



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**EFFECTO DE *Nosema ceranae* SOBRE EL
COMPORTAMIENTO DE FORRAJEO DE LA ABEJA
MELÍFERA AFRICANIZADA (*Apis mellifera* L.)
BAJO CONDICIONES TROPICALES**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA
FERNANDO AMIN FLEITES AYIL**

Asesores:

**Dr. Luis A. Medina Medina
Dr. José Javier G. Quezada Euán**

Mérida, Yuc., México, 2015

DECLARACIÓN DEL AUTOR

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis “Efecto de *Nosema ceranae* sobre el comportamiento de forrajeo de la abeja melífera africanizada (*Apis mellifera* L.) bajo condiciones tropicales.”, es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

Dedicatorias

Con amor

A mis padres Víctor Fernando Fleites Sosa y Georgina Margarita Ayil Sánchez.

A mi hermana Georgina Jakelin Fleites Ayil.

El motor en mi vida...

Agradecimientos

A mi familia, Víctor Fernando Fleites Sosa, Georgina Margarita Ayil Sánchez y a mi hermana Georgina Jakelin Fleites Ayil, muchas gracias por todo! lo que soy se lo debo a ustedes: la vida, el cariño, la comprensión, los consejos, la amistad, la confianza, pero sobre todo el amor que nunca me ha hecho falta, muchísimas gracias!

A Agatha Rosado Calderón por acompañarme con su comprensión, consejos y apoyo en este camino en todo momento.

Al CONACYT por la beca nacional de posgrado institucional en ciencias agropecuarias y manejo de recursos naturales tropicales con número de folio 361170-293066 otorgada para la realización de la tesis.

A los asesores Dr. Luis A. Medina Medina y Dr. José Javier G. Quezada Euán por el apoyo, comentarios y paciencia en la realización de este trabajo.

A los miembros del comité evaluador Dra. María Azucena Canto Aguilar y Dr. Juan Tún Garrido por los comentarios aportados a la tesis así como al grupo sinodal compuesto por la Dra. Virginia Meléndez, Dr. William May Itza, M.C. Humberto Moo Valle y M. C. Chavier De Araujo Freitas.

Al Dr. William May Itzá, M. C. Chavier De Araujo Freitas y M. C. Humberto Moo Valle por todo el apoyo consejos y observaciones en la realización de la tesis.

Al personal del departamento de apicultura Filiberto luit, Víctor luit y Rodolfo Tut por el inmenso apoyo, consejos y disposición de colaborar en todo trabajo de campo, así como a la secretaria del departamento Patricia Beltrán por todo el apoyo administrativo y moral.

Al Dr. Fernando Puerto Manzano así como al técnico Henry R. Noh Pech por la disposición y apoyo en todo momento a la realización del trabajo de laboratorio en las instalaciones del Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Remergentes del centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi.

A mis amigos del departamento de apicultura Manuel Vázquez, Omar Sosa, Teresita Solís, Rubén Medina, Arturo Bustillos, Sindy Tejera, Ligia Martín, Claudio Soto, Christian Salazar, Jorge Escalante e Isabel May por el apoyo, sugerencias en el trabajo de campo, laboratorio y por todo el apoyo moral que me brindaron en los momentos necesarios.

A mis amigos de la generación de la maestría Carolina Cuanalo, Úrsula López, Mauricio Flores, Luis Puerto, Julián Parada, Evelyn Carrillo, Mariana Santana, Rosana González, Irving Vargas, Andrea Chuc, Samuel Campos, Gerardo Dzip, Aleli Cab, Carmen Bastarrachea y Angel Leirana.

A mis amigos Jorge Escalante, Antonio Duran, Raúl Monsreal, Raymundo González, Mariel Salazar, Leny Pinzón y Mariana López. Amigos que siempre me han acompañado en las buenas y en las malas.

Resumen

Las deficiencias nutricionales, el uso de pesticidas y la presencia de patógenos, han provocado recientemente altas pérdidas de colonias de *Apis mellifera* en Europa y EUA, ocasionando un fenómeno conocido como Desorden del Colapso de las Colonias (CCD, por sus siglas en inglés). En los trópicos, no se ha reportado la pérdida de colonias a causa del CCD; sin embargo para Yucatán y otras regiones de importancia apícola, se ha registrado recientemente una mayor prevalencia de patógenos relacionados con este desorden, como el microsporidio *Nosema ceranae*, y de los efectos negativos que esta nueva especie ocasiona sobre la fisiología y la producción de miel en las abejas melíferas. En la presente investigación, se evaluó el efecto de la infección de *N. ceranae* por medio de dos concentraciones de esporas (10,000 y 50,000 esporas/abeja en 10 µl de jarabe de azúcar) sobre el comportamiento de forrajeo de abejas melíferas africanizadas comparado con abejas no infectadas por *N. ceranae* (alimentadas con 10 µl de jarabe de azúcar/abeja), evaluando la edad al inicio de forrajeo, duración del comportamiento de forrajeo y longevidad de las obreras. Existieron diferencias significativas para ambos niveles de infección en comparación con las abejas no infectadas con esporas de *N. ceranae*. Ambos grupos infectados forrajearon prematuramente ($\bar{X} \pm E.E. = 14.9 \pm 0.11$ y 14.6 ± 0.12 días de edad) y presentaron una menor duración como abejas forrajeadoras (7.6 ± 0.34 y 8.3 ± 0.35 días) por su parte las abejas libres de la enfermedad iniciaron el comportamiento de forrajeo a 22.7 ± 0.14 días de edad y obtuvieron una duración de actividad como forrajeras de 9.59 ± 0.31 días de edad. En relación a la longevidad de las obreras, medida como la edad en la que muere el 50 % de las abejas tratadas, se presentó una longevidad menor en las abejas infectadas que en las abejas libres de la enfermedad (Log-Rank Test $X^2 = 274.08$ $p = 0.001$), con valores de 21 y 31 días de edad, respectivamente; no existieron diferencias significativas entre ambos niveles de infección. El impacto negativo de *N. ceranae* sobre las variables del comportamiento de forrajeo y longevidad evaluadas en esta investigación son semejantes al registrado en abejas de origen europeo, lo cual prueba la susceptibilidad de las abejas africanizadas a esta enfermedad.

Palabras Clave: *N. ceranae*; Nosemosis; Forrajeo; Africanizada; Longevidad.

Summary

Nutritional deficiencies, pesticides and pathogens have recently led to high losses of *Apis mellifera* L. colonies in Europe and the USA, causing a phenomenon known as Colony Collapse Disorder (CCD). In the tropics it is not reported CCD as the cause of losses of colonies; however, there are recent records of the presence of pathogens identified as possible causes of this phenomenon, as microsporidian *Nosema ceranae*, and their negative effects on physiology and honey production of Africanized honey bees in Yucatan. In this research the infection of *N. ceranae* was evaluated using two concentrations of spores (10,000 and 50,000 spores/bee in 10 μ l of sugar syrup) on the foraging behavior of Africanized honey bees compared to the group of free bees infection (fed with 10 μ l of sugar syrup/bee) on the foraging behavior of Africanized honey bees through the onset and duration of foraging activity and longevity. There were significant differences between the groups infected worker bees with *N. ceranae* compared to the group of disease free; the groups infected forage prematurely ($\bar{X} \pm E.E. = 14.9 \pm 0.11$ y 14.6 ± 0.12 days) and they obtained a shorter duration of foraging activity (7.6 ± 0.34 y 8.3 ± 0.35 days) on other hand disease free bees started foraging behavior to 22.7 ± 0.14 and they had a duration of foragers activity for 9.59 ± 0.31 days. In the evaluation of longevity, as the age at which 50% of treated bees are killed, infected bees had lower longevity than healthy bees (Log-Rank Test $X^2 = 274.08$ $p = 0.001$), with 21 and 31 days of age, respectively; there were no significant differences between treatments of infection. The negative impact of *N. ceranae* on variables of foraging behavior and longevity evaluated in this study are similar to that recorded in bees of European origin, which proves the susceptibility of Africanized bees to this disease.

Keywords: *N. ceranae*; Nosemosis; foraging; Africanized; longevity.

Índice general

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. Comportamiento de forrajeo en <i>Apis mellifera</i>	3
2.2. Actividades internas y externas de las abejas obreras.....	3
2.3. Influencia factores internos y externos en el comportamiento de forrajeo.....	4
2.4. Comunicación en las abejas melíferas.....	6
2.4.1. Lenguaje de danzas.....	7
2.4.2. Danza del círculo (round dance).....	8
2.4.3. Danza de coleteo (waggle dance).....	8
2.5. Enfermedades de las abejas.....	9
2.5.1. <i>Nosema spp</i>	10
2.5.2. <i>Nosema ceranae</i>	11
2.5.3. Efectos de la nosemosis causada por <i>N. ceranae</i>	12
2.5.4. Situación de la nosemosis causada por <i>N. ceranae</i> a nivel mundial y en México.....	13
2.5.5. <i>Nosema ceranae</i> y su relación con el Desorden del Colapso de Colonias (CCD).....	14
3. Objetivos e Hipótesis.....	16
3.1. Objetivo general.....	16

3.2. Objetivos específicos.....	16
3.3. Hipótesis.....	17
4. Referencias.....	18
Artículo: <i>Nosema ceranae</i> induces precocious foraging, reduces foraging duration and decreases longevity in Africanized honey bees.....	32
Resumen.....	33
1. Introducción.....	34
2. Materiales y métodos.....	35
2.1. Sitio de estudio.....	35
2.2. Identificación de <i>Nosema ceranae</i>	35
2.3. Determinación del origen genético de las obreras provenientes de las colonias experimentales.....	37
2.4. Instalación de colmenas de observación para evaluar el comportamiento de forrajeo.....	38
2.5. Obtención de esporas de <i>N. ceranae</i> , infección y marcación de abejas obreras.....	38
2.6. Variables registradas.....	41
2.7. Análisis estadísticos.....	42
3. Resultados.....	43
3.1. Identificación de esporas de <i>N. ceranae</i>	43
3.2. Origen genético de las abejas de las colonias experimentales.....	43

3.3. <i>Nosema ceranae</i> y su efecto en el comportamiento de forrajeo.....	44
3.4. Duración de la actividad de forrajeo.....	48
3.5. <i>N. ceranae</i> y longevidad de las abejas obreras africanizadas.....	49
4. Discusión.....	51
4.1. <i>Nosema ceranae</i> y su efecto en el inicio de comportamiento de forrajeo.....	52
4.2. Duración de la actividad de forrajeo.....	53
4.3. <i>N. ceranae</i> y longevidad de las abejas obreras africanizadas.....	54
5. Conclusiones.....	58
6. Referencias.....	59
A scientific note: Decoding dances of Africanized honey bees in Yucatan Mexico.....	70

Índice de figuras

Figura 1. Resultados de la Prueba de PCR punto final para determinar la especie de <i>Nosema</i> que se encontraba infectando a las abejas en las colonias del apiario experimental.....	45
Figura 2. Resultados del análisis del ADN mitocondrial para la identificación del origen genético de las abejas obreras utilizadas en el trabajo.....	46
Figura 3. <i>N. ceranae</i> induce al forrajeo precoz en abejas africanizadas.....	48
Figura 4. Tiempo de actividad de forrajeo entre tres diferentes tratamientos.....	51
Figura 5. Longevidad de las abejas obreras africanizadas infectadas y no infectadas con <i>N. ceranae</i>	52

Índice de cuadros

Cuadro1. Efecto de tratamiento y colonia sobre el inicio de actividad de forrajeo de las abejas melíferas africanizadas bajo infección de *N. ceranae*.....47

Cuadro 2. Efecto de Tratamiento y Colonia sobre la duración de la actividad de forrajeo de las abejas melíferas africanizadas bajo infección de *N. ceranae*.....50

Anexos

1. Procedimiento etanol-fenol para la extracción de ADN.....76
2. Identificación de la presencia de ADN de *Nosema* en las muestras de abejas a través de PCR punto final.....77
3. Determinación del origen genético de las obreras provenientes de las colonias experimentales.....78

1. Introducción

La constante y drástica disminución del número de colonias de abejas melíferas registradas actualmente en los Estados Unidos y otros países de Europa, han llamado la atención principalmente por los servicios de polinización de estas abejas para importantes cultivos comerciales (Morse y Calderone, 2000).

Esta disminución es provocada por diversas plagas, enfermedades y parasitosis que incluyen una diversidad de agentes causales como: virus, bacterias, hongos y ácaros. Tales agentes de manera individual, conjunta o en combinación con el uso indiscriminado de pesticidas y deficiencias alimentarias, están ligados a un fenómeno conocido como Desorden del Colapso de las Colonias (CCD por sus siglas en inglés); el cual afecta la salud de las crías y de las abejas adultas así como el desarrollo y producción de las colonias (Morse y Flottum, 1997; Evans y Schwars, 2011; Evans y Schwars, 2011; Spivak *et al.*, 2011).

Entre las parasitosis asociadas a esta pérdida de colonias se encuentra la nosemosis, provocada por *Nosema ceranae*. Este patógeno es más virulento en comparación con la especie *N. apis*, causando altas tasas de mortalidad de los individuos debido a la mayor producción de esporas infecciosas, afectando los tejidos del tracto digestivo de las abejas (Huang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015). Otros efectos ocasionados por este parásito se han registrado en el cambio de las actividades de forrajeo así como en la reducción de la longevidad de las obreras; efectos perjudiciales que en conjunto se cree provocan el colapso de las colonias en climas templados (Furgala y Mussen, 1990; Forsgren y Fries, 2010; Fries, 2010; Goblirsch *et al.*, 2013; Huang y Solter, 2013; Huang *et al.*, 2015).

En México, no se ha reportado la pérdida de colonias a causa del CCD, sin embargo existen registros de la presencia de la nosemosis desde 1965, y durante las siguientes décadas hasta principios de 1980 se había reportado una prevalencia de 3.8% para esta parasitosis, lo cual no representaba un problema para la apicultura a nivel nacional (Wilson y Nunamarker, 1993). A principios de

1990, se registró en Yucatán un aumento del 7.2% a un 14.4% en la prevalencia de la nosemosis en apiarios comerciales durante un periodo de tres años (García-Millán y Quezada-Euan, 1993; Carrillo, 1996), aunque sin generar riesgos para la apicultura.

En 2004, muestras de abejas africanizadas colectadas originalmente en cuatro estados del centro de México para determinar la distribución de *N. apis*, registró la presencia y prevalencia de *N. ceranae* en el 94% de las muestras analizadas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011). Posteriormente, se registró en Yucatán una elevada frecuencia de la nosemosis en colonias manejadas y enjambres silvestres (74% y 53%, respectivamente; Martínez *et al.*, 2011). Este aumento drástico suponía la presencia de la nueva especie de microsporidio parasitando a las abejas de Yucatán; lo cual fue confirmado en investigaciones posteriores, así como los efectos negativos de esta nueva especie de *Nosema* en la producción de miel de las colonias de abejas africanizadas en Yucatán (Medina-Medina *et al.*, 2012; Martín, 2013; Soto, 2014).

Actualmente, aun cuando existen evidencias de la presencia, establecimiento e incremento drástico de los niveles de infección de la nosemosis en un corto período en diferentes regiones de México, así como el impacto de este parásito sobre la producción de miel en Yucatán; aún no se ha realizado ninguna evaluación sobre los efectos de la nosemosis causada por *N. ceranae* en el comportamiento de forrajeo así como en la longevidad de las abejas africanizadas; ambos elementos son importantes para el establecimiento, reproducción así como el aprovechamiento de las colonias de abejas africanizadas en Yucatán, México.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de la infección causada por el microsporidio *N. ceranae* sobre el comportamiento de forrajeo, a través de la evaluación de la edad al inicio de forrajeo, duración de la actividad del comportamiento de forrajeo así como la longevidad en abejas obreras africanizadas (*A. mellifera*) bajo condiciones tropicales.

2. Marco teórico

2.1. Comportamiento de forrajeo en *Apis mellifera*

Entre los diferentes tipos de comportamiento que desarrollan a nivel individual y grupal las colonias de *A. mellifera*, el comportamiento de forrajeo es básico e importante para el establecimiento, desarrollo y reproducción de la colonia, ya que dependen del néctar y polen para su supervivencia (Seeley, 1995; Michener, 2007; Quezada-Euán, 2010; Konzmann y Lunau, 2014). La búsqueda y almacenamiento de estos recursos es cuidadosamente coordinada por miles de abejas obreras conocidas como forrajeadoras, con el objetivo de satisfacer sus necesidades a corto y largo plazo (Calderone y Johnson, 2002). Este grupo de individuos se pueden especializar en la colecta de uno o más recursos que son importantes para el desarrollo de las colonias como el néctar y polen que brindan energía y proteínas respectivamente, a los individuos inmaduros y adultos que conforman la colonia (Fewell y Page, 1993).

