.1 % de muestras positivas a *A. apis* de 365 muestras evaluadas, lo que constituye una elevada prevalencia del hongo en colonias de abejas del sur de Jalisco. La prevalencia de *A. apis* fue particularmente alta en algunos municipios, donde el promedio de muestras positivas alcanzó más del 90 % y no hubo diferencias en prevalencia entre zonas. El factor climático que tuvo una asociación significativa con la presencia de *A. apis* y que muy probablemente influyó en una mayor presencia del hongo en las colonias de abejas, fue la precipitación pluvial. La altitud y la temperatura ambiental no tuvieron efectos significativos sobre la prevalencia de *A. apis* en este estudio. Debido a los altos porcentajes de presencia de *A. apis* en las colonias evaluadas, deben considerarse estudios posteriores para determinar cuáles son las causas (además de la precipitación pluvial), de la alta prevalencia de *A. apis* en colonias de abejas del sur de Jalisco.

## Agradecimientos y conflictos de interés

Se agradece a las asociaciones de apicultores de la Federación Mexicana de Apicultores, Delegación Jalisco, por las facilidades otorgadas en la realización de este trabajo. En este trabajo ningún investigador participante manifiesta algún conflicto de interés.

## Literatura citada:

1. Spiltoir CF, Olive LS. A re-classification of the genus *Pericystis* Betts. *Mycologia* 1955;(147):238-44.
2. Albo GN, Reynaldi FJ. *Ascosphaera apis*, agente etiológico de la cría yesificada de las abejas. *Rev Argent Microbiol* 2010;(42):80-80.
3. Heath LAF. Development of chalk brood in a honeybee colony: a review. *Bee World* 1982;(63):119-130.
4. Aronstein KA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol* 2010;(103):S20-S29.
5. Correa-Benítez A. Enfermedades micóticas y virales de la cría. En: Guzmán-Novoa E, Correa-Benítez A, editores. *Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas*. México: Editorial Yire; 2015:37-48.

6. Hitchcock J, Christensen M. Occurrence of chalk brood (*Ascosphaera apis*) in honey bees in the United States. *Mycologia* 1972;(64):1193-1198.
7. Wilson WT, Nunamaker RA, Maki D. The occurrence of brood diseases and the absence of the Varroa mite in honey bees from Mexico (*Apis mellifera*, *Varroa jacobsoni*). *Am Bee J* 1984;(124):51-53.
8. Palacio MA, Rodriguez E, Goncalves L, Bedascarrasbure E, Spivak M. Hygienic behaviours of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. *Apidologie* 2010;41(6):602-612.
9. Invernizzi C, Rivas F, Bettucci L. Resistance to chalkbrood disease in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies with different hygienic behaviour. *Neotrop Entomol* 2011;40(1):28-34.
10. Gilliam M, Vandenberg DJ. Fungi. In: Morse RA, Flottum K editors. Honey bee pests, predators and diseases. Medina, Ohio USA: A.I. Root Co; 1997:79-116.
11. Medina ML, Mejia EV. The presence of *Varroa jacobsoni* mite and *Ascosphaera apis* fungi in collapsing and normal honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Yucatán, Mexico. *Am Bee J* 1999;139(10):794-796.
12. INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Gobierno del estado de Jalisco, Sayula Jalisco. 2013. <http://www.jalisco.gob.mx/es/Jalisco/municipios>. Consultado 25 Ene, 2018.
13. INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Cuéntame de México. 2015. <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/jal/territorio/clima.aspx?tema=me>. Consultado 30 Ene, 2018.
14. CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. México. 2015. <http://www.conagua.gob.mx/>. 2015. Consultado 21 Feb, 2018.
15. Guzmán-Novoa E, Zozaya-Rubio JA, Anguiano-Báez JR, Vázquez-Valencia I. Técnicas de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades y parásitos de las abejas. En: Guzmán-Novoa E, Correa-Benítez A editores. Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas. México: Editorial Yire; 2015:141-166.
16. Hosmer DW, Lemeshow S. Special topics. Applied Logistic Regression. Second ed. USA: John Wiley & Sons; 2005.
17. R Core, Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2013.

18. Álvarez-Ramírez AL, Jiménez-González E, Ortiz-Muñoz E, Ruíz-García I, Orozco-Hernández R. Influencia de las condiciones ambientales en la presentación de Ascosferosis (*Ascospaera apis*) o cría de cal en *Apis mellifera* (abeja). *Aba Vet* 2017;7(3):37-46.
19. Mizue O, Hidetoshi I, Toshifumi K, Tadaaki A, Ryuichi O, Etsuro I. Control of hive environment by honeybee (*Apis mellifera*) in Japan. 6th Int Conf on Methods and Techniques in Behavioral Res. The Netherlands. 2009;41:782-786.
20. Vojvodic SA, Jensen AB, Markussen B, Eilenberg J, Boomsma JJ. Genetic variation in virulence among chalkbrood strains infecting honey bees. *PLoS one* 2011;6(9):e25035.
21. Yoder JA, Nelson BW, Main RL, Lorenz AL, Jajack AJ, Aronstein KA. Water activity of the bee fungal pathogen *Ascospaera apis* in relation to colony conditions. *Apidologie* 2017;48(2):159-167.
22. Bamford S, Heath LAF. The effects of temperature and pH on the germination of spores of the chalkbrood fungus, *Ascospaera apis*. *J Apic Res* 1989;28(1):36-40.
23. Flores JM, Spivak M, Gutiérrez I. Spores of *Ascospaera apis* contained in wax foundation can infect honey bee brood. *Vet Microbiol* 2005;108(1-2):141-144.
24. Koenig JP, Boush GM, Erickson EH. Effects of spore introduction and ratio of adult bees to brood on chalkbrood disease in honeybee colonies. *J Apic Res* 2015;26(3):191-195.