

Efecto del comportamiento higiénico sobre la resistencia a la cría calcárea (*Ascospaera apis*) en colonias de abejas africanizadas (*Apis mellifera*)

Carlos Aurelio Medina-Flores ^{a*}

Luis Abdelmir Medina Medina ^b

Ernesto Guzmán-Novoa ^c

^a Universidad Autónoma de Zacatecas. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Zacatecas, México.

^b Universidad Autónoma de Yucatán. Departamento de Apicultura, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Carretera Mérida-Xmatkuil Km. 15.5, Mérida, Yucatán, Mexico.

^cSchool of Environmental Sciences, University of Guelph, Guelph, Canada.

* Autor de correspondencia: carlosmedina@uaz.edu.mx

Resumen:

El objetivo fue evaluar el comportamiento higiénico (CH) de abejas melíferas (*Apis mellifera*) africanizadas y su impacto en la resistencia a la ascosferosis causada por *Ascospaera apis*. Se evaluó el CH y la población de abejas adultas y de cría de 50 colonias. Además, colonias con alto ($\geq 95\%$) y bajo ($< 50\%$) CH fueron inoculadas con *A. apis* y en ellas se determinó el número de crías con signos de ascosferosis (momias) durante 17 días, datos que se correlacionaron con su grado de CH. También se evaluó la susceptibilidad a *A. apis* de larvas de colonias con alto y bajo CH en un medio ambiente común, para separar efectos ambientales de genotípicos. El grado de CH entre colonias varió significativamente ($CV > 36\%$), con 20 % de las colonias mostrando alto CH ($\geq 95\%$) y éste no se correlacionó con la población de abejas adultas y cría. Las colonias con alto CH tuvieron un número significativamente menor de momias que las colonias con bajo CH y hubo una correlación negativa entre el CH y el número de momias ($r = -0.63$, $P = 0.02$). Además, las larvas de

colonias con alto o bajo CH fueron igualmente susceptibles al hongo. Estos resultados sugieren que el CH y la susceptibilidad de las larvas no están asociados y que el principal mecanismo de protección contra *A. apis* en poblaciones de abejas africanizadas es el CH. Por ello, la selección de colonias con alto comportamiento higiénico podría contribuir a mejorar la salud y productividad de las abejas melíferas.

Palabras clave: *Apis mellifera*, *Ascosphaera apis*, Cría calcárea, Comportamiento higiénico, Susceptibilidad de larvas, Abejas africanizadas, Yucatán.

Recibido: 18/12/2020

Aceptado: 29/04/2021

Introducción

La cría calcárea, ascosferosis o cría de cal, es una enfermedad ocasionada por el hongo *Ascosphaera apis*, que al reproducirse y esporular en las larvas de abejas melíferas (*Apis mellifera*) provoca su momificación (momias blancas y negras), reduce el tamaño poblacional de sus colonias, y en algunas regiones puede provocar pérdidas elevadas de la producción de miel^(1,2).

Ante la presencia de *A. apis* y otros problemas sanitarios de las crías, las abejas melíferas pueden responder con mecanismos de resistencia conductuales y fisiológicos^(3,4). Un importante mecanismo conductual es el comportamiento higiénico (CH), que consiste en la capacidad de las obreras de detectar, desopercular y remover del interior de las celdas a la cría que se encuentra enferma o muerta^(5,6). La evaluación del nivel de CH de una colonia de abejas se basa en sacrificar crías dentro de celdas operculadas por punción⁽⁷⁾ o congelamiento⁽⁸⁾ y determinar el porcentaje de remoción en un periodo corto de tiempo por parte de las obreras. Se ha reportado que las colonias con muy alto CH (≥ 95 % de remoción de la cría muerta en 24 a 48 h) muestran cierto grado de resistencia a la cría calcárea^(9,10) y loque americana⁽¹¹⁻¹³⁾, y existen algunas evidencias de resistencia de colonias altamente higiénicas contra el ácaro parasitario *Varroa destructor*⁽¹⁴⁾ y el virus de las alas deformes⁽¹⁵⁾. También se ha argumentado que mecanismos fisiológicos asociados a la inmunidad celular y humoral de las abejas pudieran conferirles resistencia contra la ascosferosis⁽⁴⁾. Por lo anterior, no es claro cual es la contribución e importancia relativa del CH a la resistencia de las abejas contra la cría calcárea, particularmente en poblaciones de abejas africanizadas.

Se ha reportado que el CH brinda protección contra el hongo *A. apis* en colonias de abejas africanizadas cruzadas con europeas de Sudamérica⁽¹⁰⁾. Sin embargo, se desconoce si esto

también sucede en poblaciones de abejas africanizadas en otros países. Además, la relación entre la expresión del CH y la susceptibilidad de la cría en abejas africanizadas infectadas con el hongo *A. apis* no ha sido estudiada. Generar dicha información sería de gran utilidad para diseñar estrategias de control contra la enfermedad, como por ejemplo, establecer programas de crianza selectiva.