En la colecta de néctar, existe una división marcada entre abejas forrajeadoras y receptoras encargadas de la búsqueda y almacenamiento de este recurso energético en los panales y en cuanto al polen, se observa el mismo comportamiento con excepción de que las abejas que colectan el polen son las mismas que almacenan este recurso en los panales de las colonias. En el comportamiento de forrajeo, un subgrupo de abejas conocidas como exploradoras se encargan exclusivamente de la búsqueda de nuevos lugares para la colecta de alimentos (Free, 1967; Seeley, 1995; Quezada-Euán, 2010).

2.2. Actividades internas y externas de abejas obreras

En la colecta del néctar, existe una interacción entre abejas obreras de edad intermedia que almacenan este recurso en los panales y abejas con mayor edad que son las forrajeadoras y que obtienen este recurso en el campo y que es necesario para el desarrollo de la colonia. Abejas de edad intermedia (12 a 21 días) realizan tareas de recepción, procesamiento y almacenamiento de néctar dentro

de la colonia, mientras que fuera de la colonia las abejas forrajeadoras con una edad mayor a los 21 días se encargan de la colecta de alimentos y recursos necesarios para la colonia (Johnson, 2010).

Dentro de la colonia, existe interacción entre abejas de edad intermedia y abejas forrajeadoras que comunican a través de las danzas, la ubicación de las fuentes de néctar las cuales varían día a día. En épocas de abundantes flujos de néctar, las abejas forrajeadoras reclutan a través de las “danzas de coleteo” y “danzas del temblor” a abejas de edad intermedia para realizar actividades de colecta de néctar de acuerdo a las demandas de la colonia (Seeley, 1995; Johnson, 2010). Otro tipo de interacción entre abejas de edad intermedia y abejas forrajeadoras, se observa cuando las de edad intermedia seleccionan a las forrajeadoras que poseen una mayor concentración de azúcar en el néctar, para descargar este recurso de mejor calidad (Seeley, 1995; Quezada-Euán, 2010).

2.3. Influencia de factores internos y externos en el comportamiento de forrajeo

Diferentes factores internos y externos como la edad de inicio de forrajeo, los recursos florales visitados, recursos colectados, tasas de reclutamiento, preferencia floral, transferencia de información de sitios de forrajeo, condiciones genéticas de los individuos, tamaño de la población, presencia de panales con cría abierta, influencia del ambiente y diferencias estacionales, interactúan en conjunto en la colecta, almacenamiento y aprovechamiento de los diferentes recursos que son necesarios para el desarrollo, reproducción y supervivencia de las colonias de abejas (Winston, 1987; Fewell y Page, 1993; Hunt *et al.*, 1995; Eckert *et al.*, 1994; Pankiw y Page; 2001; Calderone y Johnson, 2002; Adebayo *et al.*, 2006; Sagili y Pankiw, 2007; Hunt *et al.*, 2007).

Los factores externos están relacionados con las condiciones ambientales a las cuales están expuestas las abejas melíferas en el campo, las cuales influyen en las actividades de búsqueda, colecta y almacenamiento de recursos florales

(Norgate *et al.*, 2010). Entre las variables ambientales que influyen la búsqueda de recursos florales se encuentran la temperatura ambiental, radiación solar, humedad relativa y velocidad del viento, los cuales son consideradas como los principales factores ambientales que influyen en las actividades de forrajeo (Adebayo *et al.*, 2006).

Dentro de la colonia, diferentes condiciones se relacionan en la demanda y búsqueda de los recursos (néctar y polen) incluyendo principalmente las condiciones genéticas, físicas, químicas y demográficas, las cuales rigen las actividades de forrajeo para la colecta de néctar o polen, dependiendo de la presencia de estos recursos dentro del nido y de las necesidades de la colonia (Seeley, 1995). Uno de los principales factores internos de la colonia de los cuales depende la colecta de alimento es la variación genética, resultando en una variación entre obreras con tendencia a colectar polen y/o néctar de diversas fuentes florales. Colonias que son genotípicamente más diversas tienden a tener diferentes preferencias en la colecta de recursos, la cual depende del estímulo que reciben de las reservas en el nido y el consumo del néctar y polen (Fewell y Page, 1993; Page *et al.*, 1998).

Así también, la presencia o ausencia de alimento almacenado dentro de la colonia tanto néctar como polen, provocan cambios en la tasa de colecta de alimento, incluso efectos alternos como el cambio de actividades a edades tempranas ocurren bajo estas características (Fewell y Page, 1993). En la colecta de polen, existen diferentes mecanismos que interactúan en la obtención de este recurso como el efecto de espacios vacíos en los panales (Free, 1967; Seeley 1995), así como el tamaño de la población el cual juega un papel importante en la colecta de alimentos debido a la presencia de cría abierta ya que a través de la comunicación química que emiten se regula la tasa de colecta de polen interactuando directamente las larvas y abejas obreras forrajeadoras en la búsqueda y colecta de alimento (Eckert, *et al.*, 1994; Pankiw *et al.*, 1998; Pankiw *et al.*, 2004; Sagili y Pankiw, 2007; Trhlin y Rajchard, 2011).

Las actividades, factores y características de este tipo de comportamiento necesitan de la comunicación entre los miembros de la colonia para realizarla de manera organizada y eficientemente. Durante esta comunicación entre las abejas, interactúan señales químicas, auditivas e incluso un tipo de comunicación considerado como uno de los más complejos y más estudiados del reino animal que es el lenguaje a través de las danzas (von Frisch, 1967; Tautz, 2008), las cuales en conjunto tienen como objetivo responder a las necesidades de la colonia bajo diversas circunstancias (Gould y Grant, 1988; Beekman y Lew, 2007).

2.4. Comunicación en las abejas melíferas

Los insectos sociales son capaces de integrar sus actividades coordinada y colectivamente de tal manera que estas sean eficientes para la colonia, contrario a lo que podrían lograr de manera individual y desorganizadamente (Winston, 1987). La manera de integrar estas actividades es a través de la comunicación y en la abeja melífera, es definida como la transferencia de información y estímulos que provocan respuestas fisiológicas y de comportamiento entre los individuos del mismo nido, permitiendo una respuesta coordinada en la colonia como consecuencia de las necesidades de la misma incluyendo la colecta de alimento y otros recursos (von Frisch, 1967; Seeley, 1995; Grüter *et al.*, 2013).

Esta coordinación ocurre principalmente a través de dos tipos de señales que permiten la comunicación entre individuos de un mismo grupo, como es el caso de la abeja melífera que pueden transmitir información a través del lenguaje químico o señales químicas por olores y a través del lenguaje de las danzas. Ambas señales son transferidas dentro del nido y son utilizadas para la búsqueda, selección y colecta de recursos necesarios para la colonia (von Frisch, 1967; Seeley, 1995; Farina *et al.*, 2005; Slessor *et al.*, 2005; Quezada, 2010; Grüter *et al.*, 2013).

2.4.1. Lenguaje de danzas

La comunicación a través de las danzas en las abejas melíferas ha sido uno de los comportamientos del reino animal más estudiado durante los últimos 60 años. Fueron descubiertas y decodificadas por el científico Karl von Frisch (1967), el cual observó que las abejas obreras poseían un único y fascinante comportamiento por el cual comunicaban a sus compañeras del nido la presencia, calidad, olores, distancia y dirección de las fuentes de alimento reclutando a otras obreras a través de estas danzas (Grüter y Farina, 2009; Grüter y Ratnieks, 2011; Couvillon *et al.*, 2012; Toufalia *et al.*, 2013; Bray y Nieh, 2014; Couvillon *et al.*, 2014).

A partir de este descubrimiento, diferentes investigaciones han registrado diversos aspectos relacionados con las danzas tales como la interpretación y decodificación de estas danzas (Visscher y Seeley, 1982; Gil y De Marco, 2010; Couvillon *et al.*, 2012); los mecanismos de evolución en la producción de mensajes (Seeley *et al.*, 2000; Dornhaus y Chittka, 2004; Barron *et al.*, 2007) y la recepción de mensajes (Riley *et al.*, 2005; Tanner y Visscher, 2008; Tanner y Visscher, 2009).

Las danzas mejor descritas y más estudiadas por von Frisch son conocidas como la danza del círculo (round dance) y la danza de coleteo (waggle dance) (von Frisch, 1967; Winston, 1987, Seeley, 1995; Tautz *et al.*, 2004). Sin embargo, existen otras danzas poco estudiadas tales como la danza dorso-ventro-abdominal, también llamada danza de vibración (shaking dance), la cual se relaciona con el reclutamiento de abejas dentro de la colonia hacia la zona de danzas induciéndolas para que salgan a forrajear. Otra señal de comunicación, es la danza del temblor (tremble dance), relacionada con el reclutamiento de abejas dentro de la colonia para la recepción y el almacenamiento de néctar que son transportadas a la colonia por las abejas forrajeadoras (Seeley, 1995).

2.4.2. Danza del círculo (round dance)

Este tipo de danza indica la dirección y distancia hacia la cual deben volar las abejas reclutadas para obtener alimento, sin embargo la danza circular es menos compleja respecto a la información que indica (von Frisch, 1967; Winston, 1987; Seeley, 1995). La danza de círculo informa a las abejas que el recurso floral se encuentra cerca del nido dentro de los primeros cien metros a su alrededor, de tal manera que las abejas que reciben esta información realizan sus vuelos en un radio de acción menor a cien metros de distancia guiándose por el olfato, la visión y el contenido de azúcares del recurso floral de interés (Seeley, 1995).

2.4.5. Danza del coleteo (waggle dance)

Este tipo de danza se realiza a distancias mayores a los 100 metros de la colonia, indicando la dirección, distancia y calidad de los recursos florales y puede ser decodificada a través del registro de la información de las obreras que regresan al nido indicado por la duración del coleteo (distancia) y por la posición en la cual danzan las abejas en el panal (dirección) (von Frisch, 1967; Winston, 1987, Seeley, 1995). En la danza de coleteo, una abeja obrera vibra su abdomen de lado a lado conforme esta avanza en línea recta en una dirección (waggle run), doblando hacia la derecha o izquierda y regresando al punto de partida para completar el círculo (return phase), en este punto la abeja usualmente repite la fase “waggle run” regresando nuevamente al punto de inicio, pero del lado opuesto (Couvillon *et al.*, 2012).

El circuito completo o también conocido como “ocho”, es realizado con un número variable de repeticiones dependiendo de la calidad del recurso (Seeley *et al.*, 2000). Sin embargo, esta variación no solamente se relaciona con la calidad del néctar sino también con la dirección y distancia al momento de realizar la danza. De esta manera, las abejas que siguen estas danzas también llamadas reclutas, optan por tomar un promedio de la información que reciben para obtener una sola distancia y dirección hacia el recurso que es más atractivo para su colecta y que

está siendo transmitido por la abeja forrajadora (von Frisch, 1967; Dyer, 2002; Tanner y Visscher, 2008; Couvillon *et al.*, 2012).

La danza de coleteo es la única danza utilizada para la decodificación de la distancia y dirección de las fuentes de alimento debido a la precisión de la información que transmiten las abejas forrajadoras danzantes a sus compañeras de nido. Esta información es aprovechada para la decodificación de danzas con el objetivo de obtener la información más exacta de la distancia y dirección de las fuentes de alimento donde las abejas se encuentran forrajando (Couvillon *et al.*, 2012; Couvillon *et al.*, 2014). La dirección de la fuente de alimento, es decodificada observando dentro de la colonia la orientación de la danza que realizan las abejas sobre los panales con respecto al azimut solar o posición del sol. Por otro lado, la distancia es decodificada a través de la medición del tiempo de la fase intermedia de la danza de coleteo (waggle run), obteniendo un promedio de tiempo el cual es utilizado para obtener la distancia que comunican las abejas forrajadoras danzantes a sus compañeras de nido (Schürch *et al.*, 2013; Couvillon *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha corroborado la interpretación de esta información mediante el entrenamiento de abejas marcadas utilizando alimentadores artificiales instalados a diferentes distancias conocidas, grabando y reproduciendo las danzas que realizan las obreras al regresar al nido para indicar cada distancia de la fuente de alimento (Schürch *et al.*, 2013; Couvillon *et al.*, 2014). De esta manera, se ha confirmado que entre las diferentes danzas identificadas así como las diferentes fases que componen la danza de coleteo, esta metodología es hoy en día la mejor forma de interpretar la distancia y dirección de las fuentes de alimento donde las abejas forrajeen, a través de la decodificación de estas danzas dentro de la colonia.

2.5. Enfermedades de las abejas

La abeja melífera es una especie social particularmente vulnerable a diversos micro y macroparásitos, debido a la cercanía e interacciones sociales constantes entre individuos dentro del nido (Naug y Camazine, 2002; Farnesi *et al.*, 2009; Simone-Finstrom y Spivak, 2010). Al igual que en los seres humanos, las abejas *Apis mellifera* son afectadas por diversas enfermedades y parasitosis, las cuales pueden llevar al colapso y muerte de toda la colonia cuando no son controladas a tiempo. Estas enfermedades y parasitosis son mayormente causadas por diversos agentes causales como bacterias, hongos, virus y ácaros, y tanto el patógeno como el hospedero poseen características infecciosas y de defensa a través de las cuales compiten por perpetuar su descendencia en una interacción parásito-hospedero producto de años de evolución (Fries y Camazine, 2001; Eberl *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, un incremento en la pérdida de colonias de abejas melíferas ha representado una grave amenaza a la industria apícola alrededor del mundo, aunado a los efectos por pesticidas, cambios ambientales, así como los diversos patógenos que en conjunto son considerados como los principales factores causantes de esta pérdida masiva de colonias (Kluser *et al.*, 2010; Van der Zee *et al.*, 2012; Van der Zee *et al.*, 2014). Aunque estas causas aún no son del todo claras, se presume que múltiples parásitos y patógenos influyen en gran medida en la desaparición de las colonias (Van der Zee *et al.*, 2014), y entre estos factores se presume que el microsporidio *N. ceranae* es uno de los principales patógenos relacionados con el CCD debido a que afecta la fisiología y el comportamiento de las abejas infectadas (Higes *et al.*, 2009; Neumann y Carreck, 2010; Botías *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2013; Higes *et al.*, 2013; Van der Zee *et al.*, 2014).

2.5.1. *Nosema spp*

La enfermedad conocida como nosemosis es una de las enfermedades más comunes en las abejas adultas y actualmente es causada por dos especies del género *Nosema*: *N. apis* y *N. ceranae* (Microsporidio: Nosematidae) (Fries *et al.*, 1996; Klee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009 (1); Giersch *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2012; Huang y Solter, 2013). Este parásito afecta el tracto intestinal de las abejas dañando las células epiteliales del intestino medio también conocido como ventrículo (Fries, 1993).

Se han descrito dos especies de *Nosema* (*N. apis* y *N. ceranae*) de las cuales *N. apis* originalmente infectaba a *Apis mellifera*, mientras que *N. ceranae* infectaba a *Apis ceranae* (Fries *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2012). Sin embargo, recientemente se ha observado que *A. mellifera* puede ser infectada por ambos microsporidios separadamente o de forma conjunta (Higes *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013). Evidencias recientes demuestran que *N. ceranae* se encuentra desplazando a *N. apis* ya que se ha observado su presencia y mayor prevalencia en Europa, Norte de África, Asia, Norte América y Centro América, donde se había reportado únicamente la presencia de *N. apis*. Es importante mencionar que dicho “desplazamiento” hoy en día es motivo de discusión, debido a que esta interacción entre microsporidios aún no es clara (Martínez *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2014; Gómez-Moracho *et al.*, 2015).

2.5.2. *Nosema ceranae*

N. ceranae es un microsporidio perteneciente al género *Nosema* (Microsporidia Nosematidae) de 4.4 x 2.2 µm de tamaño, con el filamento polar presentando 18-21 vueltas en el interior de la espora, son resistente a altas temperaturas lo cual puede ocasionar alta virulencia en individuos parasitados en las zonas tropicales, mientras que a bajas temperaturas presenta una baja tolerancia (Huang, 2011). Su desarrollo biológico comienza en el tracto digestivo del individuo al momento de ingerir alimento contaminado, y la infección ocurre sin distinción entre castas y

sexos aunque con una mayor virulencia en las obreras, ya que tienen mayor contacto entre ellas dentro de la colonia a través de la transferencia de material contaminado (Fries *et al.*, 1996).

En el ventrículo donde la espora encuentra las condiciones favorables para germinar, el filamento polar de la espora penetra las células epiteliales que recubren esta porción del intestino e inyecta el esporoplasma en la célula, madurando en células madres llamadas merontes. En las primeras 24 horas después de la infección, comienza la división nuclear seguida de la citocinesis, y de esta forma el meronte se divide en varios merozoitos, que al alcanzar la madurez se dividen en esporontes y cada esporonte se divide para formar esporoblastos que al final maduran en esporas (Fries, 1993).

