



CENTRO INTERNACIONAL DE ALTOS ESTUDIOS AGRONOMICOS MEDITERRANEOS

INSTITUTO AGRONOMICO MEDITERRANEO DE ZARAGOZA

**CONTRIBUCION PARA EL ESTUDIO DE LA SELECCION
DE ESTIRPES LIMPIADORAS PRECOCES
RESISTENTES A LA ASCOSFERIOSIS**

Sancia María AFONSO PIRES

**TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE
DEFENDIDA EN EL I.A.M.Z. PARA
LA OBTENCION DEL DIPLOMA DE
ALTOS ESTUDIOS DEL C.I.H.E.A.M.
MASTER OF SCIENCE**

Zaragoza, Noviembre 1997

CONTRIBUCION PARA EL ESTUDIO DE LA SELECCION
DE ESTIRPES LIMPIADORAS PRECOCES
RESISTENTES A LA ASCOSFERIOSIS

Sancia María AFONSO PIRES

Zaragoza, Noviembre 1997

CENTRO INTERNACIONAL DE ALTOS ESTUDIOS AGRONOMICOS MEDITERRANEOS

INSTITUTO AGRONOMICO MEDITERRANEO DE ZARAGOZA

CONTRIBUCION PARA EL ESTUDIO DE LA SELECCION

DE ESTIRPES LIMPIADORAS PRECOCES

RESISTENTES A LA ASCOSFERIOSIS

Sancia María AFONSO PIRES

Trabajo realizado en el Departamento de Reproducción y Fisiología, Escuela Superior Agraria, Instituto Politécnico de Braganza, y en el Departamento de Reproducción y Obstetricia, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, bajo la dirección conjunta del Dr. Alfredo COSTA TEIXEIRA y del Dr. Agustín JOSA SERRANO, respectivamente,

y presentado en lectura pública el día 17 de Noviembre de 1997 ante el siguiente tribunal:

- **Francisco PUERTA PUERTA**, Centro Andaluz de Apicultura, Departamento de Biología, Universidad de Córdoba,
- **Marc E. COLIN**, Station de Zoologie et Apidologie, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches d'Avignon,
- **Pedro GARCIA FERNANDEZ**, Departamento de Producción Animal, Centro de Investigación y Formación Agraria, Junta de Andalucía, Granada,
- **Dunixi GABIÑA ITURRIAGA**, Director Adjunto del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza.

A mi HIJO,
A mi MARIDO,
A mis PADRES,
A mi tía ROSA.

AGRADECIMIENTOS

Al Presidente del Instituto Superior Politécnico de Braganza, Profesor Doctor DIONÍSIO AFONSO GONÇALVES, al Vice-Presidente del Instituto Superior Politécnico de Braganza, Profesor Doctor ALFREDO JORGE COSTA TEIXEIRA, y al Director de la Escuela Superior Agraria de Braganza, Ingeniero TOMÁS DE AQUINO FIGUEIREDO, expresamos nuestro reconocimiento por la disponibilidad de medios necesarios a nuestra promoción académica y valoración profesional.

A los Profesores Doctores AGUSTÍN JOSA SERRANO y ALFREDO JORGE COSTA TEIXEIRA, estamos muy agradecidos por la dirección científica del presente trabajo, así como por la total disponibilidad demostrada para ayudarnos, siempre que fue necesario.

A los Profesores Doctores PUERTA, COLIN y GILLIAM, agradecemos el apoyo dispensado en la búsqueda de la bibliografía necesaria para la elaboración de este trabajo.

A ANTONIO GÓMEZ PAJUELO por el adiestramiento y útiles consejos proporcionados para los estudios de comportamiento higiénico.

Al Ingeniero Técnico ADELINO COSTA, agradecemos todo el apoyo prestado en la cría e inseminación de reinas, en la bibliografía que nos disponibilizó, así como también en la discusión de los temas abordados y en las sugerencias y críticas que hizo a lo largo del trabajo.

Al Profesor Doctor ALFREDO JORGE COSTA TEIXEIRA y a los Ingenieros RAMIRO CORUJEIRA VALENTIM, JOSÉ MANUEL FERREIRA DE CASTRO y MARINA MECA FERREIRA DE CASTRO, nuestro agradecimiento por la ayuda prestada en el tratamiento estadístico de los datos.

Al Presidente de la Asociación de Apicultores del Parque Natural de Montesinho, D. MANUEL GONÇALVES, bien como a todos los otros miembros de esta Asociación, estamos muy gratos por el apoyo prestado en el montaje de los colmenares, en la realización de todas las prácticas de manejo y registro de los datos, así como también por la disponibilidad de los materiales y medios necesarios para transportarnos a los colmenares.

A los Ingenieros RAMIRO CORUJEIRA VALENTIM, TERESA MONTENEGRO CORREIA y a todos los elementos del Sector de Reproducción Animal de la Escuela Superior Agraria de

Braganza, estamos gratos por la disponibilidad del laboratorio de Reproducción y Fisiología para la realización de la inseminación instrumental.

A mi compañera MARIA JOSÉ MIRANDA ARABOLAZA, nuestro agradecimiento por la ayuda en la traducción del presente trabajo, así como por la total disponibilidad demostrada para ayudarnos siempre que fue necesario.

A D. LUIS AUGUSTO PIRES CORREIA, agradecemos la ayuda prestada, en el ordenador, con la estructuración final del trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMO, RESUMEN, ABSTRACT, RÉSUMÉ

I - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1 - INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 - <i>Ascospaera apis</i> EN LAS ABEJAS DE LA ESPECIE <i>Apis mellifera</i> L.	4
1.2 - ETIOLOGÍA.....	4
1.3 - SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO.....	9
1.4 - DISTRIBUCIÓN	13
1.5 - PROPAGACIÓN	17
1.6 - TRATAMIENTO	25
1.6.1. - LA SELECCIÓN DEL COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO EN ABEJAS DE LA ESPECIE <i>Apis mellifera</i> L. COMO UN MECANISMO DE RESISTENCIA A LA ASCOSFERIOSIS.....	33
1.6.1.1. - Estudios de comportamiento higiénico	38
1.6.1.2 - Técnicas de comportamiento higiénico para determinar la resistencia a la Ascosferiosis, <i>Ascospaera apis</i> , en <i>Apis mellifera</i>	40
2 - CRÍA E INSEMINACIÓN DE REINAS	44
2.1 - CRÍA DE REINAS	44
2.1.2 - TÉCNICAS DE INTRODUCCIÓN DE REINAS	49
2.2 - ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL.....	51
II - MATERIAL Y MÉTODOS	60
1 - CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	61
1.1 - CLIMA.....	62
1.2 - EDAFOLOGIA.....	64
1.3 - FLORA Y VEGETACIÓN.....	64
2 - LAS ABEJAS DE ESTUDIO	66
3 - COLMENARES DE ESTUDIO.....	67
3.1 - MATERIAL EMPLEADO EN LA CRÍA DE REINAS (ENJAULADO)	70
3.2 - MATERIAL UTILIZADO EN LA INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL.....	71

3.3 - MATERIAL EMPLEADO EN LA INTRODUCCIÓN DE REINAS	74
4 - TOMA DE MUESTRAS PARA LOS ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO	74
4.1 - TEST DE CONGELACIÓN DE LA CRÍA	74
4.2 - TEST DE MUERTE DE LA CRÍA POR PUNCIÓN.....	75
4.3 - MUESTREO PARA LA CRÍA DE REINAS.....	76
4.4 - PREPARACIÓN DE LAS REINAS PARA LA INSEMINACIÓN	79
4.5 - PREPARACIÓN DE LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE LOS ZÁNGANOS PARA LA INSEMINACIÓN	79
4.6 - PREPARACIÓN DE LA INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL.....	80
4.7 - MANTENIMIENTO DE LAS REINAS DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN	81
4.8 - TÉCNICA DE INTRODUCCIÓN DE REINAS	81
4.9- MUESTREO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ASCOSFERIOSIS	81
2 - ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	82
III - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
1 - FRECUENCIAS OBTENIDAS EN LOS ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO	84
1.1 - VALORES OBTENIDOS DEL PROGRAMA DE CRÍA DE REINAS	91
1.2 - ANÁLISIS DE LOS VALORES RESULTANTES DE LOS DOS TIPOS DE ACOPLAMIENTOS (INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL Y FECUNDACIÓN NATURAL) Y DE LA TÉCNICA DE INTRODUCCIÓN DE REINAS.....	94
1.3 - ANÁLISIS DE LOS VALORES OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACIÓN DE LA ASCOSFERIOSIS.....	97
IV - CONCLUSIONES	108
V - BIBLIOGRAFIA	109
VI - ANEXOS	126