En México en particular, se sabe que en ciertas regiones la prevalencia de cría calcárea puede rebasar el 50 %, sobre todo en zonas húmedas⁽¹⁶⁾, y que esta enfermedad puede interactuar con otras y hacer colapsar las colonias de abejas⁽¹⁷⁾. Además, en México no se han estudiado las relaciones del CH con la ascosferosis y la susceptibilidad de larvas de abejas africanizadas al hongo.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el grado de CH de colonias de abejas africanizadas y su impacto en la resistencia y susceptibilidad de estos insectos a la cría calcárea.

Material y métodos

Lugar de estudio

Este estudio fue llevado a cabo en apiarios experimentales del Departamento de Apicultura del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán, en Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México (20° 52' 3.00" N, 89° 37' 29.15" O). Esta región presenta un clima cálido-subhúmedo con lluvias en verano (Awo), con precipitación pluvial anual de 985 mm, temperatura anual de 26.8 °C y humedad relativa anual de 78 %⁽¹⁸⁾.

Comportamiento higiénico y población de abejas

Los estudios se llevaron a cabo en 50 colonias de abejas comerciales a las que se realizó un análisis morfométrico con el propósito de confirmar que eran africanizadas⁽¹⁹⁾. Las colonias se encontraban alojadas en colmenas tipo Langstroth, distribuidas en cinco apiarios y tenían diferentes condiciones poblacionales y de reservas de alimento, pero sin signos clínicos de enfermedades. Las poblaciones de abejas de las colonias se determinaron tanto para el área de cría operculada como para la cantidad de abejas adultas. Para determinar el área de cría de cada colonia, dos operadores estimaron el porcentaje de la superficie de ambos lados de cada panal ocupada por cría operculada. La superficie porcentual de las áreas de cría se convirtió a cm², considerando el área que tiene un panal tipo Langstroth en ambos lados (1,760 cm²). Además, se registró el número de panales cubiertos con abejas y se multiplicó por el número de abejas que ocupan un panal Langstroth en la cámara de cría por ambos lados (2,430 abejas)⁽²⁰⁾. Las mediciones se realizaron por las tardes (> 1700 h) cuando la

mayoría de las abejas se encontraban en el interior de las colmenas y en todas las mediciones participaron los mismos operadores.

El CH de las colonias se evaluó en dos ocasiones. Las dos evaluaciones se realizaron durante el mes de julio cuando no existen floraciones importantes en el área y se hicieron con un intervalo de 14 días. Para estimar el nivel de CH de cada colonia, se seleccionó un panal con cría operculada con pupas de 3 a 4 días de edad, identificadas por el cuerpo de color blanco y ojos color púrpura⁽²¹⁾, la etapa más adecuada para determinar el CH⁽²²⁾. Se colocó un cilindro de lámina galvanizada (8 cm diámetro x 10 cm altura) sobre un área compacta de cría operculada y se vertieron 300 ml de N₂ líquido para sacrificar por congelamiento a las pupas en el interior de las celdas. Al evaporarse el N₂ se removió el cilindro y se fotografiaron las áreas congeladas y el panal se introdujo nuevamente en la colonia que estaba siendo evaluada. Los panales con la cría sacrificada de las colonias experimentales se inspeccionaron 48 h después del anterior procedimiento y las áreas congeladas fueron fotografiadas nuevamente para registrar el número de pupas muertas que fueron removidas, y así poder determinar el porcentaje de remoción de la cría muerta. Las evaluaciones se realizaron 48 h posteriores al congelamiento debido a que es tiempo suficiente para limitar la reproducción y propagación de un agente infeccioso, lo que es menos estricto que a las 24 h y permite identificar la expresión del CH en colonias no seleccionadas para esta característica y apareadas naturalmente. Las colonias que en las dos pruebas desopercularon y removieron el 95 % de la cría congelada o más, fueron clasificadas como altamente higiénicas (alto CH) mientras que las colonias que removieron 50 % o menos de la cría congelada fueron consideradas como de bajo CH^(8,12). Posteriormente, se seleccionaron 10 colonias que presentaron un alto CH y 10 colonias que presentaron un bajo CH con la finalidad de evaluar su resistencia relativa a la ascosferosis.