2.5.3. Efectos de la nosemosis causada por *N. ceranae*

Los daños causados por la nosemosis en las abejas melíferas han sido descritos para ambas especies de *Nosema*, sin embargo, existen diferencias en los efectos de esta parasitosis dependiendo de la especie de microsporidio. La diferencia principal entre *N. apis* y *N. ceranae* es la mayor virulencia de *N. ceranae* en comparación con *N. apis*, así como su resistencia a altas temperaturas y falta de fluctuaciones estacionales en los niveles de infección (Higes *et al.*, 2007), lo cual beneficia el establecimiento y desarrollo de las esporas de *N. ceranae* en las abejas melíferas en la mayor parte del año en las regiones tropicales. Adicionalmente, se ha observado un efecto negativo de *N. ceranae* sobre el aprendizaje en las obreras infectadas afectando la orientación y ubicación de sus nidos y sitios de alimentación, así como una reducción en su longevidad (Mayack y Naug, 2009; Kralj y Fuchs, 2010; Goblirsch *et al.*, 2013).

En relación a su respuesta inmune, en las abejas infestadas con *N. ceranae* se ha observado una disminución de la respuesta inmunológica ante la presencia de agentes biológicos infecciosos como bacterias y no biológicos, como pesticidas, lo que repercute en las poblaciones de las colonias condenando así al colapso de

colonias infectadas con esta especie de microsporidio (Higes *et al.*, 2008; Antúnez *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2010; Paxton, 2010; Vidau *et al.*, 2011).

Otros efectos negativos de *N. ceranae* en las obreras incluyen el forrajeo prematuro, la reducción del periodo de forrajeo así como una reducción en la longevidad de las abejas melíferas infectadas (Furgala y Mussen, 1990; Kralj y Fuchs, 2010). Estos efectos están acompañados por cambios en la división de trabajo dentro de la colonia, así como en el comportamiento de forrajeo de tal manera que las abejas obreras no cumplen con el tiempo dedicado a cada una de sus tareas dentro y fuera del nido en comparación con las abejas sanas (Woyciechowski y Kozłowski, 1997; Johnson, 2010; Kralj y Fuchs, 2010). Trabajos realizados recientemente con abejas melíferas de climas templados han presentado efectos similares cuando son infectadas con la especie *N. ceranae* como el forrajeo prematuro, menor periodo de actividad de forrajeo, así como una alta mortalidad de abejas forrajeadoras, tanto en condiciones de laboratorio como condiciones de campo (Kralj y Fuchs, 2010; Goblirsch *et al.*, 2013).

2.5.4. Situación de la nosemosis causada por *N. ceranae* a nivel mundial y en México

La dispersión de la nosemosis causada por *N. ceranae* se ha registrado desde mediados de la década de los 90's, afectando a las abejas melíferas de diferentes regiones templadas (Fries *et al.*, 2006; Higes *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2007) El primer reporte de la identificación de esta especie fue descrito en 1994 por Fries *et al.*, (1996) en la abeja asiática *Apis ceranae*. A partir de este descubrimiento, se registró la presencia de este microsporidio en diferentes regiones de Europa, afectando a las colonias debido a la mayor frecuencia y prevalencia de la enfermedad y se estima que la contaminación con este microsporidio se produjo a principios de 2010 (Klee *et al.*, 2007).

El primer reporte en Europa se registró en colonias de España (Higes *et al.*, 2006), posteriormente en una análisis de 115 muestras colectadas en diferentes regiones

del mundo, se constató la presencia de *N. ceranae* en América en países como EUA y Brasil, en Asia (Vietnam) y en Europa (Dinamarca, Finlandia, Alemania, Grecia, Serbia, España y Suecia) desde el 2004 (Klee *et al.*, 2007). Sin embargo, en trabajos posteriores utilizando muestras de 1995 a 2007 se detectó a *N. ceranae* infectando colonias de abejas melíferas de EUA, Canadá así como Australia (Chen *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2008; Giersch *et al.*, 2009).

En México, existen registros de la presencia de la nosemosis desde 1965; durante las siguientes décadas hasta principios de 1980 se había evaluado la presencia de nosemosis en el país, reportando una prevalencia de 3.8% en colonias, concluyendo que no representaba un problema para la apicultura a nivel nacional (Wilson y Nunamarker, 1993). A principios de 1990 se registró en Yucatán un aumento de un 7.2% al 14.4% en la prevalencia de nosemosis en apiarios comerciales en un periodo de tres años (García-Millán y Quezada-Euán, 1993; Carrillo, 1996), aunque sin generar riesgos para la apicultura.

En 2004, muestras de abejas africanizadas, originalmente para determinar la distribución de *N. apis* en cuatro estados del centro de México, registró la presencia y prevalencia de *N. ceranae* en el 94% de las muestras analizadas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011). Más tarde en Yucatán, se registró una elevada frecuencia del 74% y 53% de nosemosis en colonias manejadas y enjambres silvestres respectivamente (Martínez *et al.*, 2011). Este aumento drástico suponía la presencia de la nueva especie de microsporidio parasitando a abejas de colonias en Yucatán; lo cual fue confirmado en investigaciones posteriores así como los efectos del nuevo patógeno en la producción de miel en colonias de abejas africanizadas en Yucatán (Medina-Medina *et al.*, 2012; Martín, 2013; Soto, 2014).

2.5.5. *Nosema ceranae* y su relación con el Desorden del Colapso de Colmenas (CCD)

A partir del descubrimiento y descripción de *N. ceranae*, en 1994 (Fries *et al.*, 1996), en la abeja asiática *Apis ceranae*, diversos estudios relacionados con su clasificación, virulencia, distribución y su impacto en las abejas *A. mellifera*, fueron más notables ante el surgimiento de evidencias de este patógeno como un posible causante del CCD (Fries *et al.* 2006; Klee *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009). Aunque *N. ceranae* no es considerada como el principal agente causal del CCD, en España se han reportado altas cargas parasitarias de este microsporidio en algunas regiones y se ha asociado con la pérdida de poblaciones de abejas melíferas, lo cual ha generado nuevas perspectivas a cerca de la relación de este patógeno con el fenómeno del colapso de las colonias (Higes *et al.*, 2007; Cox-Foster *et al.*, 2007; Paxton, 2010).

En regiones tropicales como la Península de Yucatán, no se ha reportado la pérdida masiva de colonias debido a las infecciones por *N. ceranae* o pérdida de colonias con los signos característicos del CCD. Sin embargo, la presencia de esta especie de microsporidio se ha incrementado en las infecciones de abejas en Yucatán, así como en su prevalencia de las colonias infectadas (Vargas, 2010; Martín, 2013; Soto, 2014). Este panorama abre un nuevo escenario ante los posibles efectos de este parásito en las colonias de abejas melíferas africanizadas bajo condiciones tropicales, creando así un escenario ideal que permita obtener nuevas evidencias de la influencia de esta parasitosis a nivel individual y de colonia.

3. Objetivos e Hipótesis

3.1. Objetivo General

Evaluar la influencia de *Nosema ceranae* sobre el comportamiento de forrajeo en abejas obreras africanizadas (*A. mellifera* L.) mediante el inicio y la duración de la actividad de forrajeo, así como su longevidad de las obreras bajo condiciones tropicales.

3.2. Objetivos específicos

1.- Determinar la edad de inicio del comportamiento de forrajeo en abejas obreras sanas e infectadas con *N. ceranae*.

2.- Determinar el efecto de *N. ceranae* sobre la duración del comportamiento de forrajeo de las abejas obreras africanizadas (*A. mellifera*) bajo condiciones tropicales.

3.- Determinar el efecto de *N. ceranae* sobre la longevidad de las abejas obreras africanizadas (*A. mellifera*) bajo condiciones tropicales.

3.3. Hipótesis

1.- Abejas obreras africanizadas infectadas con *N. ceranae* inician el comportamiento de forrajeo a edades prematuras en comparación con abejas sanas bajo condiciones tropicales.

2.- La parasitosis causada por *N. ceranae* disminuye el tiempo de actividad de forrajeo de abejas obreras africanizadas a diferencia de abejas sanas bajo condiciones tropicales.

3.- La infección con *N. ceranae* en las abejas obreras de origen africanizado reduce la longevidad en comparación con abejas sanas bajo condiciones tropicales.

4. Referencias

- Adebayo, A., Omoloye, P. y Akinsola, P. 2006. Foraging sources and effects of selected plant characters and weather variables on the visitation intensity of honeybee, *Apis mellifera adansonii* (Hymenoptera: Apidae) in the southwest of Nigeria. *Journal of apicultural Science*. 50: 39-48.
- Alaux, C., Brunet, J-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L., P. y Le Conte, Y. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* 12: 774–782.
- Antúnez, K., Martín Hernández, R., Prieto, L., Meana. A., Zunino, P. y Higes, M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*. 11: 2284-2290.
- Barron, A., Maleszka, R., Vander meer, R. y Robinson, G. 2007. Octopamine modulates honey bee dance behaviour. *The National Academy of Sciences of the USA*. 104: 1703-1707.
- Beekman, M. y Ratnieks, F. 2000. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology*, 14: 490-496.
- Beekman, M., Sumpter, D., Seraphides, N. y Ratnieks, F. 2004. Comparing foraging behaviour of small and large honey-bee colonies by decoding waggle dances made by foragers. *Functional Ecology*, 18: 829-835.
- Beekman, M. y Lew, J. 2007. Foraging in honeybees when does it pay to dance? *Behaviour Ecology*. 255-262.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A. y De la Rúa, P. 2012. The growing prevalence of

- Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science*. 93: 150–155.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A. y Higes, M. 2013. *Nosema spp.* infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*. 44: 25.
- Bray, A. y Nieh, J. 2014 Non-consumptive predator effects shape honey bee foraging and recruitment dancing. *Plos One*. 9:1.
- Calderone, N. y Johnson, B. 2002. The within-nest behaviour of honeybee pollen foragers in colonies with a high or low need for pollen. *Animal Behavior* 63:749–758.
- Camazine, S. 1993. The regulation of pollen foraging by honey bees: how foragers assess the colony's need for pollen. *Behavior Ecology Sociobiology*. 32:265-272.
- Carrillo O. Prevalencia y distribución de *Acarapis woodi* (Rennie) y *Nosema apis* (Zander) en 15 sitios del estado de Yucatán en el año de 1992. Niveles de infestación y susceptibilidad en los ecotipos Africanizados y Europeas de *Apis mellifera* L. (1996). Universidad Autónoma de Yucatán.
- Couvillon, M., Riddell Pearce F., Harris-Jones, E. Kuepfer, A. y Mackenzie-Smith, S. 2012 Intra-dance variation among waggle runs and the design of efficient protocols for honey bee dance decoding. *Biology Open*. 1: 467–472.
- Couvillon, M., Schürch, R. y Ratnieks, F. 2014. Waggle dance distances as integrative indicators of seasonal foraging challenges. *Plos One*. 9:4.
- Cox-Foster, D., Conlan, S., Holmes E., Palacios, G., Evans. J., Moran, N., Quan, P., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D., Martinson, V., van Engelsdorp, D., Kalkstein, A., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison. S., Simons,

- J., Egholm, M., Pettis, J. y Lipkin, W. 2007. A Metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318: 283–287.
- Chen, Y., Evans, J., Smith, I.B. y Pettis, J. 2008. *Nosema ceranae* is a long present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 97:186-188.
- Chen, J., Evans, J., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, H., Xiao, T., Litkowski, A. y Pettis, J. 2009. (a). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 104–109.
- Chen, Y.P., Evans, J.D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., et al. (2009) (b). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J Eukaryot Microbiol* 56: 142–147.
- Dornhaus, A. y Chittka, L. 2004. Why do honey bees dance? *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 55: 395–401.
- Dyer, F. 2002. The Biology of the dance language. *Annual Review of Entomology*. 47:917–49.
- Farina, W., Grüter, C. y Díaz, P. 2005. Social learning of floral odours inside the honeybee hive. *Proceeding of the. Royal. Society*. 272: 1923-1928.
- Eberl, J., Kevan, P. y Ratti, V. 2014. 5 Infectious disease modeling for honey bee colonies. Press Taylor & Francis group.
- Eckert, C., Winston, M., y Ydenberg, R. 1994. The relationship between population size, amount of brood and individual foraging behavior in the honey bee, *Apis mellifera*. *Oecologia* 97:248-255.

- Evans, D. y Schwars, S. 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*. 19: 614-620.
- Farnesi A., Aquino-Ferreira, R., De Jong, D., Bastos, J. y Soares, A. 2009. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria, *Genetics and Molecular. Research*. 8: 635–640.
- Fewell, J. y Page, R. 1993. Genotypic variation in foraging response to environmental stimuli by honey bees, *Apis mellifera*. *Experientia* 49: 1106-1112.
- Forsgren E. y Fries I. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*. 170: 212-217.
- Furgala, B. y Mussen, E. 1990. Protozoa, in: Morse R.A., Nowogrodzki R. (Eds.), *Honey bee pests, predators and diseases*, Cornell University Press, pp. 49–63.
- Free, J. 1967. Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. *Animal. Behavior*. 15:134-44.
- Fries, I., Ekbohm, G. y Villumstad, E. 1984. *Nosema apis* sampling techniques and honey yield. *Journal of Apicultural Research*. 23: 102-105.
- Fries, I. 1988. Comb replacement and *Nosema* disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee colonies. *Apidologie* 19: 343–354.
- Fries, I. 1993. *Nosema apis*. A parasite in the honeybee colony. *Bee world*. 74: 5-19.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S.B. y Pieniazek, N.J., 1996. *Nosema ceranae* n.sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis*

- cerana* (Hymenoptera, Apidae). European Journal of Protistology. 32: 356–365.
- Fries I. y Camazine S. 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission of honey bee epidemiology. Apidologie 32: 199-214.
- Fries, I., Lindström, A., Korpela, S., 2006. Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). Veterinary Microbiology. 114: 269–274.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology. 103:73–79.
- Fries, I., Chauzat, M., Chen, Y., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R., Tanner, G., Webster, T. y Williams, G. 2013. Standard methods for nosema research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. Journal of Apicultural Research. 52.
- García, M., M, Quezada-Euán, J., J. (1993). Distribución de la Nosemosis en apiarios comerciales del estado de Yucatán. Apicultura Moderna. 5:22-24.
- Gallai, N., Salles, J., Settele, J. y Vaissiere, B. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecological Economics.68: 810–821.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M., 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. Apidologie 40: 117–123.
- Gil, M. y De Marco, R. 2010. Decoding information in the honeybee dance: revisiting the tactile hypothesis. Animal Behaviour 80: 887-894.

- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M., Linde, A. y Genersch, E. 2010. Five-year cohort study of *Nosema spp.* in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied Environmental Microbiology*. 76: 3032–3038.
- Goblirsch, M. Huang, Z, Y. Spivak, M. 2013. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *Plos One* 8:3.
- Gould, J,L. And Grant, C, G. 1988. The honey bee. Scientific American Library.
- Gómez-Moracho, T., Bartolomé, C., Bello, X., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Maside, X. 2015. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infection, Genetics and Evolution* 31: 87–94.
- Griffin, R., Smith, M. y Seeley, T. 2012. Do honeybees use the directional information in round dances to find nearby food sources? *Animal behavior* 83: 1319-1324.
- Grüter, C. y Farina, W. 2009. The honeybee waggle dance: can we follow the steps? *Trends in Ecology & Evolution*, 24: 242-247.
- Grüter, C. y Ratnieks, F. 2011. Honeybee foragers increase the use of waggle dance information when private information becomes unrewarding. *Animal Behaviour*, 81: 949-954.
- Grüter, C., Segers, F. y Ratnieks, F. 2013. Social learning strategies in honeybee foragers: do the cost of using private information affect he use of social information? *Animal Behaviour* 85: 1441-1449.
- Higes, M., Martin, R. y Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 93-95.

- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández R. y Meana, A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia), *Journal Invertebrate Pathology*. 94: 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, C., Garrido. B., González-Porto, A., Barrios, L., del Nozal, M., Bernal, J., Jiménez, J., Garcia, P. y Meana, A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10: 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Marín, P. y Meana, A. 2009. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* 1: 495–498.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C. y Martín-Hernández, R. 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Report* 5: 17–29.
- Huang, Z. 2011. Effects of *Nosema* on Honey Bee Behavior and Physiology. *American Bee Journal y Bee culture*.
- Huang, Q., Kryger, P., Le Conte, Y. y Moritz, R. 2012. Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 297–302.
- Huang, W. y Solter, L. 2013. *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. a comparative study in the honey bee host. *Bee culture*. 21-23.
- Huang, W., Solter, L., Aronstein, K. y Huang, Z., 2015. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*.124:107–113.
- Hunt, G., Page, R., Fondrk, M. y Dullum, C. 1995. Major quantitative trait loci affecting honeybee foraging behavior. *Genetics*. 141:1537–1545.