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema del ciclo biológico de la Ascosferiosis.....	6
FIGURA 2 - Mecanismo de propagación de la Ascosferiosis	8
FIGURA 3 - Parque Natural de Montesinho.....	61
FIGURA 4 - Mapa de las zonas climáticas homogéneas de la región.....	63
FIGURA 5 - Sucesión ecológica regresiva.....	65
FIGURA 6 - Vista general de los matorrales de brezos y jaras del área de estudio.....	65
FIGURA 7 - Aspecto particular de los matorrales del área de estudio	66
FIGURA 8 - Vista general del colmenar Eiras.....	68
FIGURA 9 - Colmena Lusitana	68
FIGURA 10 - Cuadro de la colmena Lusitana.....	69
FIGURA 11 - Vista general del colmenar Rebolal	70
FIGURA 12 - Vista general del aparato de inseminación instrumental	72
FIGURA 13 - Aspecto del bloque de la reina y de los ganchos	73
FIGURA 14 - Aspecto de la jeringa e introducción del semen.....	73
FIGURA 15 - Tipo de jaula empleada en la introducción de reinas	74
FIGURA 16 - Cuadro portacúpulas con alimentador incorporado	77
FIGURA 17 - "Baby-núcleos" utilizados para el nacimiento y posterior iniciación de la puesta de las jóvenes reinas	78
FIGURA 18 - Caja de vuelo tipo Andersen, para el transporte de los machos y recolección del esperma.....	79
FIGURA 19 - Porcentaje de desoperculación en el test de muerte por punción	87
FIGURA 20 - Porcentaje de extracción en el test de muerte por punción	88
FIGURA 21 - Porcentaje de desoperculación en el test de muerte por congelación.....	89
FIGURA 22 - Porcentaje de extracción en el test de muerte por congelación.....	89
FIGURA 23 - Porcentaje de cría extraída en ambos test.....	90
FIGURA 24 - Valor medio de D1 (afección oct./sept.) en relación a los lotes.....	102
FIGURA 25 - Valor medio de D1 (afección oct./sept.) en relación a las clases	102
FIGURA 26 - Valor medio de D7 en relación a los lotes.....	103
FIGURA 27 - Valor medio de D7 en relación a las clases.....	104

INDICE DE TABLAS

TABLA nº 1 - Comparación de los caracteres morfológicos medidos por CARRERA y col. (1989) y las cepas de referencia para <i>Ascosphaera apis</i> y <i>Ascosphaera major</i>	11
TABLA nº 2 - Distribución de la Ascospferiosis en el mundo	15
TABLA nº 3 - Factores de estrés relacionados con la Ascospferiosis	19
TABLA nº 4 - Relación de algunos autores que han investigado en el control químico de <i>Ascosphaera apis</i>	26
TABLA nº 5 - Prácticas de manejo utilizadas a lo largo del tiempo	31
TABLA nº 6 - Relación de autores que han investigado el comportamiento higiénico en <i>Apis mellifera</i> L.....	41
TABLA nº 7 - Relación de colmenares que han sido estudiados	67
TABLA nº 8 - Composición de la solución salina de Hyes	80
TABLA nº 9 - Valores del χ^2 y de P hallados entre los test de limpieza.....	86
TABLA nº 10 - Relación de valores procedentes del programa de cría	91
TABLA nº 11 - Valores de χ^2 y respectivo grado de significación aplicados a las frecuencias obtenidas de la aceptación larvar, nacimientos y cría total, entre series	93
TABLA nº 12 - Comparación entre los dos tipos de fecundación a que fueron sometidas las reinas seleccionadas.....	95
TABLA nº 13 - Valores de χ^2 y respectivo grado de significación aplicados a las frecuencias obtenidas de la aceptación de las reinas después de su introducción en las colonias, y del número de reinas vivas y fértiles entre los dos tipos de fecundación.....	96
TABLA nº 14 - Nivel de afección en las 42 colmenas estudiadas a lo largo del período de seguimiento de la Ascospferiosis	98
TABLA nº 15 - Análisis de varianza de la diferencia mensual del grado de afección de la Ascospferiosis.....	100
TABLA nº 16 - Análisis de varianza de la diferencia entre el grado inicial y final de afección de la Ascospferiosis.....	100
TABLA nº 17 - Las medias de los valores de la diferencia D1 en relación a los lotes....	101
TABLA nº 18 - Las medias de los valores de la diferencia D1 en relación a las clases ..	101
TABLA nº 19 - Las medias de los valores de la diferencia, entre el recuento inicial y final (D7) del grado de Ascospferiosis, en relación a los lotes.....	103
TABLA nº 20 - Las medias de los valores de la diferencia, entre el recuento inicial y final (D7) del grado de afección de la Ascospferiosis, en relación a las clases	103

ABREVIATURAS

A. major = *Ascosphaera major*

A. apis = *Ascosphaera apis*

μm = Micras

% = Porcentaje

V = *Varroa jacobsoni*

χ² = Qui-Cuadrado

NMG = Sal N-metil glucamina

POF = Productos de la fermentación de los ácidos orgánicos

QAC = Compuesto cuaternario de amonio

PVC = Compuesto propiónico de vermiculita

ml = Mililitro

ppm = Partes por millón

h² = Heredabilidad

r = coeficiente de correlación

gl = Grados de libertad²

cm = Centímetros

°C = Grados centígrados

mm = Milímetros

mg = Miligramos

CO₂ = Dióxido de carbono

mm³ = Milímetros cúbicos

rpm = Revoluciones por minuto

m = Metros

Km = Kilómetros

E = Colmenar Eiras

R = Colmenar Rebolal

dm² = Decímetro cuadrado

Test 1 = Técnica de muerte de la cría por congelación

Test 2 = Técnica de muerte de la cría por punción

Kg = Kilogramos

h = Horas

C.I.A.C.R. = Recuento inicial antes de cambiar las reinas

C.I.D.C.R. = Recuento inicial después de cambiar las reinas

D1 = Diferencia mensual del nivel medio de afección entre octubre y septiembre

D2 = Diferencia mensual del nivel medio de afección entre noviembre y octubre

- D3 - Diferencia mensual del nivel medio de afección entre marzo y noviembre
- D4 - Diferencia mensual del nivel medio de afección entre abril y marzo
- D5 - Diferencia mensual del nivel medio de afección entre mayo y abril
- D6 - Diferencia del recuento medio (del grado de contaminación) obtenido en la primavera relativamente al de otoño
- D7 - Diferencia del recuento final (recuento de mayo) respecto al inicial (recuento de septiembre) del grado de cuantificación de la Ascosporeosis

n = Tamaño de la muestra

I.I. = Inseminación instrumental

F.N. = Fecundación natural

RESUMEN

Este trabajo dentro de la patología apícola pretende ser una *contribución al estudio de la selección de estirpes limpiadoras precoces resistentes a la Ascospferiosis*. Así, después de realizada una revisión bibliográfica sobre la enfermedad, viendo que tratamientos farmacológicos y buen manejo, necesitan de la selección del comportamiento higiénico en abejas del género *Apis mellifera* L. como un mecanismo de resistencia a la Ascospferiosis. Dando especial énfasis a los estudios y técnicas del comportamiento higiénico, y en especial a la cría e inseminación de reinas, se desarrolló un trabajo experimental con la intención de abordar el comportamiento higiénico en las abejas locales como principal aspecto inherente al programa de cría y selección a realizar a lo largo de un año.