Efecto del comportamiento higiénico sobre la ascosferosis

Las 20 colonias con alto y bajo CH seleccionadas del experimento anterior fueron reubicadas en un apiario aislado y sus reinas fueron marcadas con tinta indeleble en el tórax para su identificación. Las poblaciones de abejas de ambos grupos de colonias fueron homogenizadas tomando como base a la colonia que contaba con menor cantidad de abejas, área de cría, reservas de miel y polen. Por ello, al inicio del experimento las 20 colonias tenían aproximadamente la misma cantidad de panales cubiertos con abejas adultas (8), cría operculada (3), cría abierta (2), miel (2) y polen (1). Adicionalmente, se corroboró que ninguna colonia seleccionada presentara signos clínicos de cría calcárea (momias presentes en los panales, piso, o piquera).

Para obtener el hongo *A. apis*, inicialmente se identificaron momias negras (hongo esporulado) de colonias ajenas al experimento. Este signo clínico es patognomónico de la

ascosferosis por lo que existe la certeza de obtener el hongo a partir de dichas momias. Adicionalmente, se observaron al microscopio los esporocistos del hongo en muestras de momias⁽²³⁾. Para inducir la infección de *A. apis* en cría de las colonias experimentales se siguió el protocolo de Flores *et al*⁽²⁴⁾. Se maceraron tres momias por mililitro de agua destilada. Cada una de las 20 colonias experimentales se inoculó con 6 ml del macerado diluido en 120 ml de jarabe de sacarosa (1:1), que fue suministrado a cada colonia por medio de alimentadores tipo Boardman. Además, dos panales conteniendo larvas jóvenes (cría abierta) en al menos 80 % de su superficie, así como las abejas presentes en esos panales, se asperjaron con 6 ml del mismo macerado diluido en 14 ml de jarabe de sacarosa (1:1), suministrando 5 ml del inóculo por cada lado de cada panal. Las colonias se revisaron para registrar el número de momias blancas y negras presentes en las celdas de los panales en los días 3, 5, 7, 9, 12 y 17, post-exposición⁽²⁵⁾.

Susceptibilidad de larvas de colonias de alto y bajo CH a la ascosferosis

Con la finalidad de evaluar si las diferencias en número de momias en los panales entre colonias con alto y bajo CH del experimento anterior se debió en alguna medida a diferencias en la susceptibilidad de sus larvas al hongo *A. apis*, se utilizaron larvas de cinco colonias de cada tipo seleccionadas al azar para inocularlas y permitir su desarrollo en un medio ambiente común. De cada colonia se cortó con un cuchillo, una sección de panal (7 x 7 cm) conteniendo un promedio de 264 ± 3.4 larvas de 3 a 4 días de edad. Inmediatamente después se armaron bastidores, cada uno conteniendo una sección procedente de una colonia con alto CH y otra de una colonia con bajo CH, estas secciones y cinco colonias receptoras que tenían un bajo CH, fueron inoculadas con el hongo *A. apis* como se describió antes. Cada panal ensamblado de esta manera se colocó en el centro de la cámara de cría de una colonia receptora con la finalidad de dar a las larvas el mismo ambiente de nido, y que la probabilidad de ser removidas por el CH de las abejas de las colonias receptoras fuera similar para ambos tipos de larvas. Hacer cohabitar larvas y abejas en el mismo nido de cría se ha usado exitosamente en el pasado para separar efectos ambientales de genotípicos en estudios de diversos comportamientos de las abejas, incluyendo el CH⁽²⁶⁻²⁹⁾. Se registró el número de momias de cría calcárea en las secciones de panal los días 5, 9 y 13, post-exposición del hongo.

Análisis estadísticos

Se obtuvieron medidas de tendencia central y de dispersión para los datos de las evaluaciones de CH y de las condiciones poblacionales de las 50 colonias. También se realizaron pruebas de correlación de Pearson entre los datos de la primera y segunda prueba del CH, así como entre los del CH y los de la población de abejas, las áreas de cría y el número de momias registradas en los panales. El porcentaje de CH, las áreas de cría y la población de abejas de las colonias con alto y bajo CH que se seleccionaron para las pruebas del efecto del CH sobre

la cría calcárea, así como la proporción de larvas clínicamente afectadas por la ascosferosis de los dos tipos de colonias que se usaron en el experimento de susceptibilidad, se analizaron con pruebas t de Student. El número de momias de las colonias con alto y bajo CH y el efecto del tiempo en esta variable se analizaron por medio de varianza de medidas repetidas y de pruebas de comparación de medias de Newman-Keuls. Antes de los análisis, los valores porcentuales del CH y de crías momificadas (prueba de susceptibilidad) se transformaron a raíz cuadrada del arcoseno y el número de momias a logaritmo, para garantizar una distribución normal de los datos. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa SAS⁽³⁰⁾.