- Hunt G.J., Amdam, G., Schlipalius, D., Emore, C., Sardesai, N., Williams, C., Rueppell, O., Guzmán-Novoa, E., Arechavaleta-Velasco, M., Chandra, S., Fondrk, M., Beye, M. y Page R. 2007. Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense, *Naturwissenschaften* 94: 247–267.
- Huang, Q., Kryger, P., Le Conte, Y. y Moritz, R. 2012. Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 297–302.
- Johnson, B. 2010. Division of labor in honeybees for, function, and approximate mechanisms. *Behavior Ecology and Sociobiology*. 64:305-316.
- Klee, J., Besana, A., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D., Chinh, T., Puerta, F., Ruz, J., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R., 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96: 1–10.
- Kluser, S., Neumann, P., Chauzat, M.P. y Pettis, J. 2010. Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators. *UNEP Emerging Issues*.
- Konzmann, S. y Lunau, K. 2014. Divergent Rules for Pollen and Nectar Foraging Bumblebees – A laboratory study with artificial flowers offering diluted nectar substitute and pollen surrogate. *Plos One*. 9:3.
- Kralj, J. y Fuchs, S. 2010. *Nosema spp.* influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*. 41: 21-28.
- Leonhardt, S., Gallai, N., Garibaildi, L., Kuhlmann, M. y Klein, A. 2013. Economic gain stability of pollination and diversity decrease from southern to northern Europe. *Basic an Applied Ecology* 14: 461-471.

- Martín, L. (2013). Evaluación de los niveles de infestación de *Nosema ceranae* sobre la producción de miel en colonias de abejas africanizadas (*Apis mellifera*) en Yucatán, México. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Martínez, J., Medina, L. y Catzin, G. 2011. Frecuencia de *Varroa destructor*, *Nosema apis* y *Acarapis woodi* en colonias manejadas y enjambres silvestres de abejas (*Apis mellifera*) en Mérida, Yucatán, México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2: 25-38.
- Martínez, J., Leal, G., Conget, P., 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. Parasitology. Research. 111: 601–607.
- Mayack, C. y Naug D. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. Journal of Invertebrate Pathology.100: 185–188.
- Medina, L. y May-Itza, W. 2005. Enfermedades de las abejas. (Mérida Yucatán México ed.). Mérida, Yucatán, México.
- Michener, C. 2007. The Bees of the World, 2nd ed. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Morse, R. y Flottum, K. 1997. Honey Bee Pests Predators and Diseases. A.I. Root Co, Medina, Ohio.
- Morse, R. y Calderone, N. 2000. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. Bee Culture 1–15.
- Muñoz, I., Cepero, A., Pinto, M., Martín-Hernández, R., Higes, M. y De la Rúa, P. 2014. Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. Infection, Genetics and Evolution 23: 161-168.

- Naug D. y Camazine S. 2002. The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *Journal of Theoretical Biology*. 215: 427-439.
- Neumann P. y Carreck N. 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49: 1-6.
- Norgate, M. Boyd-Gerny, S., Simonov V., Rosa, M. y Heard, T. 2010. Ambient Temperature Influences Australian Native Stingless Bee (*Trigona carbonaria*) Preference for Warm Nectar. *Plos One* 5:8.
- Pankiw, T., Page, R. y Fondrk, K. 1998. Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees, *Apis mellifera* L. *Behavior Ecology and Sociobiology* 44:193–198
- Pankiw, T. y Page, R. 2001. Genotype and colony environment affect honeybee (*Apis mellifera* L.) development and foraging behavior. *Behavior Ecology and Sociobiology* 51:87–94.
- Pankiw, T., Roman, R., Sagili, R. y Zhu-Salzman, K. 2004. Pheromone-modulated behavioral suites influence colony growth in the honey bee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 91:575–578.
- Paxton, R. 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)?. *Journal of Apicultural Research* 49: 80-84.
- Page, Jr., Erber, J. y Fondrk, M. 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*. 182: 489-500.
- Pankiw, T., Page, R. y Fondrk, K. 1998. Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees, *Apis mellifera* L. *Behavior Ecology and Sociobiology* 44:193–198.

- Pankiw, T. y Page R. 2001. Genotype and colony environment affect honey bee (*Apis mellifera* L.) development and foraging behavior. *Behavior Ecology and Sociobiology* 51:87–94.
- Pankiw, T., Roman, R., Sagili, R., y Zhu-Salzman, K. 2004. Pheromone-modulated behavioral suites influence colony growth in the honey bee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 91:575–578.
- Quezada-EUAN, J.G. 2010. Biología y diversidad de la abeja melífera (Mérida Yucatán México ed.). Mérida, Yucatán, México.
- Riley, J., Greggers, A., Smith, D., Reynolds, y Menzel. 2005. The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. *Nature* 435: 205–207.
- Sagili, R. y Pankiw, T., 2007. Effects of protein-constrained brood food on honey bee (*Apis mellifera* L.) pollen foraging and colony growth. *Behavior Ecology and Sociobiology* 61:1471–1478.
- Soto, C. 2014. Efectos de la inoculación de esporas de *Nosema ceranae* (Microsporidia) y detección del virus de alas deformes (DWV) en la abeja nativa sin aguijón *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini) en Yucatán, México. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Slessor, K., Winston, M. y Le Conte Y. 2005. Pheromone communication in the honeybee. *Journal of Chemical Ecology* 31 2731-2745.
- Seeley T. 1995. *The wisdom of the hive*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Seeley, T., Mikheyev, A. y Pagano, G. 2000. Dancing bees tune both duration and rate of waggle-run production in relation to nectar-source profitability. *J. Comp. Journal of Comparative Physiology*. 186: 813-819.

- Schürch, R., Couvillon, M., Burns, D., Tasman, K., Waxman, D., y Ratnieks, F. 2013. Incorporating variability in honey bee waggle dance decoding improves the mapping of communicated resource locations. *Journal of Comparative Physiology A* 199: 1143–1152.
- Simone-Finstrom, M. y Spivak, M. 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41: 295-311.
- Spivak, M. Vaughan, E. y Euliss, N. 2011. The Plight of the Bees. *Environment. Science and Technology*. 45: 34–38.
- Tautz, J. 2008. *The Buzz about Bees. Biology of a Superorganism*. Springer, Heidelberg.
- Tautz, J., Zhang, S., Spaethe, J., Brockmann, A. y Srinivasan, M. 2004. Honeybee Odometry: Performance in varying natural terrain. *Plos One*. 2: 7.
- Tanner, D. y Visscher, P. 2008. Do honey bees average directions in the waggle dance to determine a flight direction? *Behavior Ecology and Sociobiology* 62: 1891–1898
- Tanner, D y Visscher, K. 2009. Does the body orientation of waggle dance followers affect the accuracy of recruitment? *Apidologie* 40: 55–62.
- Toufaily, H., Couvillon, M., Ratnieks, F. y Grüter, C. 2013. Honey bee waggle dance communication: signal meaning and signal noise affect dance follower behavior. *Behavior Ecology and Sociobiology* 67: 549-556.
- Trhlin, M. y Rajchard, J. 2011. Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Reviews in Veterinary Medicine*. 56: 265–273.
- Van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J. y Chlebo, R. 2012. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *J Apiculture Research* 51: 100–114.

- Van der zee, R., Gómez-Moracho, T., Pisa, L., Sagastume, S., García-Palencia, P., Maslde, X., Bartolome, C., Martin-Hernandez, R. y Higes, M. 2014. Virulence and polar tuve protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidian) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberensis*). Environmental Microbiology Reports. 1-13.
- Vargas, A. (2010). Eficacia de la Fumagilina y timol en el control del parásito *Nosema spp.*, en abejas africanizadas (*Apis mellífera*). Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R. y Vigue`s, B. 2011. Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. Plos One 6:6.
- Visscher, P. y Seeley, T. 1982. Foraging strategy of honeybee colonies in temperate deciduous forest. Ecology 63: 1790-1801.
- von Frisch K. 1967. The dance language and orientation of bees. Cambridge (MA): Harvard University Press.
- Wang I. y Moeller F. 1970. The division of labor and queen attendance behavior of *Nosema* infected worker honey bees, Journal of Economic Parasitology. 63: 1539–1541.
- Wilson T.; Nunamarker R. A. 1983. The incidence of *Nosema apis* in honeybees in Mexico. Bee World 64: 132-136.
- Williams, G., Shafer, A., Rogers, R., Shutler, D. y Stewart, D. 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. Journal of Invertebrate Pathology 97:189-192.

Winston M. 1987. The biology of the Honey Bee. Harvard Univ. Press. Londres, Inglaterra.

Woyciechowski, M. y Kozłowski, J. 1997. Division of labor by division of risk according to worker life expectancy in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 29: 191-205.

Artículo: *Nosema ceranae* induces precocious foraging, reduces foraging duration and decreases longevity in Africanized honey bees.

(Formato: Revista Apidologie)

Autores:

F. A. Fleites-Ayil. *

Fernando. Puerto-Manzano.

José Javier G. Quezada-Euán.

Luis A. Medina Medina.

Adscripción:

Departamento de Apicultura; Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Universidad Autónoma de Yucatán, Apdo. postal 4-116, Mérida, Yucatán, México,
97100.

Email:

fernandofleitesayil@gmail.com

mmedina@uady.mx

queuan@uady.mx

Título corto: *N. ceranae* and foraging behaviour in Africanized honey bees.

Resumen

En la presente investigación se evaluó la influencia de la infección con dos concentraciones de *N. ceranae* (10,000 y 50,000 esporas/abeja en 10 µl de jarabe de azúcar), sobre la edad de inicio y duración de la actividad de forrajeo, así como la longevidad de abejas melíferas africanizadas en comparación con abejas libres de la infección (alimentadas con 10 µl de jarabe de azúcar/abeja). Existieron diferencias significativas entre ambos niveles con abejas infectadas comparado con el grupo de abejas sanas, sin embargo no existieron diferencias significativas entre tratamientos de infección; ambos grupos infectados forrajearon prematuramente ($\bar{X} \pm E.E. = 14.9 \pm 0.11$ y 14.6 ± 0.12 días) y tuvieron una menor duración de actividad de forrajeo (7.6 ± 0.34 y 8.3 ± 0.35 días). En la evaluación de longevidad, se presentó una longevidad menor en las abejas infectadas que en las abejas sanas (Log-Rank Test $X^2 = 274.08$ $p = 0.001$), con valores de 21 y 31 días de edad respectivamente; no existieron diferencias entre ambos niveles de infección. El impacto negativo de *N. ceranae* sobre el comportamiento de forrajeo y longevidad evaluadas en esta investigación son semejantes al registrado en abejas de regiones templadas, lo cual prueba la susceptibilidad de las abejas africanizadas a esta enfermedad.

1. Introducción

La nosemosis causada por *Nosema. ceranae* influye negativamente en el sistema inmune de las abejas melíferas, causando altas tasas de mortalidad de los individuos debido a la mayor producción de esporas infecciosas que afectan rápidamente los tejidos digestivos y sistema nervioso de las abejas melíferas, a diferencia de la infección causada por la especie *N. apis* (Huang *et al*, 2012; Huang *et al.*, 2015).

Otros efectos negativos de esta enfermedad se han registrado en el cambio de las diferentes actividades de forrajeo así como en la reducción de la longevidad en las obreras (Woyciechowski y Morón, 2009; Goblirsch *et al.*, 2013); Estos efectos negativos sobre la fisiología, comportamiento y longevidad, pueden ocasionar el colapso de las colonias de abejas melíferas en climas templados, desarrollando el fenómeno conocido como Desorden del Colapso de las Colonias (CCD por sus siglas en inglés) (Furgala y Mussen, 1990; Forsgren y Fries, 2010; Fries, 2010; Goblirsch *et al.*, 2013; Huang y Solter, 2013; Huang *et al.*, 2015).

En México así como en regiones tropicales como Yucatán, las pérdidas de colonias a causa del CCD no han sido observadas. Sin embargo, en años recientes se ha documentado la presencia, establecimiento e incremento en la frecuencia y prevalencia de *N. ceranae*, debido posiblemente a las altas temperaturas de la región, así como también se ha evaluado el impacto de este parásito sobre la producción de miel en Yucatán (Gisder *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011; Medina-Medina *et al.*, 2012; Martín, 2013).

Actualmente, existen evidencias de los efectos negativos de la nosemosis causada por *N. ceranaea* en la fisiología, comportamiento y longevidad de las abejas melíferas de climas templados, asociados al CCD en diferentes regiones del mundo. Sin embargo, aún no se ha realizado ninguna evaluación sobre los efectos de la nosemosis causada por *N. ceranae* sobre el comportamiento de forrajeo ni en la longevidad de abejas melíferas africanizadas; ambos elementos son importantes para el establecimiento, reproducción así como el aprovechamiento de las colonias de abejas africanizadas en Yucatán México.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de la nosemosis causada por el microsporidio *N. ceranae*, sobre la edad de inicio y duración de la actividad del comportamiento de forrajeo así como de la longevidad en abejas melíferas africanizadas bajo condiciones tropicales.

2. Materiales y métodos

2.1. Sitio de estudio

Este trabajo fue realizado durante el período de Marzo de 2014 a Febrero de 2015 en el Departamento de Apicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, ubicada en Xmatkuil, Yucatán, México.

2.2. Identificación de esporas de *N. ceranae*

Con la finalidad de confirmar que *N. ceranae* es la especie de microsporidio que se encontraba infectando a las abejas africanizadas de los apiarios experimentales, se procedió a coleccionar abejas obreras adultas bloqueando las piqueras de 21 colonias de las cuales se obtuvieron cerca de 100 abejas forrajeadoras adultas provenientes del campo. Estas abejas fueron colocadas en frascos plásticos con alcohol al 70% para su preservación y transporte al laboratorio del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi.

En el laboratorio, se procedió a macerar 60 abdómenes frescos de abejas por cada muestra (Fries *et al.*, 1984), a los cuales se le agregaron 30 ml de agua. El producto del macerado se filtró con ayuda de una tela de malla tipo tul con agujeros de 0.2 mm x 0.2 mm, y se utilizó 1 ml de la solución filtrada y se colocó en viales de 1.5 ml, para posteriormente centrifugar por 5 minutos a 5,000 rpm, decantando el sobrenadante para obtener el concentrado de esporas (Klee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

Posteriormente, debido a que la espora de *Nosema spp.* presenta una exoespora resistente, se requirió de un tratamiento especial para romperla y exponer el material genético y extraer el ADN (Chen *et al.*, 2009). Para ello se congeló el concentrado introduciendo la muestra en nitrógeno líquido durante 10 segundos. El concentrado se pulverizó con una punta de micropipeta estéril (Klee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

La extracción del ADN se realizó mediante los protocolos descritos por Chomczynski y Sacchi, 1987; INVITROGEN, 2014 (Anexo 1).

Para la identificación de la presencia de ADN de *Nosema* en las muestras de abejas se utilizó el análisis de PCR punto final, basándose en el alineamiento de la secuencia conservada de la pequeña subunidad (SSU) del gen 16S del ARN ribosomal (ARNr) (Chen *et al.*, 2007) (Anexo 2). Se consideraron muestras positivas a *Nosema* sp., *N. ceranae* y *N. apis*, los amplificados de 208, 250 y 401 pb, respectivamente (Chen *et al.*, 2007).

2.3. Determinación del origen genético de las obreras provenientes de las colonias experimentales

La determinación del origen genético de las colonias consistió en el análisis de ADN mitocondrial por medio de RFLP's, a través del cual se pudo determinar el miotipo ya sea de origen africano o europeo. Se amplificaron por PCR los fragmentos de la unidad citocromo-oxidasa I (COI) y el fragmento de la unidad ribosomal (ARNIs). Estos fragmentos fueron digeridos respectivamente por las enzimas de restricción *HincII* y *EcoRI* (Sheppard y Smith, 2000; Domínguez, 2009) (Anexo 3).

Los fragmentos digeridos con *EcoRI* que presentaron una longitud de 480-484 pb se consideraron como miotipo europeo del este, mientras que los fragmentos digeridos con *HincII* que presentaban fragmentos de 440-590 pb fueron considerados como colonias con miotipo europeo del oeste. Colonias que no

presentaran fragmentos en los procesos de digestión fueron consideradas como colonias con miotipo africano (Hall y Smith, 1991; Domínguez, 2009).