Dos test de limpieza fueron diseñados en 20 colmenas en simultáneo, para estudiar este carácter y para evaluar su eficacia a las 24 horas, utilizando el estadístico χ^2 .

Se consideró que el tiempo total necesario para la extracción completa de todas las celdillas con cría muerta por congelación fue mucho menor, cuando por un periodo de 5 días, el 100% de las colonias presentaban la remoción completa a las 48 horas. Mientras que, para la cría muerta por punción, éste varió entre un día, con remoción completa hasta más de tres con extracción incompleta. Sin embargo, se demostró la eficacia del Test 2 para la evaluación del comportamiento higiénico a las 24 horas, una vez que en la mayoría de las colonias estudiadas obtuvimos un χ^2 significativo ($P \leq 0,0001$).

En la cría de reinas, utilizando el mismo tratamiento estadístico, solo se comprobó la existencia de diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las cuatro series en relación a la tasa de nacimientos y de cría total, presentando la tasa de aceptación en las colmenas incubadoras una gran uniformidad entre series.

A través de la inseminación instrumental, se alcanzó un porcentaje de 80% de reinas fecundadas, lo que sugiere un éxito satisfactorio en la aplicación de esta técnica. A pesar de todo, se verificaron diferentes frecuencias ($P \leq 0,01$) en la aceptación de las reinas después de su introducción en las colonias enfermas y lo mismo en relación a las reinas vivas y fértiles, respecto a los dos tipos de acoplamiento.

En el proceso patológico solamente la diferencia mensual entre octubre y septiembre y la diferencia entre el recuento final y inicial, del nivel medio de afección fueron significativos ($P \leq 0,01$) relativamente a los lotes. Por lo que, se comprobó para estas dos variables, una reducción significativa del grado de contaminación en el lote 4, respecto a los otros. A pesar de todo, y a lo largo de la secuencia de recuentos realizados, el nivel medio de afección fue, de una forma general, aunque no constante y significativa, disminuyendo en todos los lotes. La misma tendencia se observó relativamente a las clases, en las cuales se evidencia una reducción más

acentuada entre las reinas inseminadas cuando comparadas con las reinas seleccionadas que acoplaron naturalmente, y de éstas con las reinas testigo.

En este estudio, la reducción del nivel de afección entre lotes parece haber sido esencialmente influenciado por el efecto de la ubicación de los distintos grupos de colmenas, distribuidas en colmenar, la reducción entre clases probablemente, parece haber sido fundamentalmente afectada por el tipo de acoplamiento a que fueron sometidas las reinas inseminadas.

A la vista de los resultados alcanzados, pensamos que los test de limpieza son técnicas eficaces para seleccionar el comportamiento higiénico de las abejas locales, las cuales presentan una respuesta positiva, respecto a este carácter. Sin embargo, el programa de selección y cría de este ganado con el intento de producir estirpes limpiadoras resistentes a la Ascosporeosis se presentó eficaz pero como coadyuvante con otras medidas de control de la enfermedad, o sea, juntamente a las prácticas de manejo y los tratamientos farmacológicos. Esto podrá indicar que actualmente, las medidas de control basadas solamente en la genética no proporcionaron una solución rápida, simple y clara para el control de la enfermedad.

RESUMO

Este trabalho, dentro da patologia apícola, pretende ser uma *contribuição para o estudo da selecção de estirpes limpadoras precoces resistentes á Ascosferose*. Assim, depois de realizada uma revisão bibliográfica sobre esta doença, tratamentos farmacológicos para a combater, bom maneio e a selecção do comportamento higiénico como um mecanismo de resistencia á Ascosferose. Dando especial ênfase aos estudos e técnicas do comportamento higiénico, e em especial á criação e inseminação de rainhas, desenvolveu-se um trabalho experimental com o intuito de estudar o comportamento higiénico das abelhas locais como principal aspecto inerente ao programa de selecção a realizar ao longo de um ano.

Para estudar este caractere e para avaliar a sua eficácia ás 24 horas dois ensaios de limpeza foram elaborados em 20 colmeias, utilizando como tratamento estatístico o χ^2 .

Considerou-se que o tempo total necessário para a extracção completa de todos os alvéolos com criação morta por congelação foi muito menor quando, por um período de 5 dias, 100% das colonias apresentaram remoção completa ás 48 horas. Enquanto que, para a criação morta por punção, este variou entre um dia com remoção completa até mais de três com extracção incompleta. No entanto, demonstrou-se a eficácia do Ensaio 2 para a avaliação do comportamento higiénico ás 24 horas uma vez que, na maioria das colonias estudadas, obtivemos um χ^2 significativo ($P \leq 0,0001$).

Na criação de rainhas, utilizando o mesmo tratamento estatístico, somente foi comprovada a existencia de diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as quatro séries relativamente ás taxas de nascimento e de criação total, apresentando a taxa de aceitação nas colmeias incubadoras uma grande uniformidade entre séries.

Através da inseminação instrumental alcançou-se uma percentagem de 80% de rainhas fecundadas, o que sugere um êxito satisfatório na aplicação desta técnica. Apesar de tudo, verificaram-se diferentes frequências ($P \leq 0,01$) na aceitação das rainhas depois da sua introdução nas colonias doentes e o mesmo aconteceu em relação ao total de rainhas férteis, no que diz respeito aos dois tipos de acasalamento.

No processo patológico apenas a diferença mensal entre Outubro e Setembro e a diferença entre a contagem final e inicial do nível médio da infecção foram significativos ($P \leq 0,01$) relativamente aos lotes, pelo que, comprovámos para estas duas variáveis, uma redução significativa do grau de contaminação no lote 4. Apesar de tudo, e ao longo da sequência de contagens realizadas, o nível médio da infecção foi, de uma forma geral, ainda que não constante e significativo, diminuindo em todos os lotes. A mesma tendência foi observada relativamente às classes, nas quais se evidencia uma redução mais acentuada entre as rainhas inseminadas quando comparadas com as rainhas seleccionadas que foram fecundadas naturalmente, e destas com ás rainhas testemunhas.

Neste estudo, a redução do nível de infecção entre os lotes parece ter sido essencialmente influenciada pelo efeito da localização dos diferentes grupos de colmeias distribuídas pelo apiário; a redução entre classes, provavelmente, parece ter sido fundamentalmente afectada pelo tipo de acasalamento a que foram submetidas as rainhas.

Tendo em atenção todos os resultados alcançados, pensamos que os testes de limpeza são técnicas eficazes para seleccionar o comportamento higiénico das abelhas locais, as quais apresentam uma resposta positiva, em relação a este carácter. No entanto, o programa de selecção e criação destes animais com o intuito de produzir estirpes limpadoras resistentes à Ascosferose apresentou-se eficaz mas como auxiliar de outras medidas de controlo da doença ou seja, juntamente com as práticas de manejo e os tratamentos farmacológicos. O que poderia indicar que, actualmente, as medidas de controlo baseadas somente na genética não proporcionam uma solução rápida, simples e clara para o tratamento desta doença.

ABSTRACT

This work, on bee pathology, intends to be a contribution to the selection of cleaning precocious strains resistant to the Chalkbrood disease. Thus, we began by a bibliographic revision about this disease, its pharmacological treatments, good management and selection of the hygienic behaviour as a resistant technique to the Chalkbrood disease. Based on hygienic behaviour researches and in special on the breeding and insemination of queen bees an experimental work was developed with the aim of study the hygienic behaviour of local bees as a main reason inherent to the selection program realized during the period of a year.

Utilizing as a statistical treatment the χ^2 two cleaning tests were realized on 20 hives to study this factor and to evaluated its efficacy within 24 hours.

It was considered that the total time necessary to the complete removal of all freeze-killed brood cells was inferior when, during a period of five days, 100% of the colonies showed a complete removal within 48 hours. While, to the pin-killed brood the uncapping and removal period ranged between one day, with complete remotion, and more than three days, with incomplete remotion. However, it was demonstrated the efficacy of Test 2 for evaluation of the hygienic behaviour since, in the great majority of the studied colonies, we obtained a significant χ^2 ($P \leq 0,0001$).