Resultados

Comportamiento higiénico y población de abejas

El Cuadro 1 muestra el grado de CH y las condiciones poblacionales de las 50 colonias, así como la variación para estos parámetros. Claramente, hubo un amplio rango y variabilidad para el grado de CH entre las colonias evaluadas ($CV > 36\%$). Sin embargo, es de destacar que el 20 % de ellas tuvieron un alto CH ($\geq 95\%$), el 30 % tuvieron un bajo CH ($\leq 50\%$) y el 50 % registraron un nivel intermedio de CH (51-94 % de remoción de cría congelada). La población de abejas adultas también fue muy variable ($CV > 37\%$), pero no así la cantidad de cría en las colonias ($CV < 18\%$).

Hubo una correlación positiva y significativa entre el nivel de CH de la primera y la segunda evaluación ($r = 0.60$, $P = 0.0001$), por lo que la prueba de congelamiento de pupas mostró repetitividad. Por otro lado, no se encontró relación del nivel de CH con el número de abejas adultas ($r = -0.03$, $P = 0.84$) o con el área de cría operculada de las colonias ($r = 0.02$, $P = 0.87$), por lo que se presume que estos factores no influyeron significativamente en el grado de CH de las colonias.

Cuadro 1: Valores medios y de dispersión del comportamiento higiénico, población estimada de abejas y áreas de cría en dos pruebas a 50 colonias de abejas melíferas

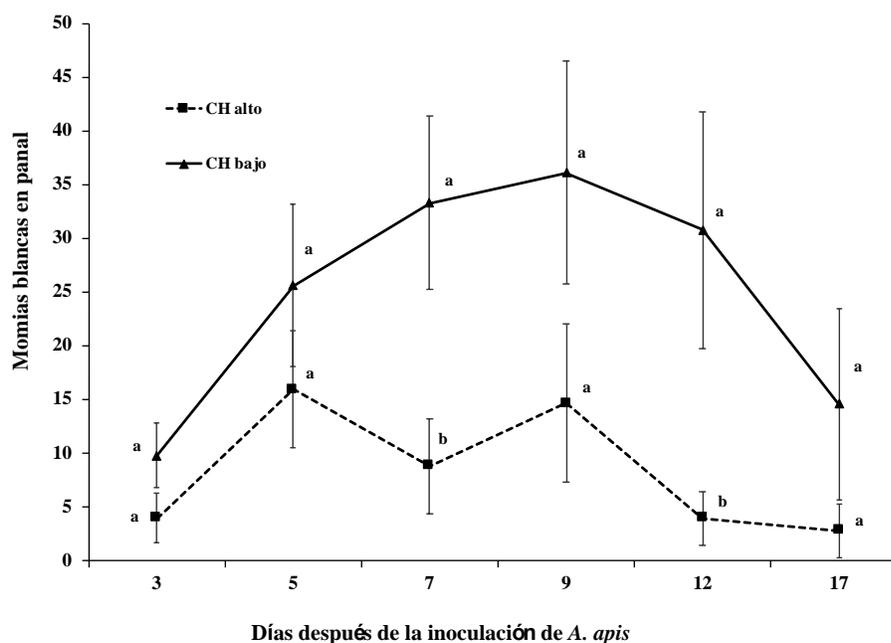
Estadístico descriptivo	Comportamiento higiénico (%)	Áreas de cría (cm ²)	Población de abejas adultas
Media	66.12	9,574.4	32,683
Error estándar	0.48	33.8	245.43
Coefficiente de variabilidad, %	36.2	17.5	37.5
Valor mínimo	12.5	5,820	9,720
Valor máximo	100	12,320	53,460
Rango	87.5	6,500	43,740

Efecto del comportamiento higiénico sobre la ascosferosis

Las colonias con alto y bajo grado de CH que fueron seleccionadas para las pruebas de resistencia relativa a la cría calcárea, difirieron significativamente en su nivel de CH ($t= 8.71$, $P<0.0001$), pero no difirieron en cuanto a población de abejas adultas ($t= 0.10$, $P= 0.75$) o de cría ($t= 2.02$, $P= 0.17$). Los niveles medios de CH fueron 31 ± 0.81 y 97 ± 0.20 %, para las colonias con bajo y alto CH, respectivamente.