2.4. Instalación de colmenas de observación para evaluar el comportamiento de forrajeo

Se instalaron tres colmenas de observación de madera (60 cm x 30 cm x 4.5 cm) con paredes de cristal a ambos lados. Se dispusieron tres orificios utilizados como respiraderos así como un orificio con función de entrada conectada al exterior a través de un tubo de plástico de 30 cm de longitud por 5 cm de diámetro.

Las tres colmenas de observación se establecieron con dos panales tipo Langstroth conteniendo miel, polen, cría abierta, cría operculada, aproximadamente 5,000 abejas adultas y una reina joven provenientes del apiario experimental de la FMVZ. Las abejas reinas utilizadas en este trabajo fueron medias hermanas apareadas libremente, lo cual redujo la variabilidad genética que puede influir en las observaciones.

2.5. Obtención de esporas de *N. ceranae*, infección y marcación de abejas obreras

A través de los resultados de biología molecular se registró la presencia de *N. ceranae* en siete colonias del apiario experimental. Con base a estos resultados, las abejas utilizadas en los experimentos de infección procedieron de cuatro colonias identificadas con la presencia de *N. ceranae*. Las colonias fueron tratadas

con Fumagilina®, administrando 1.2 g del producto en 1 L de jarabe de azúcar (2:1) como medio de aplicación semanal, durante un mes (Higes *et al.*, 2007).

Este tratamiento se implementó únicamente a estas colonias, con el objetivo de obtener panales de abejas obreras próximas a emerger libres de la enfermedad. La eficacia de la Fumagilina® se ha evaluado en abejas africanizadas en Yucatán, obteniendo una reducción significativa en los niveles de infección de esta parasitosis en las colonias tratadas con este antibiótico (Vargas, 2010).

Los panales tratados fueron incubados en una cámara de crecimiento ambiental (Line® modelo 850 H) a 36° C con una humedad relativa (RH) del 70 % durante 24 horas antes de que las abejas emergieran de las celdas con la finalidad de contar con abejas recién emergidas de 1 a 3 días de edad. Las abejas se mantuvieron sin alimentación durante una hora previo a la infección.

Para obtener el concentrado de esporas, necesario en la infección, se utilizaron las tres colonias restantes infectadas con *N. ceranae*. El concentrado se obtuvo colectando 200 abejas forrajeadoras, mediante el uso de una red entomológica y bloqueando las entradas (piqueras) de las colonias seleccionadas (Human *et al.*, 2013). En laboratorio, se filtraron las esporas con el mismo procedimiento implementado en la identificación de la especie.

Al obtener el concentrado se procedió a realizar el conteo de esporas a través de una cámara de Neubauer calculando la cantidad de esporas por microlito (Human *et al.*, 2013; Fries *et al.*, 2013). Se establecieron los tres tratamientos del

experimento: dos niveles de infección de 10,000 y 50,000 esporas de *N. ceranae* en 10µl de jarabe de azúcar (solución de sacarosa al 50% v/v) por cada abeja y el grupo control, tratadas con 10µl de jarabe de azúcar por abeja pero sin esporas de *N. ceranae* (libres de la enfermedad). Se utilizaron dos niveles de infección para identificar si existían o no diferencias entre ambos tratamientos con *N. ceranae*. Por otro lado a través de ambos niveles de infección es posible registrar los efectos de la parasitosis causada por *N. ceranae* sobre las abejas melíferas (Goblirsch *et al.*, 2013; Soto 2014; Eiri *et al.*, 2015).

La infección de las abejas se realizó utilizando una micropipeta de 10 µl, suministrando de forma oral el jarabe y utilizando puntas plásticas distintas por cada abeja. Las obreras que no consumían el jarabe con el tratamiento fueron desechadas (Higes *et al.*, 2007; Kralj y Fuchs, 2010; Goblirsch *et al.*, 2013).

Se tuvieron tres repeticiones por cada tratamiento (cada tratamiento de 60 abejas). Las abejas de cada tratamiento fueron introducidas en cada una de las tres colonias experimentales (540 individuos) y en total se inocularon 1,620 obreras recién emergidas.

Las abejas utilizadas en los tres tratamientos fueron marcadas posterior a la infección utilizando placas plásticas numeradas y con diferentes colores (Opalite®), con la finalidad de diferenciar a los individuos pertenecientes a cada uno de los diferentes tratamientos (Human *et al.*, 2013).

Finalmente, las abejas fueron almacenadas durante 24 horas dentro de una cámara de crecimiento ambiental (Line® modelo 850 H), a una temperatura de 36° C con una humedad relativa (RH) del 70 % colocadas en cajas experimentales de madera (Scheiner *et al.*, 2013). Estas cajas tenían una dimensión de 10x10x8cm con malla metálica en la parte posterior y un cristal deslizante en la parte frontal, cada caja tenía una perforación superior y otra lateral, y en ambas perforaciones se colocó un vial con capacidad de 1.5 ml con jarabe de sacarosa al 50 % v/v.

Este manejo se realizó con la finalidad de descartar individuos muertos por el manejo durante el proceso de infección y marcación. Después del periodo de 24 horas los grupos o cohortes de abejas infectadas y el control fueron introducidos en cada una de las colonias experimentales hasta cumplir el número de repeticiones para cada tratamiento en cada una de las tres colonias. Este procedimiento se realizó durante un período de 15 días.

2.6. Variables registradas

Para obtener los días de inicio de actividad de forrajeo se realizaron censos diarios implementando un muestreo de barrido; este consistió en observar cuidadosamente las abejas marcadas en ambos panales y a ambos lados de las tres colmenas experimentales (Kolmes, 1984). Los registros del comportamiento se realizaron todos los días durante un período de 45 días, durante las primeras horas de la mañana. En cada día, se realizaron cinco observaciones de 20 minutos en cada una de las colmenas de observación hasta cubrir una hora (en total tres horas al día), y las observaciones se alternaron sin seguir un orden.

Para registrar el inicio de forrajeo se verificó que las obreras marcadas ingresaran a la colonia con cargas de polen, realizarán transferencia de líquidos (néctar o agua), así como transferencia de información a través de danzas (danza del círculo o la danza de coleteo) debido a que estas actividades están relacionadas con el comportamiento de forrajeo (Natsopoulou *et al.*, 2015).

Por otro lado, la longevidad de las obreras se obtuvo contabilizando los días que vivían los individuos marcados pertenecientes a cada uno de los tratamientos durante un período de 45 días. Las observaciones se realizaron de manera similar a como se registró el inicio de forrajeo, sin embargo, estas observaciones se realizaron al final del día para asegurar el mayor número de observaciones de abejas que durante el transcurso del día podrían haber estado forrajeando. Esta variable se registró con la ausencia de los individuos marcados dentro de las colmenas. Se consideró muertos a los individuos después de cinco días de ausencia dentro de la colmena, sin embargo si los individuos con cinco días de ausencia se visualizaban de nuevo, se continuaba contabilizando su longevidad.

La duración de actividad de forrajeo se obtuvo con los datos de los días de inicio de actividad de forrajeo así como con los datos de días de longevidad registrados durante todo el período de observación para cada obrera; con la finalidad de evaluar la diferencia en las actividades de forrajeo de las abejas infectadas y sanas de los tres tratamientos (Arathi *et al.*, 2000).

2.7. Análisis estadísticos

El inicio de la actividad de forrajeo así como la duración de esta actividad entre abejas sanas e infectadas fueron analizadas a través de un análisis de varianza de dos vías (Tratamiento y Colonia); y se utilizó una prueba múltiple de rangos a través de la prueba HSD de Tukey para comparar las diferencias entre las medias de ambos factores. Los datos del inicio de la actividad de forrajeo fueron transformados a logaritmo¹⁰ para cumplir con los supuestos de distribución normal de residuos y homogeneidad de varianzas. Todos los valores son reportados como promedio \pm un error estándar. La longevidad de abejas obreras sanas y enfermas fueron comparadas a través de una prueba de Ranqueo (Log-Rank Test; Machin *et al*, 2006). Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion versión XV (StatPoint Inc, 2006).

3. Resultados

3.1. Identificación de esporas de *N. ceranae*

A través de la prueba de PCR punto final, aplicada a las abejas obreras africanizadas de las 21 colonias, se constató la presencia de *N. ceranae* en todas las colonias evaluadas (Figura 1A). Mientras que *N. apis* se registró en 14 colonias (Figura 1B) pertenecientes al apiario experimental. Es importante mencionar que en algunas colonias se registraron infecciones mixtas, sin embargo, siete colonias presentaron infecciones únicamente con *N. ceranae*.

3.2. Origen genético de las abejas de las colonias experimentales

El análisis del ADN mitocondrial, constató la presencia de bandas de restricción características de las abejas de origen africano (*Apis mellifera scutellata*) las cuales fueron predominantes en tres de las cuatro colonias evaluadas (C1, C2 y C4); una de las colonias (C3) amplificó a miotipo de abejas europeas del Este (EE) (Figura 2). Las tres colonias que presentaron bandas de restricción características de las abejas de origen africano fueron utilizadas en este trabajo para evaluar la infección de *N. ceranae* sobre las variables relacionadas con el comportamiento de forrajeo.

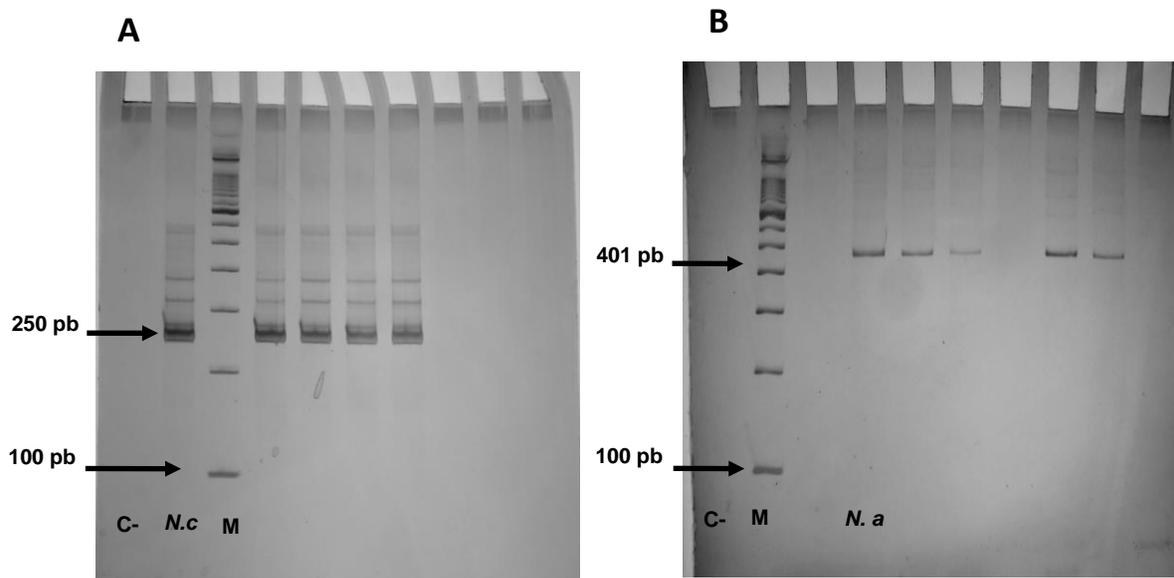


Figura 1.- Resultados de la Prueba de PCR punto final para determinar la especie de *Nosema* infectando a colonias del apiario experimental. C- = control negativo; *N. c* = *Nosema ceranae*; *N. a* = *Nosema apis*; M Marcador molecular 100 pb. A. Positivo para *N. ceranae*, 250 pb; B. Positivo para *N. apis*, 401 pb.

3.3. *Nosema ceranae* y su efecto en el inicio de comportamiento de forrajeo

Se registró el inicio de actividades de forrajeo durante un periodo de 45 días. Se observaron un total de 1,030 individuos de los cuales 421 pertenecieron al grupo control (sin infección), 309 al T1 (infectadas con 10,000 esporas) y 300 individuos para el T2 (infectadas con 50,000 esporas).

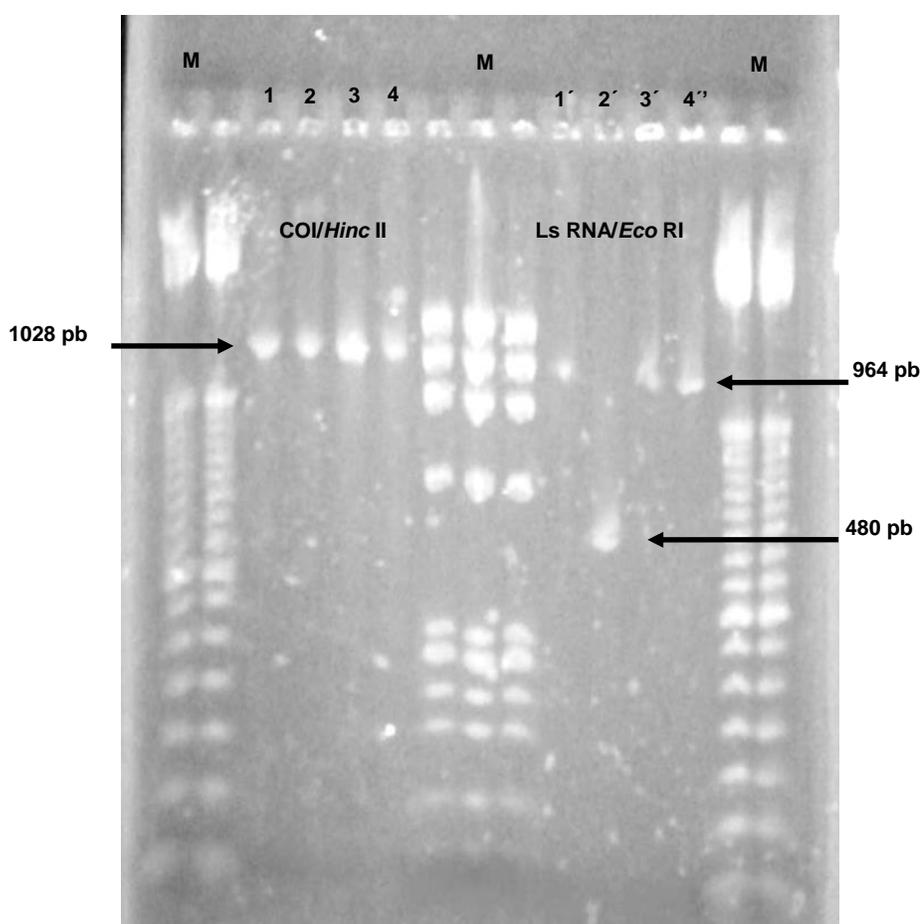


Figura 2.- Resultados del análisis del ADN mitocondrial para la identificación del origen genético de las abejas obreras utilizadas en esta investigación. Gel con los fragmentos amplificados de los genes COI y LsRNA y digeridos con *Hinc II* y *Eco RI* respectivamente. M= Marcador; 1028 pb y 964 pb corresponde a abejas africanizadas; 480 pb corresponde a abejas europeas del este.

Los resultados del análisis de varianza de dos vías constató la existencia de diferencias significativas entre ambos factores (abejas infectadas y no infectadas). El factor tratamiento presentó diferencias significativas ($F_{2,1030} = 1398.32$; $p=0.001$) (Cuadro 1), y a través de una prueba HSD de Tukey se obtuvieron las diferencias

Cuadro 1. Efecto de tratamiento y colonia sobre el inicio de actividad de forrajeo de las abejas melíferas africanizadas bajo infección de *N. ceranae*.

Fuente	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor p
Tratamiento	2	15250.3	7625.15	1398.32	0.001
Colonia	2	205.079	102.54	18.80	0.001
Interacción	4	22.7867	5.69666	1.04	0.383
Residuos	1021	5567.6	5.45308		
Total corregido	1029	21300.8			

La $p < 0.05$ indica diferencias significativas.

estadísticas entre las medias de los tres tratamientos.

En grupos de obreras infectadas con diferentes niveles de esporas de *N. ceranae*, realizaron un forrajeo prematuro a edades similares a diferencia de las abejas libres de la enfermedad. Las abejas obreras infectadas con 10,000 esporas iniciaron esta actividad a los 14.9 ± 0.11 días de edad, mientras que las obreras infectadas con 50,000 esporas iniciaron sus actividades de forrajeo a los 14.7 ± 0.12 días de edad. Por el contrario, las abejas libres de la enfermedad iniciaron

sus actividades de forrajeo a los 22.7 ± 0.14 días de edad (Figura 3). Estos resultados indican que las abejas infectadas independientemente del número de esporas inoculadas, inician sus actividades de forrajeo a edades similares, y con aproximadamente ocho días de diferencia que las abejas no infectadas.