Using the same statistical treatment on queen rearing, only the existence of significant differences ($P \leq 0,05$) among the four series concerning the birth rates and the total queen breeding was proved, the acceptance rate in the hive incubators showed a great uniformity among series.

Through the instrumental insemination, a percentage of 80% of fertilized queen bees was reached, what suggests a satisfactory result in the use of this technic. Nevertheless different frequencies ($P \leq 0,01$) in the acceptance of queen bees after their introduction in the diseased colonies were verified having occurred the same to the fertile queen bees in what concerns the two types of mating.

In the pathological process only the monthly differences between October and September and between the initial and the final counting of the infection medium level were significant ($P \leq 0,01$) relatively to the groups. So, to these two variables we confirmed a significant level of contamination in group 4. Nevertheless, and during the sequence of countings, the medium level of infection has, in general, decreased in all the groups. The same tendency was observed in relation to the three categories, in which we can observe an evident decrease among the inseminated queens when compared with those naturally fertilized, happening the same when we compair these two categories with untreated queen group.

In the present study, the reduction of the infection level among groups seemed to have been essentially influenced by the effect of localization of the distinct groups of hives distributed by

the apiary ; the reduction among categories seemed to have probably been affected by the type of mating to which the queens were submitted.

Based on the results obtained we think the cleaning tests are efficient techniques that permit to select the hygienic behaviour of the local bees which show a positive answer in relation to this factor. However the selection and re-creation program which aims to produce cleaning strains resistant to Chalkbrood, *Ascosphaera apis*, proved to be efficient in conjunction with other measures of disease control, that means, in conjunction with management and pharmacologic treatments practice. This could indicate that, nowadays, the control measures based only on genetics do not afford a rapid, simple and clear solution to the treatment of this disease.

RÉSUMÉ

Ce travail, dans la pathologie apicole, prétend constituer une *contribution à l'étude de la sélection de lignées nettoyeuses précoces résistantes à l'Ascosporeose*. Ainsi, on a commencé pour mener une révision bibliographique sur cette maladie, traitements pharmacologiques pour la combattre, bonne conduite et sélection du comportement hygiénique comme un mécanisme de résistance à la Ascosporeose. En mettant en spécial relief les études et les techniques du comportement hygiénique et, en particulier, l'élevage et l'ensemencement des reines, on a développé un travail expérimental ayant par but d'étudier le comportement hygiénique des abeilles locales comme principal aspect inhérent au programme de sélection à réaliser tout au long d'une année.

On a réalisé deux tests de nettoyage dans 20 ruches pour étudier ce caractère et pour évaluer sa efficacité après 24 heures, en utilisant comme teste statistique le χ^2 .

On a considéré que le temps total nécessaire pour l'extraction complète de tous les alvéoles avec couvain morte par congélation a été assez moindre quand, par une période de 5 jours, 100% des colonies présentent extraction complète aux 48 heures. Tandis que, pour le couvain mort par ponction, celle-ci a variée entre un jour, avec extraction complète, jusqu'à plus de trois jours avec extraction incomplète. Cependant, on démontré l'efficacité du teste 2 pour l'évaluation du comportement hygiénique aux 24 heures, car dans la plupart des colonies étudiées on a obtenu un χ^2 significatif ($P \leq 0.0001$).

Dans l'élevage de reines, en utilisant le même test statistique, seulement a été prouvé l'existence de différences significatives ($P \leq 0.05$) entre les quatre séries par rapport aux taux de naissance et de couvain totale, le taux d'acceptation dans les colonies incubatrices présentant une grande uniformité entre séries.

Par l'insémination instrumentale, on a atteint un pourcentage de 80% de reines fécondées, ce qui suggère un succès satisfaisant dans l'application de cette technique. Malgré tout, se vérifient différentes fréquences ($P \leq 0.01$) dans l'acceptation de reines après leur introduction dans les colonies malades et le même par rapport aux reines vives et fertiles, en ce qui concerne les deux types de couplage.

Dans le processus pathologique seulement la différence mensuel entre Octobre et Septembre et la différence entre le contage final et initial, du niveau moyen de l'infection, ont été significatifs ($P \leq 0,01$) par rapport aux lots. Ainsi, on a prouvé pour ces deux variables, une réduction significative du degré de contamination dans le lot 4 par rapport aux autres. Néanmoins, et tout au long de la séquence des contages réalisées, le niveau moyen d'infection a été, d'une façon générale, même que ne pas constant et significatif, diminuant en tous les lots. La même tendance a été observée relativement aux classes dans lesquelles est évidente une réduction plus accentuée entre les reines inséminées quand comparées avec les reines sélectionnées qui ont été fécondées naturellement, et de celles-ci avec les reines témoins.

Dans cet étude, la réduction du niveau d'infection entre les lots semble avoir été essentiellement influencée par l'effet de la localisation des distincts groupes de ruches, distribués par rucher, la réduction entre classes probablement, semble avoir été surtout affectée par le type de couplage auquel ont été soumises les reines.

En considérant tous les résultats obtenus, on pense que les testes de nettoyage sont de techniques efficaces pour sélectionner le comportement hygiénique des abeilles locales, lesquelles présentent une réponse positive, par rapport à ce caractère. Néanmoins, le programme de sélection et d'élevage de ces animaux, ayant par but la production de lignées nettoyeuses résistantes à l'Ascosporeose s'est présenté efficace mais comme auxiliaire avec d'autres mesures de contrôle de la maladie, c'est-à-dire, avec les pratiques de conduite et les moyens pharmacologiques. Ce qui pourra indiquer que, à l'heure actuelle, les mesures de contrôle ne se basant que sur la génétique ne permettent pas une solution rapide, simple et claire pour le traitement de cette maladie.

é
oué
yp
de
le
, l
ée
ve
le
d
air

I - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I - INTRODUCCIÓN

La patología apícola es un área donde múltiples investigaciones se han desarrollado en los últimos años debido al agravamiento y a la difusión de enfermedades como la Varroasis y la Ascosferiosis, por todo el mundo. Su explosión en la actualidad, por lo menos en la Península Ibérica, refleja ya el problema de la resistencia del ácaro ante la variedad de fármacos disponibles en el mercado y utilizables indistintamente (caso de la Varroasis) y refleja también el gran problema del carácter factorial de la micosis y aún la gran adaptabilidad de los hongos en general, en el estudio de medidas preventivas y que eviten la predisposición a la enfermedad así como su difusión.

Hay que recordar que la Varroasis puede actuar como un vector de la Ascosferiosis de dos formas: una infestación por la Varroa puede destruir las barreras del mecanismo protector del hospedador y debilitar su sistema inmunológico o porque las esporas del hongo pueden estar unidas a la cutícula de los ácaros de la Varroa y entonces ocurre el padecimiento simultáneo de las dos enfermedades.

Así, la Ascosferiosis se ha convertido en una de las principales enfermedades de la apicultura actual y aún la primera desde el punto de vista sanitario, pues su incidencia creciente en este sector ocasiona pérdidas económicas importantes que resultan de los retrasos en el desarrollo de las colonias, de bajas importantes en las mismas, de una disminución de las producciones, de gastos de reposición, de tratamientos infructuosos, de pérdidas en los rendimientos agrícolas por polinización y también de pérdidas de colmenares por desmotivación de algunos apicultores ante estos problemas.

Hay que recordar también que en las colmenas y en las distintas abejas (domésticas y salvajes) se pueden encontrar varios tipos diferentes de hongos, pero son pocos los que causan enfermedades. Las dos especies conocidas, causantes de la Ascosferiosis en *Apis mellifera* son *Ascospaera apis* y *Ascospaera major*, dos variedades de hongos interfértiles y que pueden ser distinguibles morfológicamente. Sin embargo, a la segunda variedad se atribuye una menor importancia debido al bajo número de relatos observados en la identificación del agente patógeno causante de la enfermedad.

Sobre el ciclo biológico de *Ascospaera apis*, se puede decir que hablamos de un hongo heterotálico, cuya especial estructura, refleja una de las dificultades de lucha contra esta enfermedad.