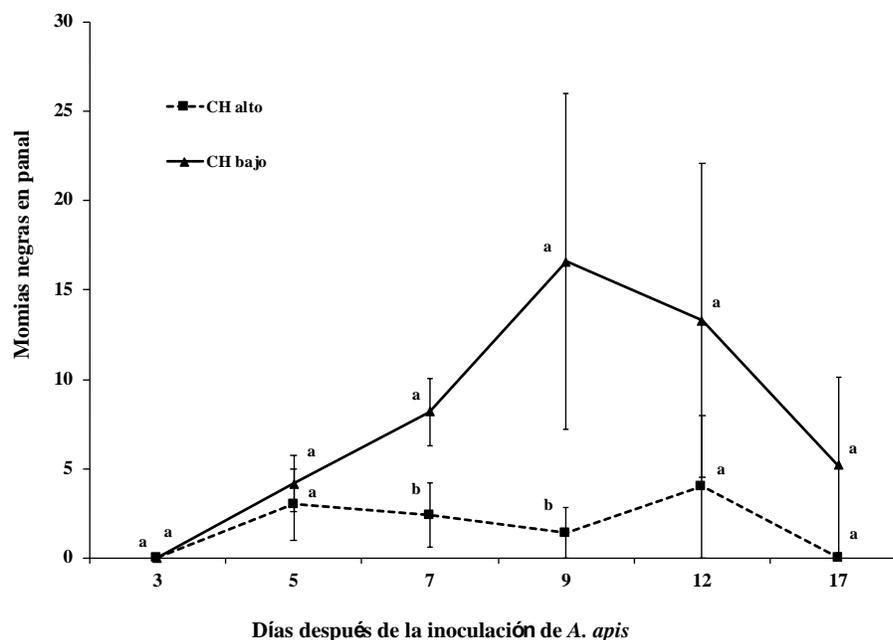
Después de ser expuestas a *A. apis*, la manifestación clínica de la cría calcárea (presencia de momias en los panales) se observó a los tres días post-exposición, y aunque la cantidad de cría afectada fue similar en ambos grupos de colonias hasta el día cinco post-exposición, las colonias de alto CH tuvieron significativamente menos momias blancas ($F_{1,76}= 32.1$, $P<0.0001$) y negras ($F_{1,76}= 10.8$, $P<0.001$) en los panales que las colonias de bajo CH. Además, el número de momias blancas y negras en los panales de ambos grupos de colonias disminuyó significativa y progresivamente entre los días 9 y 17 post-exposición ($F_{4,76} = 3.2$, $P= 0.01$ y $F_{4,76} = 2.6$, $P= 0.03$, respectivamente), pero no hubo efecto de interacción entre el grado de CH y los días post-exposición del hongo en momias blancas ($F_{4,76}= 0.7$, $P= 0.61$) y negras ($F_{4,76}= 0.95$, $P= 0.45$; Figuras 1 y 2).

Figura 1: Número (media \pm EE) de momias blancas registradas en los panales de las colonias con alto (■) y bajo (▲) comportamiento higiénico (CH) después de la inoculación con el hongo *A. apis*



^{ab} Diferentes literales indican diferencias significativas ($P<0.05$) basadas en un análisis de varianza de medidas repetidas y la prueba de comparación de medias de Newman-Keuls, previa transformación de los datos a logaritmo. Se muestran valores sin transformar.

Figura 2: Número (media \pm EE) de momias negras registradas en los panales de las colonias con alto (■) y bajo (▲) comportamiento higiénico (CH) después de la inoculación con el hongo *A. apis*



^{ab} Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0.05$) basadas en un análisis de varianza de medidas repetidas y la prueba de comparación de medias de Newman-Keuls, previa transformación de los datos a logaritmo. Se muestran valores sin transformar.

Además de lo anterior, se encontró una correlación negativa y significativa entre el nivel de CH y el número de momias totales de las colonias inoculadas con *A. apis* para las pruebas de resistencia a cría calcárea ($r = -0.63$, $P = 0.02$). Este resultado indica que, a mayor CH, hubo menor número de momias en los panales de las colonias, por lo que este comportamiento parece conferir resistencia a las abejas melíferas contra la ascosferosis.

Susceptibilidad de larvas de colonias con alto y bajo CH a la ascosferosis

Con relación a la susceptibilidad de las larvas provenientes de colonias con alto y bajo CH al hongo *A. apis*, se encontró que la proporción de momias en los panales no fue diferente estadísticamente entre ambos grupos de larvas durante todo el periodo de evaluación (Cuadro 2). Además, no hubo correlación significativa entre el nivel de CH de las colonias donadoras de larvas y el porcentaje de momias encontrado en los panales post-exposición de las larvas con *A. apis* ($r = 0.21$, $P = 0.55$).

Cuadro 2: Porcentaje (media \pm EE) de larvas de colonias con alto y bajo comportamiento higiénico (CH) que manifestaron clínicamente la ascosferosis post-exposición con *A. apis*

Días post-exposición con <i>A. apis</i>	Alto CH (n= 5)	Bajo CH (n= 5)	t	P
5	6.54 \pm 0.77	5.32 \pm 0.33	3.93	0.21
9	5.32 \pm 3.24	4.14 \pm 1.60	1.30	0.80
13	1.34 \pm 1.81	1.46 \pm 1.01	1.91	0.54

Los valores t y P fueron obtenidos del análisis de datos del porcentaje de crías momificadas transformados a la raíz cuadrada del arcoseno.