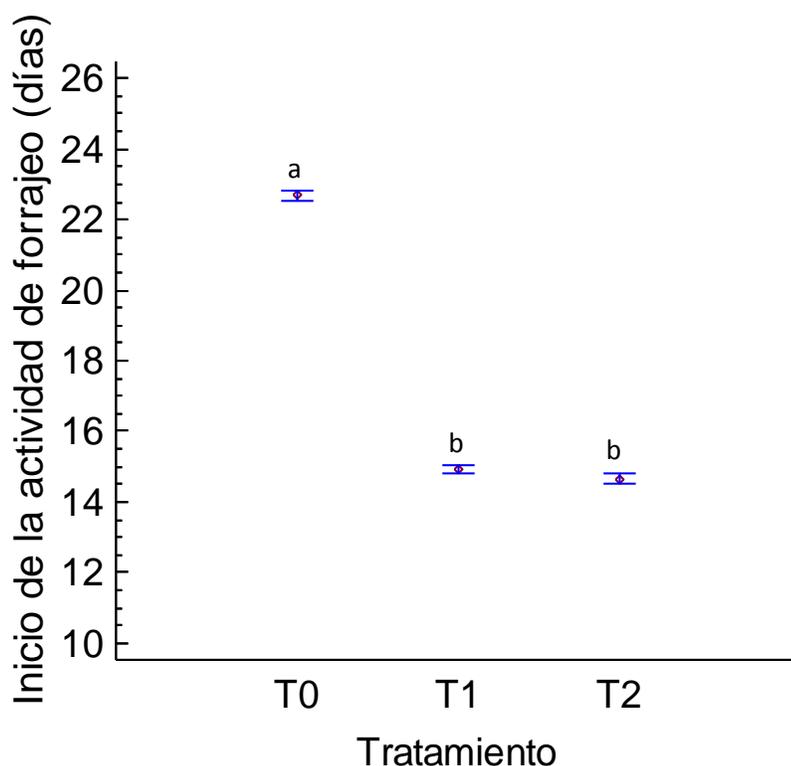


Figura 3.- Medias y errores estándar de días de inicio de actividad de forrajeo entre las abejas infectadas y las abejas libres de la enfermedad ($p= 0.001$). No se registraron diferencias entre los tratamientos con abejas infectadas. Abejas libres de la enfermedad (T0), abejas infectadas con 10,000 esporas (T1) y abejas infectadas con 50,000 esporas (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas entre los tres tratamientos.

El factor colonia presentó diferencias estadísticas ($F_{2,1030} = 18.80$; $p = 0.001$) (Cuadro 1). A través de una prueba HSD de Tukey se obtuvo las diferencias entre las medias de las colonias. Las abejas pertenecientes a la colonia 1 y 2

forrajearon prematuramente a los 17.8 ± 0.22 días y 17.6 ± 0.25 días a diferencia de las abejas de la colonia 3, las cuales forrajearon a los 18.8 ± 0.27 días. No existieron diferencias significativas en la interacción de los factores Tratamiento y Colonia (Cuadro 1).

3.4. Duración de la actividad de forrajeo

Los resultados del análisis de varianza de dos vías constató la existencia de diferencias significativas entre ambos factores (abejas infectadas y abejas sanas). Se observaron diferencias significativas en la duración de la actividad de forrajeo entre las abejas infectadas y las abejas no infectadas ($F_{2,1028} = 9.07$; $P < 0.001$) (Cuadro 2). A través de una prueba HSD de Tukey se registraron las diferencias estadísticas entre las medias; y los resultados indican que las abejas obreras infectadas con *N. ceranae* presentaron un menor periodo de actividad de forrajeo ($T_1 = 7.7 \pm 0.34$ días; $N = 308$ y $T_2 = 8.3 \pm 0.35$ días; $N = 297$) comparado con las abejas no infectadas las cuales presentaron una duración de la actividad del forrajeo de 9.59 ± 0.31 días ($N = 423$; Figura 4).

Estos resultados indican que abejas africanizadas infectadas con dos diferentes niveles de concentración con esporas de *N. ceranae* no presentan diferencias estadísticas entre ellas, sin embargo comparando ambos de infección con las abejas sanas, se registró un día de diferencia en la duración de la actividad de forrajeo.

Se registró un efecto de la colonia en la duración de actividad de forrajeo ($F_{2,1028} = 35.99$; $P < 0.001$) (Cuadro 2). A través de una prueba HSD de Tukey se obtuvo las diferencias entre las medias de las colonias. Las abejas pertenecientes a la colonia 3 tuvieron un tiempo de actividad de forrajeo menor de 6.34 ± 0.29 días a diferencia de las colonias 1 y 2 con tiempos de actividad de forrajeo similares de 9.63 ± 0.34 y 9.91 ± 0.32 días, respectivamente. No existieron diferencias significativas en la interacción de factores Tratamiento y Colonia (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de Tratamiento y Colonia sobre la duración de la actividad de forrajeo de las abejas melíferas africanizadas bajo infección de *N. ceranae*.

Fuente	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor <i>p</i>
Tratamiento	2	609.595	304.797	8.49	0.001
Colonia	2	2665.54	1332.77	37.10	0.001
Interacción	4	326.753	81.6883	2.27	0.059
Residuos	1019	36604.3	35.9217		
Total corregido	1027	40124.4			

La $p < 0.05$ indica diferencias significativas.

3.5. *N. ceranae* y longevidad de las abejas obreras africanizadas

Se registró la longevidad de 1,528 individuos pertenecientes a los tres tratamientos considerando a las obreras que marcadas, e introducidas en las colonias de observación. Las abejas infectadas tuvieron una menor longevidad a diferencia de las abejas libres de la enfermedad. Las abejas pertenecientes al T1

(10,000 esporas, N= 483) presentaron una menor longevidad a diferencia del grupo control (N= 561) (Figura 5 Log-Rank test $X^2= 267.05$ $p= 0.001$).

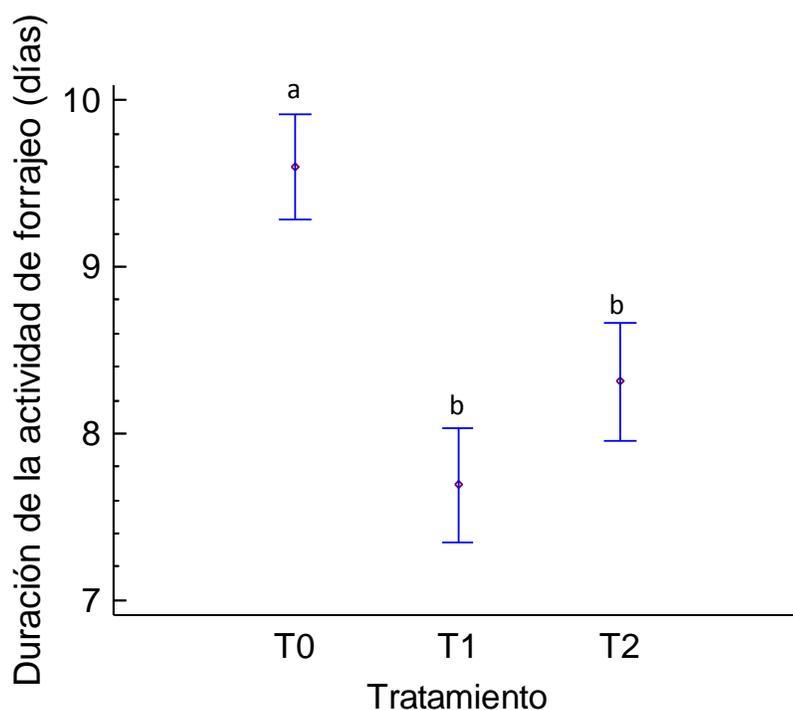


Figura 4.- Letras diferentes indican diferencias significativas entre los días de actividad de forrajeo de ambos tratamientos de infección (10,000 esporas (T1) y 50,000 esporas (T2)) con el grupo control con un nivel del 95% de confianza. ($p= 0.001$).

Las abejas obreras del T2 (50,000 esporas, N= 484), registraron también una menor longevidad comparado con el grupo libre de la enfermedad (Figura 5 Log-Rank Test $X^2= 274.08$ $p= 0.001$). No existieron diferencias estadísticas entre ambos niveles de infección (Figura 5 Log-Rank Test $X^2= 0.037$ $p= 0.847$). La edad en la cual se obtuvo el 50 % de mortalidad de las obreras fue de 22 días para las abejas del T1 y T2 y de 31 días para las obreras del grupo control.

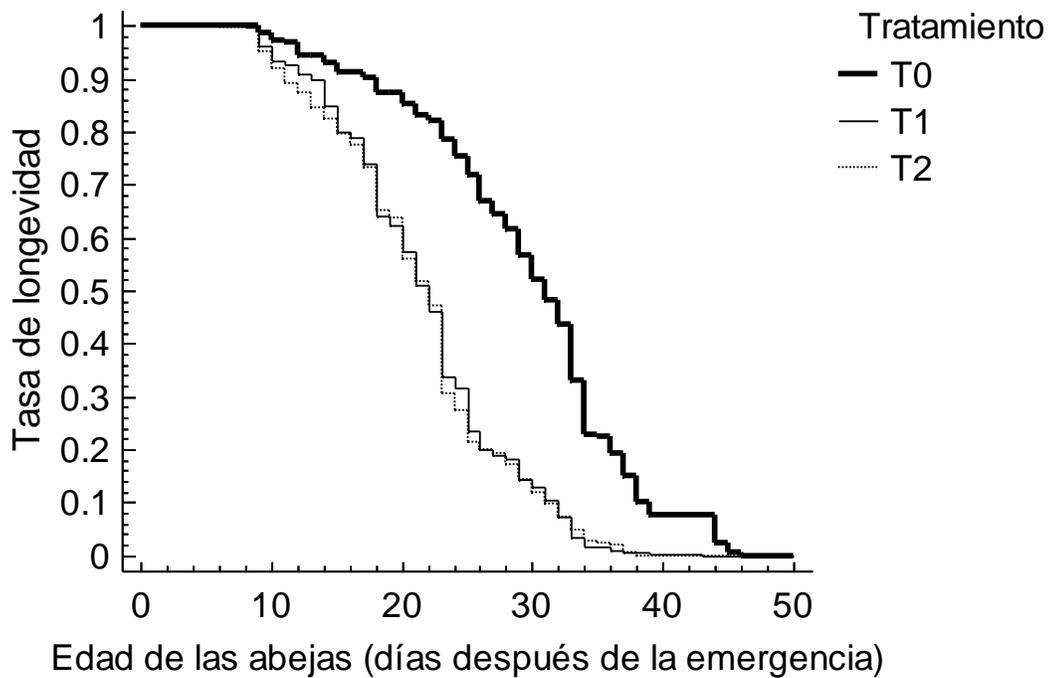


Figura 5.- Las abejas melíferas africanizadas pertenecientes a los tratamientos con diferentes niveles de infección tienen una longevidad menor a diferencia de las abejas del tratamiento control. La edad a la cual se obtiene un 50 % de las muertes para los grupos con diferentes niveles de infección (T1 y T2) fue a los 22 días, mientras que el 50 % de las muertes registradas en las abejas libres de la enfermedad (T0) se presentó hasta el día 31.

4. Discusión

Los resultados obtenidos a través de las pruebas de biología molecular confirman la presencia de la especie de microsporidio *N. ceranae* infectando a las abejas africanizadas en Yucatán. Así también, se identificó el origen genético africano de las colonias utilizadas durante esta investigación.

4.1. *Nosema ceranae* y su efecto en el inicio de comportamiento de forrajeo

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que existieron diferencias en el comportamiento de forrajeo de las abejas infectadas y las abejas libres de la enfermedad. Así también, se observó que no existen diferencias significativas para el inicio de forrajeo entre los tratamientos de infección con esporas de *N. ceranae* (10,000 y 50,000 esporas), indicando que las abejas enfermas por *N. ceranae* se ven afectadas de manera similar para esta característica independientemente de la cantidad de esporas que reciben en la infección inicial. En la presente investigación se observó que las abejas infectadas de ambos tratamientos, inician las actividades de colecta de alimentos (polen y néctar) y las danzas para indicar los sitios de forrajeo ocho días antes de que este comportamiento sea registrado en las abejas libres de la enfermedad.

Woyciechowski y Morón (2009), registraron los efectos negativos de *N. apis* en el inicio de forrajeo de las abejas infectadas. Los resultados obtenidos por estos autores son similares a los obtenidos en este trabajo ya que observaron que las abejas infectadas con *N. apis* comenzaron a iniciar sus actividades de forrajeo de 5 a 11 días antes que las abejas libres de la enfermedad, lo que indica que independientemente de la especie de *Nosema* utilizada en la infección, las abejas enfermas realizan las actividades de forrajeo prematuramente en comparación con las abejas libres de la enfermedad. Por otro lado, investigaciones realizadas con infecciones mixtas (*N. apis* y *N. ceranae*) han registrado efectos similares en el inicio de forrajeo a edades prematuras (6 a 7 días) comparado con abejas obreras

no infectadas (Kralj y Funchs, 2010). Recientemente, ante la presencia de la nueva especie *N. ceranae* infectando a las abejas de origen europeo, se evaluó el inicio de forrajeo utilizando infecciones con inoculaciones de 10,000 esporas por abeja; los resultados obtenidos en promedio fue de ocho días de diferencia para esta actividad en comparación con el grupo control (Goblirsch *et al.*, 2013).

Las condiciones de infección así como los resultados obtenidos por Goblirsch *et al* (2013), se asemejan a obtenidos en esta investigación, lo cual aparentemente indica que sin distinción entre el origen genético de las abejas (abejas europeas o abejas africanizadas), la infección causada por *N. ceranae* tiene una influencia negativa en el inicio de actividad de forrajeo.

4.2. Duración de la actividad de forrajeo

En promedio se observó que bajo condiciones tropicales de Yucatán, las abejas africanizadas libres de la infección por *N. ceranae* forrajearon un día más a diferencia de las abejas enfermas. Los resultados indican diferencias significativas entre ambos niveles de infección (10,000 y 50,000 esporas) y las abejas libres de la enfermedad.

Los resultados de los efectos de la nosemosis en la duración de la actividad de forrajeo bajo condiciones de climas templados, se han observado en abejas melíferas de origen europeo infectadas con ambas especies de microspordios (*N. apis* y *N. ceranae*) (Woyciechowski y Morón; 2009; Goblirsch *et al.*, 2013). Woyciechowski y Morón, (2009) registraron una diferencia en la duración de la

actividad de forrajeo de aproximadamente 20 días entre abejas enfermas con tres diferentes niveles de infección con esporas de *N. apis* y las abejas sanas.

Por su parte, Goblirsch *et al.*, (2013) registraron efectos similares con *N. ceranae* entre individuos sanos y enfermos con una diferencia de tiempo de actividad de forrajeo de aproximadamente 18 días. Estos resultados son similares a los obtenidos en esta investigación debido a que en ambos trabajos se utilizó la misma especie del patógeno (*N. ceranae*), así como el mismo nivel de infección (10,000 esporas), en contraste los días del tiempo de actividad son diferentes (1 día en abejas africanizadas y 18 en abejas europeas) debido a la diferencia en el ciclo de vida de las subespecies de abejas melíferas (Winston *et al* 1981; Winston, 1992; Martín y Medina, 2004).

4.3. *N. ceranae* y longevidad de las abejas obreras africanizadas

En relación a la longevidad, donde resultados indican diferencias significativas entre ambos niveles de infección (10,000 y 50,000 esporas) las abejas libres de la enfermedad, en promedio las abejas sanas vivieron 10 días más que las abejas enfermas; no se registraron diferencias significativas entre ambos tratamientos de infección. El 50 % de las abejas muertas infectadas con ambos niveles de infección se registraron a los 21 días; a diferencia, del 50 % de las abejas muertas libres de la enfermedad a los 31 días (Figura).

Woyciechowski y Morón (2009), evaluaron los efectos de *N. apis* en la longevidad de las abejas melíferas europeas bajo condiciones templadas, utilizando tres

diferentes niveles de infección. Observaron que entre los tratamientos no se registraron diferencias significativas en la longevidad, sin embargo existieron diferencias de 8 a 15 días en la longevidad con el grupo control. Por lo tanto, el 50% de las muertes en los tres diferentes tratamientos se registraron aproximadamente a los 15, 18 y 24 días, mientras que el 50% de las muertes del grupo control se presentó a los 35 días.

Por su parte Goblirsch *et al.*, (2013) mediante experimentos de longevidad con *N. ceranae* registró una diferencia aproximada de 12 días de longevidad entre abejas libres de la enfermedad y abejas infectadas con 10,000 esporas por abeja. Registrando el 50% de pérdida de individuos infectados aproximadamente a los 17 días a diferencia de las abejas del grupo control, las cuales registraron el 50% de muertes hasta los 29 días. Estos resultados son semejantes a los registrados en mis observaciones con abejas africanizadas y bajo condiciones tropicales, con una diferencia de aproximadamente 2 días de longevidad bajo las mismas condiciones de infección (10,000 esporas), experimento y el patógeno (*N. ceranae*).