Actualmente, no hay ningún método de control, aceptado universalmente, que pueda lograr el control de *Ascospaera apis* y la investigación científica y práctica esta concentrando la lucha principalmente en dos caminos: la vía química y la genética. Por ello se hace necesario llevar a cabo un programa de selección y cría de reinas basado en el comportamiento higiénico de las abejas, como un mecanismo de resistencia a la enfermedad.

Hay que evidenciar que un aspecto del comportamiento higiénico es el canibalismo sea, la ingestión por las abejas adultas de la cría enferma o muerta. En el caso de Ascosferiosis nos referimos al canibalismo de las larvas, lo que junto con el desoperculado la celdilla y la extracción de las pupas, complementa este comportamiento.

Dos de las particularidades de estos insectos sociales son, por un lado el origen partenogenético de los machos por lo que solamente es posible conocer la procedencia genealógica de la hembra y por otro, que practican la poliandria asociada al hecho de que la fecundación ocurre durante el vuelo nupcial, conlleva la dificultad de controlar los acoplamientos y reseña una de las ventajas de la inseminación instrumental. Así, la selección de abejas es mucho más difícil que en mamíferos o pájaros porque el acoplamiento no puede ser controlado y porque una reina se acopla con varios zánganos, por lo que es necesario el aislamiento de colmenares de fecundación para garantizar el hecho de que las líneas paternas sean elegidas por el seleccionador, pero solamente con la inseminación instrumental pueden, las líneas paternas, ser restringidas a machos específicos y permite la posibilidad de obtener el pleno control del acoplamiento para la aplicación de un programa de mejoramiento genético eficaz.

En la actualidad, donde lo que predomina es una apicultura moderna de tipo movilizadora la cría de reinas es un importante instrumento, puesto que permite la renovación de las reinas según las necesidades de los apicultores. Hacer nuevas colonias y mejorar sus características genéticas, implica una mejora de la capacidad de actuación de las abejas por el desarrollo de sus mejores rasgos y la eliminación de los negativos, para obtener como resultado final colonias homogéneas bajo todos los aspectos. Todo esto se traduce en un aumento de la producción e incluso un medio de ayuda en la lucha contra las enfermedades.

Así, la práctica de la cría de reinas e inseminación artificial es imprescindible en este estudio pues permite:

- obtener reinas selectas que transmitan a la descendencia un fuerte instinto de limpieza,
- conseguir colonias resistentes a la Ascosferiosis como base para empezar un programa de selección,
- mantener la pureza de las líneas de cría resistentes a la enfermedad,
- facilitar la sustitución de reinas resistentes como solución de manejo a la Ascosferiosis,
- implementar un buen sistema de cría que permita la mantención de un "stock" de reinas,
- controlar las líneas paternas respecto a los caracteres en estudio,
- evaluar las reinas inseminadas con los machos elegidos de las colmenas madre.

El empleo de la Inseminación Artificial es un medio auxiliar obligatorio en el trabajo de cría por selección y pone de manifiesto la importancia de la realización de un estudio previo para conocer el comportamiento de los ecotipos locales. Además, gracias a la inseminación instrumental, la genética de las abejas y la selección en apicultura, se hacen progresos importantes en la cría y selección de unas abejas más resistentes a las enfermedades.

Hasta el momento la mayoría de los trabajos existentes sobre la resistencia a la Ascosferiosis en *Apis mellifera* se basan en distintas formas de introducción del agente patógeno para su determinación y en algunas ocasiones se ha trabajado con colonias en que la infección ya esté presente.

En el presente trabajo de investigación nos hemos propuesto contribuir para el combate de esta enfermedad y todos aquellos factores que parecen tener influencia en su aparición y propagación al elegir como principal carácter a seleccionar la resistencia a la Ascosferiosis. En este sentido intentaremos conocer a fondo este carácter previo a un programa de selección y cría de abejas resistentes a esta enfermedad.

También trataremos de estudiar la influencia de las condiciones climáticas y de la "performance" de la colonia en el comportamiento higiénico para mejorar estas técnicas, para que se puedan determinar de una forma práctica.

1.1 - *Ascosphaera apis* EN LAS ABEJAS DE LA ESPECIE *Apis mellifera* L.

Del punto de vista patológico, se trata de una enfermedad de la cría de las abejas, llamada Ascosferiosis y/o Encalada pero también conocida con los nombres de pollo ayesado o pollo escayolado (pollo y/o cría yesificado o calcificado). El agente patógeno causante de esta enfermedad es el *Ascosphaera apis*.

1.2 - ETIOLOGÍA

Los hongos pertenecen a la clase de los Ascomycetos, a la familia Ascospaeraceae, orden Ascospaerales y especie *Ascosphaera* spp.

Según SKOU (1985) el gran interés del estudio de los hongos del orden Ascospaerales se basó en el uso cada vez más amplio de las abejas salvajes como polinizadoras de las plantas agrícolas y frutícolas, pero la razón ha sido debida al hecho de que estas abejas así como las abejas domésticas eran atacadas por los miembros de este orden de hongos. De los cuales, ya

son conocidas diez especies que viven como parásitas o saprófitas en asociación con las abejas melíferas o muchas otras especies de abejas solitarias (SKOU, 1983). Más tarde, BISSETT (1988) realizó una clave con la descripción y la identificación de las once especies de *Ascospaera* corrientemente reconocidas. Sin embargo, SEGUÍ-CRESPO y col. (1999) hicieron el primer catrasto de la micoflora en colmenas de abejas melíferas en Puerto Rico e identificaron once géneros y veintiun especies de hongos, aislados del fondo y la pared de las colmenas, polen, larvas y pupas de obreras y zánganos. Los mismos autores identificaron como agentes patógenos de las abejas melíferas de Puerto Rico: *Ascospaera apis*, *Aspergillus* sp. y *Mucor hiemalis*. Lo que está de acuerdo con BISSETT (1988) quien relató que de un ensayo que incluía momias de abejas de 12 estados de EE.UU., Canadá y Guatemala *Ascospaera apis* fue la única especie *Ascospaera* aislada.

Así la presencia de estos hongos en las distintas abejas (domésticas y salvajes) ha sido mencionada en la bibliografía hace mucho tiempo, intentando identificar las especies de sus agentes patógenos.

En 1911 ya existían indicios del hongo (*Ascospaera apis*) que provocaba la Ascosferiosis en las abejas de miel (*Apis mellifera*) pero solamente fue descrito en 1921. Mientras tanto, había sido confundido con el moho del polen (*Bettisia alvei*) (SKOU, 1985).

El mismo autor añade que estas dos especies eran los únicos miembros conocidos de orden Ascosphaerales hasta que MAURIZIO y PROKSCHL descubrieron dos variedades de hongos que provocaban la Ascosferiosis.

Lo que está de acuerdo con (MAURIZIO, 1935), citado por CARRERA y col. (1989) quien describió la identificación de dos formas no interfértiles y distinguibles por el tamaño, forma y color del ascocisto, una de las cuales fue más tarde reclasificada y atribuida a la especie *A. major* (SKOU, 1985). No obstante, la otra fue originalmente conocida como *Pericystis apis* pero ahora reclasificada y llamada *Ascospaera apis* (SPILTOIR, 1955; SPILTOIR y OLIVE, 1955; citados por BAILEY y BALL (1991)).

Este hongo infecta solamente larvas y causa la Ascosferiosis (TOUMANOFF, 1951; citado por BAILEY y BALL, 1991; SPILTOIR y OLIVE, 1955; citados por CARRERA y col., 1987; CRANE, 1990; GILLIAM, 1989 y 1990; SHIMANUKI, 1992) en *Apis mellifera*. Sin embargo, otras especies, tales como *A. major* también han sido relatadas como agentes causantes de la enfermedad (PUERTA y col. 1989; GILLIAM, 1989 y 1990).