Discusión

Las evaluaciones del CH y fortaleza de población de las colonias de abejas africanizadas estudiadas mostraron amplia variación como se esperaba, pero no mostraron correlación, lo que sugiere que es posible identificar colonias de abejas que varían en su CH independientemente de su fortaleza. Estos resultados coinciden con lo reportado en trabajos previos^(10,12,31). Además, la prueba de N₂ usada para medir el CH mostró alta correlación entre repeticiones, lo que indica que es confiable como previamente se había demostrado⁽³²⁾, y permite la categorización de colonias con diferentes grados de expresión para este comportamiento. La frecuencia (20 %) de colonias que expresaron un alto grado de CH se encuentra dentro de los rangos mostrados por colonias de abejas europeas y africanizadas (10-31.5 %) en otras regiones^(12,33-35). Y esta baja frecuencia pudiera ser incrementada a partir de criar reinas de colonias con alto CH, permitiendo su libre fecundación, como lo han demostrado en la práctica, Spivak y Reuter⁽¹²⁾ y Bigio *et al*⁽³¹⁾. Lo anterior se basa en que parte de la variabilidad del CH es de origen genético^(36,37), que el CH es un comportamiento altamente heredable⁽³⁸⁻⁴¹⁾ y que éste se hereda principalmente por vía materna⁽²⁸⁾.

Las colonias seleccionadas por su alto CH tuvieron significativamente menos crías con signos clínicos de la ascosferosis en los panales que las colonias seleccionadas por su bajo CH. Esto presumiblemente se debió a que removieron mayor cantidad de cría enferma de los panales que las colonias con bajo CH, y que lo hicieron progresivamente conforme pasó el tiempo de evaluación. Estos resultados coinciden con los de estudios realizados en colonias con abejas de origen europeo^(42,43) y con los de un estudio realizado en colonias de abejas africanizadas cruzadas con europeas⁽¹⁰⁾. La detección de larvas infectadas por *A. apis* depende de la percepción de compuestos volátiles por parte de las abejas⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾, habiendo variación en los umbrales de detección de estos compuestos en las obreras. Abejas de estirpes seleccionadas para alto CH son más sensibles y reaccionan al olor de estos compuestos con mayor frecuencia que abejas no seleccionadas para este comportamiento⁽⁴⁷⁾. También se ha sugerido que la eficiencia del CH contra la cría calcárea depende de la detección temprana de las larvas infectadas por el hongo previo a su momificación y esporulación, lo que limita

la propagación de la infección en la colonia⁽¹⁰⁾. El retiro oportuno de las crías enfermas reducen el riesgo de esporulación y diseminación del hongo⁽⁹⁾. Lo anterior pudiera explicar por qué en las colonias con alto CH hubo un número significativamente menor de momias blancas y negras en los panales en comparación con las colonias con bajo CH. Esta conclusión se refuerza con los resultados del análisis de correlación que mostró que, a mayor grado de CH, disminuyó significativamente el número de crías infectadas con *A. apis* en los panales de las colonias de abejas estudiadas.

Se ha especulado que la resistencia de las abejas a enfermedades de la cría depende de la interacción de factores de resistencia fisiológica como la respuesta inmune ante diferentes patógenos, la actividad antimicrobiana de la microbiota y alimentos larvales, así como del CH y otros mecanismos de defensa^(48,49). En este estudio se analizó por primera ocasión la susceptibilidad de larvas a *A. apis* en un ambiente de nido común y se encontró que las larvas provenientes de colonias con alto y bajo CH fueron igualmente susceptibles a la ascosferosis. Por ello, los resultados del presente estudio permiten inferir que el nivel de expresión del CH y la susceptibilidad de las larvas a *A. apis* no están asociados, y apoyan la hipótesis de que aunque diversos factores y mecanismos pudieran contribuir a la resistencia de las abejas contra la ascosferosis⁽⁵⁰⁾, el CH es el más importante de ellos. Por lo anterior, se sugiere que los esfuerzos para el desarrollo de colonias resistentes a enfermedades de la cría como la ascosferosis, sean enfocados a la selección de colonias con alto CH.