Recientemente Eiri *et al.*, 2015 evaluó el efecto de *N. ceranae* en la longevidad de abejas de origen genético europeo bajo condiciones de laboratorio expuestas a dos diferentes niveles de infección de 10,000 y 40,000 esporas por abeja así como un grupo testigo; esta investigación se realizó inoculando las esporas de *N. ceranae* en la etapa larval. Los resultados indicaron diferencias significativas entre los grupos infectados y el grupo control, al alcanzar el 75 % de mortalidad de los

individuos infectados a los 14 días con 10,000 esporas, 13 días con 40,000 esporas y 18 días en el grupo control.

Aunque existe diferencia de las condiciones de infección y de subespecies de abejas melíferas utilizadas entre los trabajos realizados por Eiri *et al.*, (2015) y esta investigación, los efectos negativos en la longevidad fueron similares; registrando mayores efectos en la disminución de la longevidad de abejas enfermas con *N. ceranae* a diferencia de las abejas sanas.

Los resultados de esta investigación demuestran la existencia de efectos perjudiciales de la parasitosis causada por *N. ceranae* sobre las abejas melíferas africanizadas en el comportamiento de forrajeo así como en el ciclo de vida lo cual puede influir negativamente en el desarrollo y producción de las colonias. Los efectos de la nosemosis sobre la producción de miel han sido evaluados en colonias de abejas de climas templados, obteniendo una menor producción de miel en colonias con altos niveles de infección por *N. ceranae* (Fries, 1993; Guzman-Novoa, 2010). En Yucatán Martín (2013), realizó una evaluación similar utilizando colonias de abejas melíferas africanizadas, registrando baja producción de miel de colonias de Yucatán infectadas con altos niveles de *N. ceranae*.

El efecto de esta parasitosis sobre las abejas melíferas africanizadas de climas tropicales es similar a los registrados en abejas de climas templados sin embargo actualmente no se han observado síntomas relacionados con el CCD bajo condiciones tropicales; debido probablemente a las condiciones climáticas que influyen en la fluctuación de los niveles de infección (Gisder *et al.*, 2010) así como

a una mayor resistencia de las abejas africanizadas a las enfermedades tal como se ha observado en presencia de otros patógenos como el ácaro *V. destructor* (Guzmán-Novoa, *et al.*, 1999; Medina y Martin, 1999; Martin y Medina, 2004).

Esta aparente resistencia ha sido reportada por Santos *et al.*, (2014) en colonias de abejas melíferas africanizadas donde se registró alta prevalencia e incidencia de nosemosis causada por *N. ceranae* en distintas regiones de Brasil. A pesar de los resultados obtenidos, los autores reportan la ausencia de síntomas relacionados con el CCD. Estas evidencias suponen la existencia de mecanismos fisiológicos, de comportamiento así como del ciclo de vida en las abejas melíferas africanizadas que podrían evitar que la enfermedad se propague por toda la colonia, evitando su colapso.

En este estudio se demuestra la influencia de la nosemosis causada por la especie *N. ceranae* sobre el comportamiento de forrajeo de las abejas melíferas africanizadas bajo condiciones tropicales. Induciendo al forrajeo prematuro, una reducción de la duración de forrajeo así como una reducción de la longevidad; aspectos presentes en el comportamiento de forrajeo y ciclo de vida indispensables para el establecimiento, conservación, reproducción y aprovechamiento de las colonias.

5. Conclusiones

- 1) *N. ceranae* induce el forrajeo prematuro en las abejas obreras africanizadas infectadas con ambos números de esporas, en comparación con las abejas obreras no infectadas.
- 2) La duración de la actividad de forrajero en las abejas africanizadas infectadas con *N. ceranae* es menor en comparación con las abejas no infectadas.
- 3) La infección por *N. ceranae* reduce la longevidad de las abejas obreras africanizadas bajo condiciones tropicales en comparación con las abejas no infectadas.
- 4) De manera general, las infecciones de las abejas africanizadas con el microsporidio *N. ceranae* influye negativamente sobre su comportamiento de forrajeo y longevidad bajo condiciones tropicales, lo que puede afectar también el desarrollo y producción de las colonias de abejas en Yucatán.

6. Referencias

- Arathi, H. S., Burns, I. y Spivak, M. (2000). Ethology of hygienic behavior in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): Behavior repertoire of Hygienic Bees. *Etho.* **106**, 365-379.
- Chen, Y., P., Evans, B., Smith, J. y Pettis, J. (2007). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European Honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Jou. of Inverte. Patho.* **97**, 186-188.
- Chen, Y., P., Evans, J., D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M. y Gundensen-Rindal, D. (2009). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**, 142–147.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single step method de RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159.
- Dainat, B., Evans, J., D., Chen, Y., P., Gauthier, L. y Neuman, P. (2011). Dead or Alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *A. Environ. Micro.* **78** (4), 981–987
- De Jong, D., y De Jong, P., H., (1983). Longevity of Africanized honeybees (Hymenoptera: Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes: Varroidae). *J. Econo. Entomo.* **76** (4), 766-768.

- Domínguez, R., A., (2009). Distribución de morfotipos y haplotipos Europeo y Africano en colonias de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) en México. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Eiri, D., M., Suwannapong, G., Endler, M. y Nieh, J., C. (2015). *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. P. O. **10** (5), 1-17.
- Evans, D., J. y Schwars, S., R. (2011). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. T. Micro.December. **19** (12), 614-620.
- Fries, I., Ekbohm, G. y Villumstad, E. (1984). *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. J. Apic Res **23** (2), 102–105.
- Fries, I. (1988). Comb replacement and *Nosema disease* (*Nosema apis* Z.) in honey bee colonies. Apido. **19** (3), 343–354.
- Fries, I., (1993). *Nosema apis* a parasite in the honey bee colony. Bee World **74**, 5–19.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S.B. y Pieniazek, N.J. (1996). *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. **32**, 356–365.

Fries, I.; Chauzat, M. P.; Chen, Y. P.; Doublet, V.; Genersch, E.; Gisder, S.; Higes, M.; McMahon, D. P.; Martín-Hernández, R.; Natsopoulou, M.; Paxton, R. J.; Tanner, G.; Webster, T. C.; Williams, G. R. (2013). Standard methods for nosema research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. J. Api. Re. **52** (1), 1-28.

Furgala, B. F. y Mussen, E. C. (1990). Protozoa, in: Morse R.A., Nowogrodzki R. (Eds.), Honey bee pests, predators and diseases, Cornell University Press, pp. 49–63.

Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M., Linda, A., Genersch, E. (2010). Five-Year Cohort Study of *Nosema spp.* Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? Appl and Enviro Microbiol, **76** (9), 3032–3038.

Goblirsch, M., Huang, Z.Y. y Spivak, M., (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. P.O. **8** (3), 1-8.

Gómez-Moracho, T., Bartolomé, C., Bello, X., Martín-Hernández, R., Higes, M. y Maside, X. (2015). Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. In. Gene. Evolu. **31**, 87–94.

- Guzmán-Novoa, E., Vandame, R., Arachavaleta, M., E., (1999). Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apido*. **30**, 173-182.
- Guzmán-Novoa, E., Hamiduzzaman, M, M., Arechavaleta, M. E., Koleoglu, G. (2011). *Nosema ceranae* has parasited Africanized Honey bees in Mexico since at least 2004. *J of Apicul Resear*, **50** (2), 167-169
- Hall H.G., Smith D.R. (1991). Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **88**, 4548–4552.
- Higes, M., Martín, R., y Meana, A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* **92**, 93–95.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., and Meana, A. (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the Microsporidia *Nosema ceranae*. *J Invertebr Pathol* **94**, 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Barrios, L., et al. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* **10**, 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., y Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apido*. **41**, 375–392.

- Huang, Q., Kryger, P., Le Conte, Y., y Moritz, R.F.A. (2012) Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J Invertebr Pathol* **109**, 297–302.
- Huang, W. F., Solter, L., Aronstein, K. y Huang, Z., (2015). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *J. Inverte. Patho.* **124**, 107–113.
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J., Forgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F-L., Jaffé, R., Jensen, A B., Köler, A., Magyar, J., Özkrym, A., Pirk, C W W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D. R., Van Der Steen, J J M., Vaudo, A., Vejsnaes, F., Wilde, J., Williams, G R., Zheng, H., Q. (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *J. Apicul. Re.* **52** (4), 1-56.
- INVITROGEN. 2014. TRIzol ®Reagent. (Consultado Abril 2014). Disponible en: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf.
- Iqbal J. y Mueller U. (2007). Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers, *Proc. R. Soc. B.* **274**, 1517–1521.
- Johnson, B., R., (2010). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behav Ecol Sociobiol* **64**:305–316

- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I. y Paxton, R.J., (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **96**, 1–10.
- Kolmes S. A. (1984). A quantitative comparison of behavior methodologies for studies of worker honeybees. *J Invertebr Pathol* **96**, 1-10
- Kralj J., Brockmann A., Fuchs S. y Tautz J. (2007). The parasitic mite *Varroa destructor* affects non associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L., *J. Comp. Physiol. A* **193**, 363–370.
- Kralj, J. y Fuchs, S. (2010). *Nosema spp.* influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apido.* **41**(1), 21-28.
- Machin, D., Cheung, Y.B. & Parmar, M.K.B. (2006). *Survival Analysis: a practical approach.* West Sussex: John Wiley & Sons Press, 266 p.
- Martin, S., J., y Medina, L., M., (2004). Africanized honeybees have unique tolerance to *Varroa* mites. *Tren in Para.* **20** (3), 112-114.
- Martínez, J. (2008). Situación actual de las principales parasitosis en abejas africanizadas en el estado de Yucatán. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.

- Martínez, J. F. Medina, L. A. y Catzin, G. A. (2011). Frequency of *Varroa destructor*, *Nosema apis* and *Acarapis woodi* in managed colonies and wild swarms of honey bees (*Apis mellifera*) in Merida, Yucatan, Mexico. Rev. Mex. Cien. Pecua. **2**(1), 25-38.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., y Higes, M. (2007) Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl Environ Microbiol **73**, 6331–6338.
- Martín, L. (2013). Evaluación de los niveles de infestación de *Nosema ceranae* sobre la producción de miel en colonias de abejas africanizadas (*Apis mellifera*) en Yucatán, México. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- McMenamin, A J. y Genersh, E. (2015). Honey bee colony losses and associated viruses. Cu. Opi. In. Scien. 2015, **8**, 1–9.
- Medina, M., L. y Martin, S., J. (1999). A comparative study of *Varroa jacobsoni* reproduction in worker cells of honey bees (*Apis mellifera*) in England and Africanized bees in Yucatan, Mexico Medina, L., A. y May, W. (2003). Enfermedades de las abejas. (Mérida Yucatán México ed.). Mérida, Yucatán, México. Experi. Appli. Acaro. **23**, 659–667.
- Medina-Medina, L., Quezada-Euan, J. J. G., Natsopoulou, M. E., Paxton, R. J. y Suraporn, S. (2012). *Nosema* in Mexican bees. Póster, 5th European

Conference of Apidology. Halle an der Saale, Alemania. 3 al 7 de Septiembre de 2012.

Medina, L., A., Hart, A., G. y Ratnieks, F., L., (2014). Waste management in the stingless bee *Melipona beecheii* Bennett (Hymenoptera: Apidae). *Socio.* **61**(4), 435-440

Morse, R., A. y Calderone, N., W. (2000). The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *B. Cul.* 1–15.

Morse, R.A., Flottum, K., (1997). *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases.* A.I. Root Co, Medina, Ohio.

Natsopoulou, M. E., McMahon, D. P., Paxton, R. J. (2015). Parasites modulate within-colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. *Behav Ecol Sociobiol.*

Paxton, R., J., Weibschuh, N., Quezada-Euan, J. J. G. (1998). Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. *Blackwell Science Ltd, Mole. Eco.* **8**, 685-702.

Paxton R., J., Klee, J., Korpela, S. y Fries I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis**. *Apido.* **38**, 558–565.

- Paxton, R., J., (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)?. *J. Apicu.l Resea-* **49** (1), 80-84.
- Perry, C., J., Sovik, E., Myerscough, M., R., Barron, A., B., (2015). Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *PNAS.* **112** (11), 3427–3432.
- Quezada-Euán, J., J., G. (2000). Hybridization between European and Africanized honeybees in tropical Yucatan, Mexico. II. Morphometric, allozymic and mitochondrial DNA variability in feral colonies. *Apido.* **31**, 443-453.
- Quezada, J., J., G. (2010). *Biología y diversidad de la abeja melífera (Mérida Yucatán México ed.)*. Mérida, Yucatán, México.
- Sakagami, S., F., Fukuda, H., (1968). Life tables of workers honeybees. *Res. Popul. Ecol.* 127-139.
- Santos, L., G.; Alves, M., L., Message, D., Pinto, F., A., Silva, M., V., y Teixeira, E., W. (2014). Honey Bee Health in Apiaries in the Vale do Paraíba, São Paulo State, Southeastern Brazil. *Socio.* **6** (13), 307-312.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharff S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. y Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Sci.* **239**, 487–491.

- Schneider, P. y Drescher, W. (1987). Influence of *Varroa jacobsoni* infection during pupal development of flight activity of the worker honey bee. *Apido*. **17**, 366–368
- Sheppard, W., S., y Smith, D., R., (2000). Identification of African-Derived Bees in the Americas: A Survey of Methods. *Entomol. Soc. Am.* **93** (2), 159-176.
- Soto, C. (2014). Efectos de la inoculación de esporas de *Nosema ceranae* (Microsporidia) y detección del virus de alas deformes (DWV) en la abeja nativa sin aguijón *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini) en Yucatán, México. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Seeley, T., D. (1995) *The Wisdom of the Hive* (Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Spivak, M. Vaughan. y E. Euliss, N. (2011). The Plight of the Bees. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 34–38.
- Teixeira, E. W., Santos, L. G., Sattler, A., Message, D., Alves, M. L. T. M. F., Martins, M. F., Grassi-Sella, M. F., Francoy, T. M. (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J. Inverte. Patho.* **114**, 250-254.
- Toth A., L., y Robinson G., E., (2005). Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Anim Behav* **69**, 427–435.

- Vargas, A.; Medina. L. (2010). Eficacia de la fumagilina y timol en el control del parásito *Nosema spp.* en abejas africanizadas (*Apis mellífera*). Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J., D., Saegerman, C., Mullin, C. y Haubruge, E. (2009). Colony collapse disorder: A descriptive study. P. O. **4**, 8.
- Webster T.; K. Pomper; G. Hunt; E. Thacker y S. Jones. (2004). *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. Apido. **35**, 49-54.
- Winston, M., L., (1987). The biology of the Honey Bee. Harvard Univ. Press. Londres, Inglaterra.
- Winston, M., L., (1992). The biology and management of Africanized honeybees. Annu. Rev. Entomol. **37**, 173-93.
- Woyciechowski, M. y Moron, D. (2009). Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). Insectes Soc. **56**, 193–201.

A scientific note: Decoding dances of Africanized honey bees in Yucatan Mexico.

(Formato: Revista Apidologie)

Autores:

F. A. Fleites-Ayil *

Javier G. Quezada-Euán.

Luis A. Medina Medina.

Adscripción:

Departamento de Apicultura; Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Universidad Autónoma de Yucatán, Apdo. postal 4-116, Mérida, Yucatán, México,
97100.

Email:

fernandofleitesayil@gmail.com

queuan@uady.mx

mmedina@uady.mx

Decoding/ Dance language/ Foraging/ Africanized/ Honey bee/ .

1. Introducción

La comunicación a través del lenguaje de danzas ha sido uno de los comportamientos del reino animal más estudiados durante los últimos 60 años y fueron descubiertas y decodificadas por el científico Karl von Frisch (1967) el cual observó que las abejas obreras poseían un comportamiento mediante el cual comunicaban a sus compañeras de nido la presencia, calidad, olores, distancia y dirección de sus alimentos reclutándolas a través de las danzas (Grüter y Farina, 2009; Grüter y Ratnieks, 2011; Couvillon *et al.*, 2012; Toufailia *et al.*, 2013; Bray y Nieh, 2014; Couvillon *et al.*, 2014).

El descubrimiento del lenguaje de danzas ha permitido la realización de diferentes investigaciones relacionadas con su decodificación (Visscher y Seeley, 1982; Gil y De Marco, 2010; Couvillon *et al.*, 2012); evolución en la producción de mensajes (Barron *et al.*, 2007; Dornhaus y Chittka, 2004), recepción de mensajes (Riley *et al.*, 2005; Tanner y Visscher, 2008; Tanner y Visscher, 2009), entre otras, realizadas en condiciones templadas y con subespecies de abejas melíferas pertenecientes a este clima las cuales permiten comprender mejor el comportamiento de estos insectos.