Para confirmar estos datos PUERTA y col. (1989) realizaron un trabajo de contribución para el estudio de la etiología de la Ascosferiosis en *Apis mellifera*. Los autores observaron que, en 62 de las 75 muestras, *A. apis* producía larvas momificadas cuando éstas eran inoculadas oralmente con 50 000 esporas pero solamente 2 de las 75 larvas inoculadas con *A. major* se quedaron momificadas. Por otra parte, la virulencia de *A. major* tuvo un gran aumento

cuando se reducía la cantidad de alimento a las larvas o cuando se disminuía la temperatura de la cría de los 33° para los 18°C.

Los resultados han sugerido que la baja virulencia de las esporas de *A. major* podría ser la razón del bajo número de relatos aislados de larvas enfermas con *A. major*.

En lo que se refiere al ciclo biológico, se puede decir que la Ascosferiosis es una micosis producida por un hongo, cuyo aparato vegetativo de filamentos no tabicados lleva órganos reproductores, machos sobre algunos filamentos y hembras en otros (DUCOS de LAHITTE, 1988 y JEAN-PROST, 1989). Cuando dos micelios de signo opuesto se encuentran, las hifas laterales sobre las cuales se forman los elementos sexuales, copulan y el fruto de esta copulación son los cuerpos fructíferos sobre los cuales posteriormente se forman las ascas y a su vez las esporas (MARÍN y col., (1987) y DUCOS de LAHITTE, 1988). El ciclo biológico de *Ascospaera apis* ha sido estudiado, de forma a conocer las distintas etapas y su duración temporal por MARÍN y col. (1987) quienes observaron, bajo las condiciones de cultivo "in vitro" a 22°C, que el tiempo mínimo requerido por el hongo para producir una segunda generación, es en términos generales, de un mes y medio, como se puede observar en la figura 1.

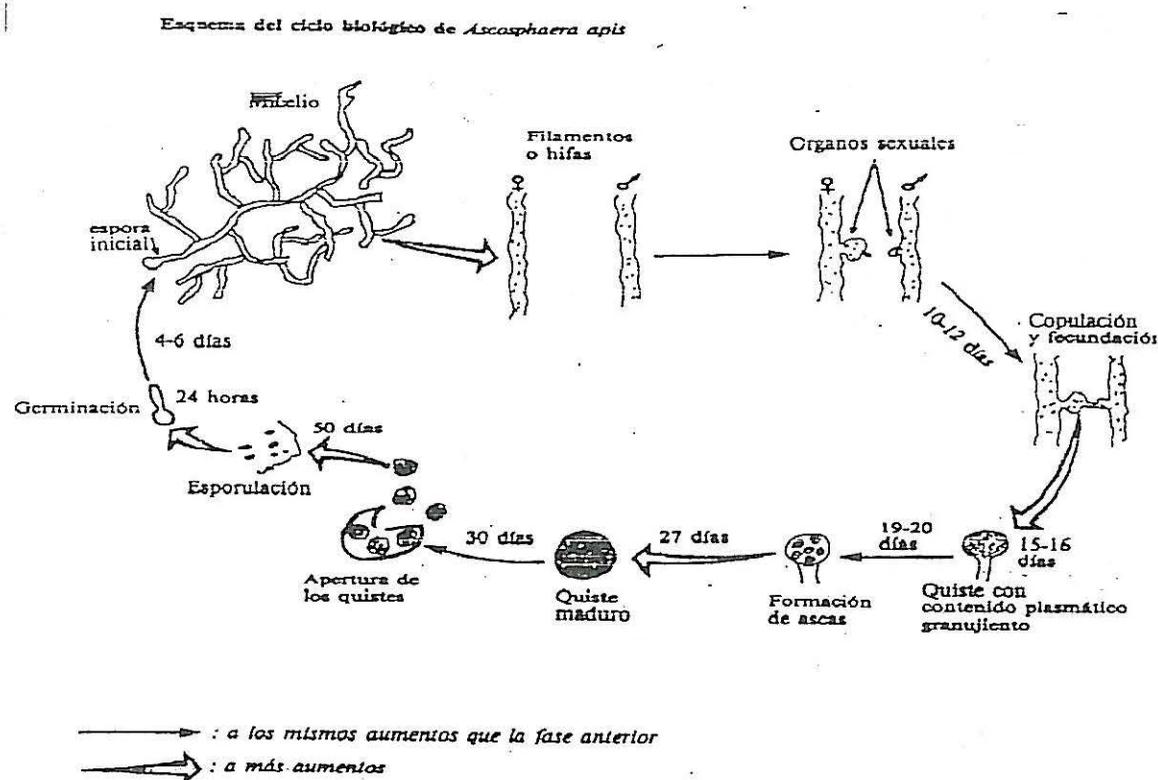


Figura 1: Esquema del ciclo biológico de Ascosferiosis, adaptado de MARÍN y col (1987).

Lo que está en concordancia con lo que señalaron CARRERA y col. (1989); GILLIAM (1990, 1991) y ALONSO RODRÍGUEZ y col. (1992) sobre la estructura del hongo, quienes afirmaron que está constituida por esporas en el interior de ascas y éstas a su vez en el interior de cuerpos fructíferos o ascocistos y TOUMANOFF (1951; citado por BAILEY y BALL, 1991) añade que aparecen en la superficie exterior de la cutícula de la larva. Los mismos autores consideran que este hecho hace muy difícil la lucha contra *Ascospaera apis* y además como han afirmado BAILEY y BALL (1990) y GILLIAM (1989 y 1990) su poder de infección puede permanecer por lo menos hasta los 15 años o hasta los 38 años.

Cuando se abren los ascocistos, se liberan las esporas formadas en su interior, que podrán ser ingeridas por larvas y desencadenar la enfermedad (CARDENAL GALVÁN y col. 1990).

Las esporas son muy resistentes, de modo que pueden acumularse en la colmena contaminando ésta paulatinamente. Éstas suelen germinar y desarrollarse dentro del tubo digestivo de la cría lo que origina las momias (PUERTA y col., 1990). Se ha visto también que, el agente patógeno es heterotálico una vez que las esporas se forman solamente cuando dos clases diferentes de micelios se juntan (TOUMANOFF, 1951; citado por BAILEY y BALL, 1991) (DUCOS de LAHITTE, 1988; BISSETT, 1988; GILLIAM, 1989 y 1990), consecuentemente las momias pueden ser blancas, grises o negras.

El mecanismo de la propagación de la Ascosferiosis ha sido investigado y descrito por TAKAKI y col. (1985) como se puede observar en la figura 2.