La frecuencia de colonias con alto CH provenientes de programas de mejoramiento genético es superior a la encontrada en poblaciones no seleccionadas⁽¹²⁾ y se ha reportado que esta conducta se asocia a una mayor producción de miel^(12,34,51) y a una mayor resistencia a enfermedades^(9,12-15,36); esto último es coincidente con los resultados del presente estudio. Favorablemente, la selección y reproducción de reinas de colonias con alto CH parece ser suficiente para incrementar la frecuencia de colonias con elevado CH en las poblaciones de abejas^(31,39,41), debido a que el CH se hereda principalmente a través de la madre⁽²⁸⁾, por lo que la implementación de programas de selección y reproducción de reinas cuyas colonias expresen un alto CH, contribuiría a mejorar la salud y productividad de las colonias.

Conclusiones e implicaciones

Se concluye que el grado de CH entre colonias es variable, y que la población de abejas y crías no influyen significativamente en el grado de CH de las colonias. La frecuencia de colonias con alto CH en la población de abejas africanizadas analizada permitiría seleccionar genotipos para incrementar el grado de CH de las poblaciones de abejas en programas de mejoramiento genético. Las colonias con alto CH tuvieron mayor control de la ascosferosis que las colonias con bajo CH. La susceptibilidad de las larvas a la ascosferosis y el CH no parecen ser factores asociados. Estos resultados sugieren que el principal mecanismo de

protección contra *A. apis* en poblaciones de abejas africanizadas es el CH. Futuras investigaciones son necesarias para estudiar la inmunidad humoral y celular de las abejas contra *A. apis*, así como los mecanismos para su identificación y factores asociados, a fin de que sean integrados a programas de selección y mejoramiento genético con la finalidad de mejorar la sanidad y producción de poblaciones de abejas melíferas.

Literatura citada:

1. Gilliam M, Vandenberg JD. Fungi. In: Morse RA, Flottum K. Honey bee pest predators and diseases. 3^a ed. AI Root Co. Medina USA; 1997:82-99.
2. Zaghoul OA, Mourad AK, El MK, Nemat FM, Morsy ME. Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease, with reference to the determination of its economic injury levels in Egypt. *Commun Agric Appl Biol* 2005;70(4):703-714.
3. Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Hultmark D. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 2006;15(5):645-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>.
4. Larsen A, Reynaldi FJ, Guzmán-Novoa E. Bases del sistema inmune de la abeja melífera (*Apis mellifera*). Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 2019;10(3):705-728. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>.
5. Boecking O, Drescher W. *Apis mellifera* removes *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* from sealed brood cells in the topics. *Am Bee J* 1992;132(11):732-734.
6. 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. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.01.018>.
7. Newton DC, Ostasiewski, NL. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Am Bee J* 1986;126:278-281.
8. Spivak M, Downey DL. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 1998;91(1):64-70. <https://doi.org/10.1093/jee/91.1.64>.
9. 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. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1998.11099408>.
10. 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. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2011000100004>.

11. Danka RG, Villa JD. Preliminary observations on the susceptibility of Africanized honey bees to American foulbrood. *J Apic Res* 1994;33(4): 243-245. <https://doi.org/10.1080/00218839.1994.11100878>.
12. Spivak M, Reuter GS. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie* 1998;29:291-302.
13. 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. <https://doi.org/10.1051/apido:2000139>.
14. Ibrahim A, Spivak M. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* 2006;37(1):31-40. <https://doi.org/10.1051/apido:2005052>.
15. Schöning C, Gisder S, Geiselhardt S, Kretschmann I, Bienefeld K, Hilker M, Genersch E. Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor*-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 2012;215(2):264-271. <https://doi:10.1242/jeb.062562>.
16. Tapia-González J, Alcazar-Oceguera G, Macías-Macías J, Contreras-Escareño F, Tapia-Rivera J, Petukhova T, Guzmán-Novoa E. Ascospores en abejas melíferas y su relación con factores ambientales en Jalisco, México. *Rev Mex Cienc Pecu* 2020;11(2):468-478. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.4926>.
17. Medina LM, Vicario-Mejía E. The presence of *Varroa jacobsoni* mite and *Ascosphaera apis* fungi in collapsing and normal honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Yucatan, Mexico. *Am Bee J* 1999;139(10):794-796.
18. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, 5th. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. 2004:90. <http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/83/82/251-1>
Consultado: 25 Nov, 2020.
19. Nielsen DI, Ebert PR, Hunt GJ, Guzman-Novoa E, Kinee SA, Page RE. Identification of Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) incorporating morphometrics and an improved PCR mitotyping procedure. *Ann Entomol Soc Am* 1999;92:167-174.
20. Delaplane KS, van der Steen J, Guzman-Novoa E. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J Apic Res* 2013;52(1):1-12. <https://doi.10.3896/IBRA.1.52.1.03>.
21. Jay CS. Colour changes in honeybee pupae. *Bee World* 1962;43(4):115-117.