El empleo de esta herramienta bajo condiciones tropicales y con abejas africanizadas ha sido poco explorado (Schneider y Hall, 1997) y generalmente se han utilizado metodologías que actualmente son consideradas obsoletas debido a la poca exactitud en las observaciones así como los parámetros inadecuados en la decodificación de danzas. Sin embargo, diferentes metodologías se han evaluado

recientemente para lograr resultados más precisos los cuales junto con tecnología avanzada aportan datos más exactos de la decodificación de las danzas de las abejas (Schürch *et al.*, 2013; Couvillon *et al.*, 2014).

Actualmente, se han estudiado distintos aspectos relacionados con el comportamiento, sanidad y productividad de la abeja africanizada (Medina y Martín, 1999; Martín, 2013). Sin embargo, aspectos de comunicación como la transmisión de información de distancias a través del lenguaje de danzas aún no ha sido evaluado. Determinar la metodología mejor ajustada para la decodificación de distancias aportará herramientas útiles en la decodificación de danzas. La justificación requiere de un “punch” más contundente.

2. Materiales y Métodos

2.1. Instalación de la colonia de observación

Se instaló una colonia de observación de madera sin olor de 60 cm por 30 cm con pared de cristal por ambos lados, tres respiraderos y un orificio con función de piquera conectada al exterior de la sala de extracción a través de un tubo de plástico inodoro de 30 cm de longitud por 5 cm de diámetro. La colonia estuvo compuesta de dos panales tipo Langstroth conteniendo miel, polen, cría abierta, cría operculada, aproximadamente 5,000 adultos y una reina joven.

2.2. Determinación genética de las abejas utilizadas en el experimento

A través del método de extracción de alta salinidad (Paxton *et al.*, 1998); se extrajo el ADN de los músculos torácicos de una sola abeja obrera correspondiente a la

colonia utilizada en la investigación (Sheppard y Smith, 2000; Domínguez, 2009) en la determinación del origen genético africano de la colonia.

2.3. Entrenamiento y marcaje de individuos

Mediante la implementación de alimentadores artificiales y a través de entrenamiento a diferentes distancias 500 m, 700 m y 1,000 m se marcaron los individuos pertenecientes a la colonia de observación. Las danzas de estos individuos marcados e identificados se registraron a través de videograbaciones (Sony modelo No DCR-SR220 Handycam Hybrid HDD) y fueron reproducidas y decodificadas utilizando el software Sony Vegas Pro 11.0.

2.4 Decodificación de danzas

Se utilizaron como parámetros de medición cuatro danzas continuas de coleteo (waggle dance) de 10 diferentes individuos para cada distancia así como el modelo de regresión lineal propuesto por Schürch *et al.*, (2013) utilizando el tiempo de duración de la fase de coleteo en la danza para predecir la distancia y evaluar su similitud con las distancias conocidas en nuestra investigación (Schürch *et al.*, 2013; Couvillon *et al.*, 2014). Finalmente, se compararon dos diferentes metodologías predictivas (Waddington *et al.*, 1994 y Wenner, 1962) que utilizan el tiempo de la danza de coleteo para predecir la distancia y determinar cuál se ajustó mejor a las distancias conocidas.

3. Resultados

Los resultados a través de una ANOVA nos indican que no existen diferencias significativas ($F_{2, 30} = 4.61$; $P > 0.05$) entre los modelos debido al bajo tamaño de la muestra. Sin embargo, se observa que el modelo propuesto por Schürch *et al.*, (2013) presenta mayor similitud con las tres distancias conocidas analizadas en esta investigación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferentes modelos predictivos de distancia utilizando la fase de coleteo del lenguaje de danzas.

Distancia conocida	Promedio de Tiempo (segundos)	Waddigton	Wenner	Schürch
500	1.836	157m	258m	578m
700	1.962	208m	276m	618m
1000	2.709	611m	381m	852m

4. Discusión / conclusiones

Los resultados indican que entre las 3 diferentes metodologías evaluadas en la decodificación de danzas en esta investigación, la descrita por Schürch *et al.*, (2013) fue la que obtuvo mayor similitud con las 3 diferentes distancias conocidas. Las distancias obtenidas a través de las otras dos metodologías fueron menos precisas posiblemente por utilizar parámetros que actualmente son considerados imprecisos (Couvillon *et al.*, 2014). Nuestros resultados indican que las metodologías actualmente descritas para abejas de climas templados en la decodificación de danzas, podrían ser utilizadas en abejas melíferas africanizadas

como referencia para evaluar distancias y posiblemente dirección del comportamiento de forrajeo. Sin embargo crear un modelo predictivo con abejas africanizadas similar al de Schürch *et al.*, (2013) bajo condiciones tropicales aportaría información confiable y mejor ajustada a las condiciones de las abejas africanizadas así como del clima tropical.

Referencias

- Barron, A, B. Maleszka, R. Vander meer, R, K. Robinson G, E: (2007). Octopamine modulates honey bee dance behaviour. The National Academy of Sciences of the USA. **104**, 1703-1707.
- Bray, A. y Nieh, J. (2014). Non-Consumptive Predator Effects Shape Honey Bee Foraging and Recruitment Dancing. P. O. **9**, 1.
- Couvillon, M, J. Riddell, Pearce F, C. Harris-Jones, E, L. Kuepfer, A,M. Mackenzie- Smith, S, J. (2012). Intra-dance variation among waggle runs and the design of efficient protocols for honey bee dance decoding. Biology Open **1**, 467–472.
- Couvillon, M, J., Schürch, R. y Ratnieks, F, L, W. (2014). Waggle Dance Distances as Integrative Indicators of Seasonal Foraging Challenges. Plos One **9**, 4.
- Domínguez, R., A., (2009). Distribución de morfotipos y haplotipos Europeo y Africano en colonias de abejas *Apis mellífera* (Hymenoptera:Apidae) en

- México. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Dornhaus, A. y Chittka, L. (2004). Why do honey bees dance? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **55**, 395–401.
- Gil, M. y De Marco, R.J. (2010). Decoding information in the honeybee dance: revisting the tactile hypothesis. *Animal Behaviour* **80**, 887-894.
- Grüter, C. y Farina, W. M. (2009). The honeybee waggle dance: can we follow the steps? *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 242-247.
- Grüter, C. y Ratnieks, F. L. W. (2011). Honeybee foragers increase the use of waggle dance information when private information becomes unrewarding. *Animal Behaviour*, **81**, 949-954.
- Martín, L. (2013). Evaluación de los niveles de infestación de *Nosema ceranae* sobre la producción de miel en colonias de abejas africanizadas (*Apis mellifera*) en Yucatán, México. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Medina, M., L. y Martin, S., J. (1999). A comparative study of *Varroa jacobsoni* reproduction in worker cells of honey bees (*Apis mellifera*) in England and Africanized bees in Yucatan, Mexico Medina, L., A. y May, W. (2003). Enfermedades de las abejas. (Mérida Yucatán México ed.). Mérida, Yucatán, México. *Experi. Appli. Acaro.* **23**, 659–667.

- Paxton, R., J., Weibschuh, N., Quezada-Euan, J. J. G. (1998). Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. Blackwell Science Ltd, Mole. Ecol., **8**, 685-702.
- Quezada, J. (2010). Biología y diversidad de la abeja melífera (Mérida Yucatán México ed.). Mérida, Yucatán, México.
- Riley, J. R., Greggers, U., Smith, A., D., Reynolds, D., R. y Menzel, R. (2005). The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. Na. **435**, 205–207.
- Schürch, R., Couvillon, M., J., Burns, D., R., Tasman, K., Waxman, D., Ratnieks, F., L., (2013). Incorporating variability in honey bee waggle dance decoding improves the mapping of communicated resource locations. J Comp Physiol A (2013) **199**, 1143–1152.
- Schneider, S., S., Hall, H., G. (1997). Diet selection and foraging distances of African and European-African hybrid honey bee colonies in Costa Rica. Insectes soc. **44**, 171–187.
- Sheppard, W., S., y Smith, D., R. (2000). Identification of African-Derived Bees in the Americas: A Survey of Methods. Entomology. Soc. Am. **93**, 159-176.
- Tanner, D. y Visscher, P. (2008). Do honey bees average directions in the waggle dance to determine a flight direction? Behav Ecol Sociobiol **62**, 1891–1898

- Tanner, D y Visscher, K. (2009). Does the body orientation of waggle dance followers affect the accuracy of recruitment? *Apido*. **40**, 55–62
- Toufailia, H, A. Couvillon, M, J. Ratnieks, F, L. Grüter C. (2013). Honey bee waggle dance communication: signal meaning and signal noise affect dance follower behavior. *Behav Ecol Socialbiol* **67**, 549-556.
- Visscher PK. y Seeley TD. (1982). Foraging strategy of honeybee colonies in temperate deciduous forest. *Eco*. **63**, 1790-1801.
- von Frisch K. 1967. The dance language and orientation of bees. Cambridge (MA): Harvard University Press.
- Waddigton, K., D., Visscher, K., P., Herbert, T., J., Ritcher, M., R., (1994). Comparisons of forager distributions from matched honey bee colonies in suburban environments. *Behav Ecol Sociobiol*. **35**, 423-429.
- Wenner, A., M., (1962). Sound production during the waggle dance of the honey bee. *Ani. Beha*. **10**, 79-80.
- Winston, M., L. (1992). The biology and management of Africanized honeybees. *Annu. Rev. Entomol*. **37**, 173-93.

Anexos

Anexo 1. Procedimiento etanol-fenol para la extracción de ADN

Para la extracción del se agregó 500 µl de TRIzol® REAGENT a 100 mg de la muestra utilizando viales de 1.5 ml; posteriormente, la muestra se agitó en un vórtex Max Mix Plus® THERMOLYNE, para después agregar 100 µl de cloroformo, agitándose nuevamente por 15s y después se centrifugó a 12,000 g por 15 min desechándose la parte acuosa. Se adicionaron 150 µl de etanol al 100% y posteriormente se agitaron los tubos por inversión para homogeneizar la muestra y se centrifugó a 2,000 g por 5 min. Se desechó el sobrenadante etanol y se continuó con dos lavados del concentrado de ADN con 1 ml de solución de citrato de sodio/etanol, incubando por 30 minutos y centrifugando a 2,000 g por 5 min, entre lavados. Se retiró el sobrenadante y se le adicionó al concentrado 1 ml de etanol al 75% para después incubar por 20 min, luego se centrifugaron a 2,000 g por 5 min y se removió el sobrenadante (Chomczynski y Sacchi, 1987; INVITROGEN, 2014).

Después de dejar secar la pastilla por 10 min, se re-suspendió en 100 µl de 8 mM de NaOH. Finalmente, se centrifugaron a 12,000 g a 4°C en una microcentrífuga refrigerada Hermle z400k® LABNET por 10 min para remover el material insoluble y el sobrenadante con el ADN se transfirió a un vial de 1.5 ml (Chomczynski y Sacchi, 1987; INVITROGEN, 2014).

Anexo 2. Identificación de la presencia de ADN de *Nosema* en las muestras de abejas se utilizó el análisis de PCR punto final

Se emplearon cebadores genéricos:

Nosema F (5'- GGCAGTTATGGGAAGTAACA-3') y *Nosema* R (5'-GGTCGTCACATTTTCATCTCT-3').

Para diferenciar entre las especies *N. ceranae* y *N. apis*, respectivamente, se utilizaron cebadores especie-específicos *N. ceranae* F (5'-CGGATAAAAGAGTCCGTTACC-3')/*N. ceranae* R (5'-TGAGCAGGGTTCTAGGGAT-3') y *N. apis* F (5'-CCATTGCCGGATAAGAGAGT-3')/*N. apis* R (5'-CACGCATTGCTGCATCATTGAC-3') (Chen *et al.*, 2007).

Las reacciones de la PCR se realizaron en volúmenes de 25 µl que contienen 1 µl de ADN molde (1 ng), 5 µl de 5x Green GoTaq® Flexi Buffer PROMEGA, 0,1 mM de cada cebador, 0,1 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 2 mM de MgCl₂, 0.625 U de GoTaq® Hot Start Polimerase Promega y H₂O libre de nucleasas (Ambion® INVITROGEN). Los controles negativos constaron de los reactivos de la PCR sin el ADN molde. Los controles positivos procedieron de ADN de esporas de *N. ceranae* y *N. apis*, respectivamente. Para identificar el tamaño de la banda amplificada se utilizó un marcador de peso molecular 100 pb (INVITROGEN®) (Chen *et al.*, 2007).

Se consideraron los siguientes parámetros para la amplificación del ADN en un termociclador Select Cycler® SELECT BIOPRODUCTS: un paso inicial de

activación de la PCR de 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C y 1 min a 72°C, y finalmente un paso de extensión final a 72°C durante 3 minutos. Las reacciones se realizaron por separado para la detección de *Nosema spp.*, *N. apis* y *N. ceranae*. Para el caso de *N. apis*, se utilizó un paso inicial de 5 min a 94°C, seguidos por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59.2°C y 2 min a 72°C, seguidos por un periodo final de extensión de 10 min a 72°C (Webster *et al* 2004). Los productos de la PCR (5 µl) se determinaron por electroforesis (Mini Protean Tetracell® BIORAD) en gel de poliacrilamida (TBE 10x/Acrilamida) al 10% en solución Buffer TBE 1x, teñido con nitrato de plata y visualizado por iluminación (MacroVue Uvis 2.0® HOEFER). Se consideraron muestras positivas a *Nosema sp.*, *N. ceranae* y *N. apis*, los amplificados de 208, 250 y 401 pb, respectivamente (Chen *et al.*, 2007).

Anexo 3. Determinación del origen genético de las obreras provenientes de las colonias experimentales

A través del método de extracción de alta salinidad (Paxton *et al.*, 1998), se extrajo el ADN de los músculos torácicos de una sola abeja obrera correspondiente a cada una de las 4 colonias utilizadas en este trabajo, las cuales fueron almacenadas en frascos con etanol al 99 % desde el momento de su colecta. Se utilizó una sola abeja obrera debido a que el ADN se hereda uniparentalmente (ADN ribosomal), por esta razón todas las abejas descendientes de una abeja reina contendrán el mismo ADNmt, por lo que una sola abeja obrera es suficiente

para representar a la colonia entera de la cual proviene (Sheppard y Smith, 2000; Domínguez, 2009).

Para la identificación de la presencia de ADNmt para abejas europeas del este, se utilizó el segmento del ADNmt 1sARNr de 964 pb de posiciones 13479-14443 específico, amplifica usando la secuencia de los oligonucleótidos: 5'CAACATCGAGGTCGCAAACATC3' y 5'GTACCTTTTGTATCAGGGTTGA3'. La subunidad citocromo oxidasa I (COI) de 1028 pb de posiciones 2095-3123, específico para abejas europeas del oeste amplifica usando la secuencia de los oligonucleótidos: 5'GATTACTTCCTCCCTCATTA3' y 5'AATCTGGATAGTCTGAATAA3'.

La PCR fue desarrollada de acuerdo con el método Saiki *et al.*, (1988) y la amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 27 μ l de solución integrada por 18,60 μ l de agua desionizada esterilizada, 2.5 μ l de Buffer 10x, 0.5 μ l de MgCl₂ 1 μ l de dNTPS', 1.25 μ l de Primer's y 1.25 μ l de Taq polimerasa. Las amplificaciones se desarrollaron en un termociclador de ADN, BIO-RAD C1000 y las condiciones de la PCR consistieron en tres fases térmicas: Primer paso a 94°C por dos minutos para desnaturalizar las cadenas; el segundo paso 35 ciclos de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por dos minutos. Finalmente, la reacción concluyó con el tercer paso de 72°C por cinco minutos.

Posteriormente, el ADNmt fue amplificado y sometido a digestión con las enzimas de restricción Hinc II y Eco RI. Esta digestión se desarrolló en un volumen total de 20 μ l, el cual contenía 15 μ l de la muestra, 2 μ l de Buffer 10x, 2.8 μ l de agua

desionizada esterilizada y 0.33 μ l de la enzima de restricción. El total de la digestión fue colocado en un gel de agarosa al 1.5 % y a través de electroforesis TBE Buffer a 90 V durante 3 horas se obtuvieron los resultados de la migración del ADNmt. Por último, los geles fueron colocados en una bandeja con 200 μ l de TBE IX y 180 μ l de bromuro de etidio, agitándolo durante 15 a 20 minutos. Posteriormente, a través de un trasiluminador de luz ultravioleta se observaron los resultados.