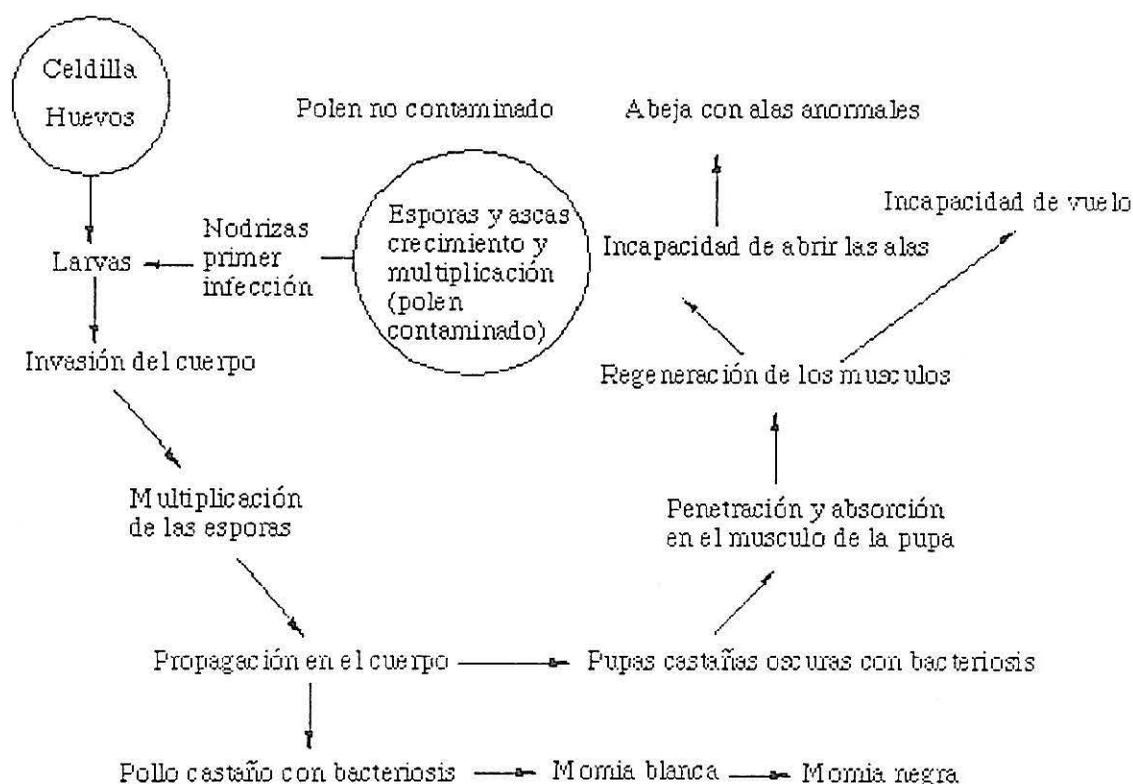


Figura 2: Mecanismo de propagación de la Ascosporeosis, adaptado de TAKAKI y col (1985).

Estos autores supusieron que la formación del micelio ocurría en el interior del cuerpo de las larvas e hicieron medios de cultivo para testar el crecimiento y consecuentes cambios del agente patógeno. Sus resultados fueron comparados con otros datos que habían obtenido de la investigación patológica de los tejidos de las larvas infectadas, de un test de ocurrencia de la patología infecciosa de larvas normales, de la inspección de *A. apis* en los granos de polen y de la búsqueda del agente patógeno en las alas anormales de las abejas. Por lo cual, sugirieron en las conclusiones de su trabajo que la contaminación se puede iniciar por las abejas pecoreadoras y por el pillaje así como por las prácticas de manejo efectuadas por el apicultor. El aumento del número de las proesporas y proascas en el polen almacenado es el resultado del ambiente caliente y húmedo que las obreras mantienen en la colmena. También sugirieron que la cría es alimentada con el polen contaminado, que después de digerido libera las proesporas y las proascas. Así, las proesporas penetran por vía bucal en el cuerpo de las larvas a través del epitelio del tramo digestivo y son absorbidas por el tejido graso, crecen y su multiplicación origina las proascas que provocan la desintegración de las celdas y tejidos. Al final ocurre la liberación y la dispersión de las proesporas y proascas y la cría muere como resultado de la desintegración de los tejidos y de una bacteriosis. Como las proascas se multiplican en el interior del cuerpo del pollo muerto, éste se queda castaño oscuro y blando. Las proascas, en el

interior del cuerpo del pollo, se juntan una a una y se alargan para formar el micelio. La multiplicación del micelio cambia los cuerpos en momias blancas, las cuales se quedan negras momificadas a través de la formación de los cuerpos fructíferos. Los mismos autores sugieren además que *A. apis* (en la forma de proesporas y proascas) afecta a las abejas no sólo en el periodo larvar sino que también en la fase de pupas y adultos y que la anomalía de las alas en cuestión fue un disturbio funcional atribuido a la degeneración y desaparición del tejido muscular a lo largo del periodo de pupa hasta el periodo adulto.

De acuerdo con un gran número de autores, esta enfermedad causa gran debilitamiento en las colonias afectadas y que una forma de combatirla sería producir estirpes de abejas con buen comportamiento higiénico.

1.3 - SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO

Los huevos y pupas no son tan susceptibles a la infección del hongo como las larvas a partir de los tres a cuatro días de edad (CARRERA y col., 1987; GILLIAM, 1991), y las prepupas, siendo la susceptibilidad mayor en las larvas más viejas (4 a 6 días) (CHANG y col., 1989; GILLIAM, 1990). Paralelamente a este raciocinio, CRANE (1990) y BAILEY y BALL (1991), afirman que las larvas infectadas generalmente mueren entre los primeros dos días después que sus celdas han sido opérculadas o bien como prepupas.

Así, las momias son negras si en las larvas afectadas se han formado los ascocistos o momias blancas en las que sólo existen micelios de un signo (DUCOS de LAHITTE, 1988; SHIMANUKI, 1992; ALONSO RODRIGUEZ y col., 1993a,b), lo que está de acuerdo con JEAN-PROST (1989) y GILLIAM (1989 y 1990) quienes afirman que las larvas atacadas por una sólo clase de filamentos (micelios de un signo) mantienen su color blanco incluso después de su muerte (momias blancas) y las que tienen filamentos macho y filamentos hembra se vuelven grises y después negras cuando el hongo forma sus órganos reproductores (momias negras).

Se puede decir entonces que las larvas muertas se quedan inicialmente cubiertas con los filamentos blancos del micelio en crecimiento, (se hinchan) ocupando toda la celdilla para más tarde retraerse, quedarse duras y quizás cambiar de gris a negro si los ascocistos se han formado, o sea, se quedan momificadas (GILLIAM, 1990; BAILEY y BALL, 1991; CALVET y col. 1992), esto refleja el proceso global de la infección.

DUCOS de LAHITTE (1988) y BAILEY y BALL (1991) también consideraron que las larvas de zánganos están más afectadas que las de las obreras pero no es infrecuente encontrar

cuadros sólo con las larvas de obreras infectadas. Esta conexión nos recuerda lo que dijeron GILLIAM y VANDENBERG (1990) que, debido al factor enfriamiento, las larvas afectadas eran usualmente encontradas en la periferia da área de cría y por esta razón se creyó que solamente las larvas de zánganos estaban afectadas una vez que éstas estaban frecuentemente en la periferia del nido de cría.

En relación a la sintomatología, CALVET y col. (1992) y RAMÍREZ (1994) afirmaron que es característico de esta enfermedad el ruido de tableteo al agitar los panales por golpeteo de las larvas, debido a su consistencia dura y poca adherencia a las paredes de la celda (DUCOS de LAHITTE, 1988). Otras características son la aparición de larvas en la piquera por limpieza de los panales afectados, pero las momias también pueden ser encontradas en el fondo, alrededor de la colmena y en el suelo (DUCOS de LAHITTE, 1988 y RAMÍREZ, 1994); así como en las celdillas de la cría operculada y desoperculada (GILLIAM, 1989 y 1990), porque tanto las larvas jóvenes como las más viejas son susceptibles a la enfermedad y también porque algunas colonias de abejas operculan sus celdillas con larvas enfermas en vez de hacer su remoción. Este hecho potencializa la infección en la colmena, una vez que las momias se quedan almacenadas en las celdas operculadas. Por lo que, la remoción de las momias de la colmena por las abejas limpiadoras es la mejor situación para minimizar este problema (GILLIAM, 1989).

A menudo, también se puede observar la dispersión de la cría, con grandes cantidades de celdas desoperculadas que dan a la cría un aspecto de mosaico (DUCOS de LAHITTE, 1988; CALVET y col., 1992), lo que también es una forma de identificar esta enfermedad.

Otra interpretación es la de VEY (1990) cuando refirió que generalmente el primer síntoma del desarrollo de la Ascosferiosis en la colmena es el aspecto amarillo de las larvas y que algunas se quedan amarillentas y una parte de éstas muestran manchas acastañadas en la cutícula.

En lo que se refiere al diagnóstico, se puede decir que generalmente éste está basado en su aspecto clínico-lesional, una vez que es muy sencilla su observación macroscópica, pero la identificación precisa y rigurosa de la especie etiológica exige la intervención laboratorial y además, debido a la creciente lista de especies que integran el género del agente patógeno así como la dificultad del tratamiento "in vivo" del proceso, podemos constatar que es muy complicado hacerlo. Lo que está en concordancia con GILLIAM y LORENZ (1995) : "Habitualmente, el diagnóstico del pollo escayolado en una colmena de abejas melíferas sólo se basa en la presencia de larvas momificadas. Lo cual puede conducir a un diagnóstico incorrecto, por ejemplo, del pollo petrificado".