22. Message D, Goncalves LS. Efeito das condições climáticas a da colônia no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (africanizadas). Anais do 5o Congresso Brasileiro de Apicultura (Minas Gerais) 1980:55.
23. 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.
24. Flores JM, Gutierrez I, Puerta F. A comparison of methods to experimentally induce chalk brood disease in honey bees. Span J Agric Res 2004;2(1):79-83.
25. 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.
26. Winston ML, Katz SJ. Longevity of cross-fostered honey bee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races. Can J Zool 1981;59(8):1571-1575.
27. Guzman-Novoa E, Gary NE. Genotypic variability of components of foraging behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). J Econ Entomol 1993;86(3):715-721.
28. Unger P, Guzman-Novoa E. Maternal effects on the hygienic behavior of Russian x Ontario hybrid honeybees (*Apis mellifera* L.). J Hered 2010;101(1):91-96. <https://doi.org/10.1093/jhered/esp092>.
29. Gashout HA, Guzman-Novoa E, Goodwin PH, Correa-Benítez A. Impact of sublethal exposure to synthetic and natural acaricides on honey bee (*Apis mellifera*) memory and expression of genes related to memory. J Insect Physiol 2020;121:104014. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104014>.
30. SAS. SAS User's Guide: Statistics (version 9 ed.). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 2002.
31. Bigio G, Schurch R, Ratnieks FLW. Hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. J Econ Entomol 2013;106(6):2280-2285. <http://dx.doi.org/10.1603/EC13076>.
32. Espinosa-Montaña 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.
33. 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.

34. Medina-Flores CA, Guzmán-Novoa E, Aréchiga FCF, Gutiérrez BH, Aguilera SJI. Producción de miel e infestación con *Varroa destructor* de abejas africanizadas (*Apis mellifera*) con alto y bajo comportamiento higiénico. Rev Mex Cienc Pecu 2014;5(2):157-170.
35. Gerdtts J, Dewar RL, Finstrom MS, Edwards T, Angove M. Hygienic behaviour selection via freeze-killed honey bee brood not associated with chalkbrood resistance in eastern Australia. PloS one 2018;13(11):e0203969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203969>.
36. Arechavaleta-Velasco ME, Guzman-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.
37. Lapidge KL, Oldroyd BP, Spivak M. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. Naturwissenschaften 2002;89(12):565-568. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0371-6>
38. 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. <https://doi.org/10.1093/jee/92.2.261>.
39. Boecking O, Bienefeld K, Drescher W. Heritability of the Varroa-specific hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae). J An Breed Genet 2000;117(6):417–24. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2000.00271.x>.
40. 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. <https://doi.org/10.2298/AVB0806593S>.
41. Pernal SF, Sewalem A, Melathopoulos AP. Breeding for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*) using free-mated nucleus colonies. Apidologie 2012;43(4):403-16.
42. Gilliam M, Taber S, Richardson VG. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. Apidologie 1983;14(1):29-39.
43. Gilliam M, Taber S, Lorenz BJ, Prest DB. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascospaera apis*. J Invert Pathol 1988;52:314-325.

44. Swanson JAT, Torto SA, Kells KA, Mesce HH, Tumlinson JH, Spivak M. Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honey bee larvae. *J Chem Ecol* 2009;35:1108-1116. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9683-8>.
45. Zhao HX, Liang Q, Lee JH, Zhang XF, Huang WZ, Chen HS, Luo YX. Behavioral responses of *Apis mellifera* adult workers to odors from healthy brood and diseased brood. *Sociobiol* 2015;62(4):564-570.
46. McAfee A, Chapman A, Iovinella I, Gallagher-Kurtzke Y, Collins TF, Higo H, Foster LJ. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Sci Rep* 2018;8(1):5719. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24054-2>.
47. Masterman R, Ross R, Mesce K, Spivak M. Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 2001;187(6):441-452. <https://doi.org/10.1007/s003590100216>
48. Guzman-Novoa E, Morfin N. Disease resistance in honey bees (*Apis mellifera* L.) at the colony and individual levels. In: Moo-Young M. editor. *Comprehensive Biotechnology*. 3rd ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier BV; 2019;4:811-817. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00254-8>.
49. Spivak M, Danka RG. Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. *Apidologie* 2020:1-16. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00784-z>.
50. Evison SE, Fazio G, Chappell P, Foley K, Jensen AB, Hughes WO. Innate expression of antimicrobial peptides does not explain genotypic diversity in resistance to fungal brood parasites in the honey bee. *Apidologie* 2016;47(2):206-215.
51. Wielewski P, de Toledo VAA, Nunes ME, Costa-Maia FM, Faquinello P, Lourenco DAL, *et al.* Relationship between hygienic behavior and *Varroa destructor* mites in colonies producing honey or royal jelly. *Sociobiology* 2012;59(1):251-274.