Los mismos autores añaden que las identificaciones incorrectas pueden surgir debido a una gran confusión causada por la variabilidad y superposición de las especies y de las características morfológicas de los hongos, siendo muy importante para la identificación el test

de acoplamiento, el cual exige la separación de los tipos de acoplamiento del crecimiento esporulado.

Para confirmarlo tenemos una multiplicidad de estudios morfológicos sobre el mismo tema.

CARRERA y col. (1989) llevaron a cabo sus investigaciones morfológicas morfológicas, para la determinación con la ayuda del microscopio electrónico de barrido de especie de hongo responsable de la Ascosferiosis en el norte de Italia. Este trabajo se centralizó en la observación de la forma y dimensión de los ascocistos, ascas y esporas. Aunque los métodos estadísticos empleados son muy simples, una vez que solamente utilizaron el Test t de Student para comparación de las medias del diámetro de los ascocistos, realizaron una ingeniería de preparación de las muestras (larvas momificadas recogidas en diversas provincias de Lombardía) para su observación microscópica. Usaron, también, la relación de valores encontrados por MAURIZIO (1935), SPILTOIR y OLIVE (1955) y GOCHNAUER y MARGETTS (1979), en la comparación de sus datos, para una determinación taxonómica más correcta de la especie del hongo, como se puede observar en la tabla nº 1. Por lo que concluyeron, que el hongo responsable de la enfermedad en el norte de Italia, pertenecía a la especie *Ascospaera apis*.

Tabla nº 1: Comparación de los caracteres morfológicos medidos por CARRERA y col. (1989) y las cepas de referencia para *Ascospaera apis* y *Ascospaera major*.

	<i>A. apis</i>	<i>A. major</i>	Observada
Diámetro del ascocisto μm	46-87	86-200	42-84
Diámetro de las ascas μm	13-9.4	11-20	12-18
Dimensiones de las ascosporas o esporas μm	2.3-2.8*1.7-2.1	3.2-4.0*1.3-1.4	2.3-2.5*1.6-1.8
Superficie externa del ascocisto	Lisa con papilas	Lisa	Lisa con papilas
Superficie interna del ascocisto	Cubierta de papilas cristaloides	No existen datos	Cubierta de papilas cristaloides
Ascosporas	Ausencia de membrana	Presencia de membrana	Ausencia de membrana

Otro ejemplo, son los varios trabajos realizados por ALONSO RODRÍGUEZ y col. Estos autores, en sus estudios del año 1992, concluyeron que las características morfológicas son las observadas tanto en las cepas no esporuladas, en las que sólo existe micelio, como en las esporuladas, donde además se aprecian ascocistos, ascas y ascosporas.

Las hifas son rectas y lisas, con ramificaciones en general dicotómicas y septos gruesos, que persisten tras el colapso del micelio. Los ascocistos son esféricos, midiendo 46-87 μm de diámetro (CARRERA y col., 1989) o 40-110 μm de diámetro con una media de diámetro de 70 μm (BISSETT, 1988). Lo que está en concordancia con DUCOS de LAHITTE (1988) quien refirió que los cuerpos fructíferos difieren según las especies, presentando en *Ascospaera apis* una gran variabilidad de tamaño en un rango de 32 a 120 μm , según los autores, y en *Ascospaera major* los ascocistos de color castaño oscuro median entre 60 a 200 μm . Lo que corrobora los estudios de TOUMANOFF (1951); citado por BAILEY y BALL (1991) quien anteriormente había referido que la medida del diámetro sería aproximadamente 60 μm . El color de los ascocistos es verde oliváceo a parduzco (DUCOS de LAHITTE, 1988; GILLIAM, 1990 y ALONSO RODRÍGUEZ y col., 1992), y su ruptura evidencia la doble membrana que constituye su pared, con una grosor aproximado de 0.15 μm (CARRERA y col., 1989) y con una capa externa hialina y otra interna pigmentada. La cara externa de la pared de los ascocistos es lisa, aunque presentan a veces fracturas y abundantes pliegues en las formas inmaduras o papilas, midiendo 0.7 μm como refiere CARRERA y col. (1989). La superficie interna tiene muchas papilas pequeñas y cristaloides como añade CARRERA y col. (1989), midiendo 0.19-0.29 μm . Además, este último autor refiere que las ascas, de forma esférica, son formaciones compactas de esporas viscosas, midiendo 12-18 μm de diámetro, mientras que DUCOS de LAHITTE (1988) había referido que el tamaño de estas estructuras variaba entre 7 a 19 μm con una media de 20 μm de diámetro (BISSETT, 1988) y en *Ascospaera major* entre 9 a 24 μm . Lo que está de acuerdo con ALONSO RODRÍGUEZ y col. (1992) quienes observaron, posteriormente, que estas estructuras presentan una gran variabilidad de tamaño. A su vez, las esporas maduras tienen una forma elipsoidal, con un pequeño achatamiento central y con las siguientes dimensiones 2.3-2.5x1.6-1.8 μm (CARRERA y col., 1989) o 2.1-3.9x1.1-1.7 μm (media 2.9x1.4) (BISSETT, 1988), mientras que las esporas de *A. major* tienen dimensiones superiores a 1.6 μm . Según BISSETT (1988) el pequeño tamaño del ascocisto y esporas distingue las dos especies así como también la aparente inexistencia de revestimiento granular en *A. major*.

Con el objetivo de profundizar en la variabilidad intraespecífica del agente patógeno de la Ascosferiosis ALONSO RODRÍGUEZ y col. hicieron otro trabajo en el año 1994. Estudiando las actividades enzimáticas desarrolladas por 125 cepas de *Ascospaera apis*, las 3 cepas de referencia y las cuatro características morfométricas: diámetro de ascocistos y ascas, longitud y

grosor de ascosporas. Elaboraron una matriz de datos y utilizaron como tratamiento estadístico un Análisis de Componentes Principales para delimitar las variables que aportaban mayor información, seguido de un Análisis Cluster para agrupar las diferentes cepas.

Como resultado del Análisis de Componentes Principales y de Cluster, se dedujo una gran homogeneidad existente entre las cepas de *A. apis* en cuanto a su dotación enzimática. Sin embargo, algunos de los resultados del método semicuantitativo indicaron la existencia de una cierta variabilidad subespecífica dentro de esta especie la cual queda corroborada en el primer análisis por el hecho de que la mayor varianza explicada sobre el conjunto de cepas se deba a los resultados de dichas actividades, en detrimento del papel desempeñado por las variables de tipo morfométrico. En lo que se refiere al análisis de Cluster el criterio enzimático es preponderante cuando se establecen los distintos grupos de cepas, observándose dos grandes grupos.

Los autores proponen que las actividades enzimáticas en las que se comprobó variación por el método semicuantitativo podrían ser sometidas a caracterización de isoenzimas mediante electroforesis en gel de acrilamida, según la técnica de (MAGHRABI y KISH, 1985), citada por ALONSO RODRÍGUEZ y col. (1994) y que por otra parte estas variaciones se deberían aprovechar en los futuros estudios epidemiológicos y etiopatogénicos y además en los de sensibilidad "in vitro" a antifúngicos.

Sin embargo, ya otros trabajos preliminares (VEY, 1990; ALONSO y col. 1993) habían demostrado una gran homogeneidad entre cepas de *A. apis* con la utilización del sistema API ZYM. Además, otros han sido hechos con la ayuda de marcadores enzimáticos; así, en 1991 GILLIAM y LORENZ observaron que el principal marcador enzimático era la valin aminopeptidasa la cual era producida por cepas no compatibles, pero que la beta-galactosidasa y la alfa-manosidasa serían también posibles marcadores para las cepas compatibles y no compatibles, una vez que eran producidas por la mayoría de las cepas testadas y raramente por otros mohos asociados a las abejas.

1.4 - DISTRIBUCIÓN

Ascospaera apis es una enfermedad característica de las regiones frías y húmedas del mundo.

Según CRANE, (1990) y BAILEY y BALL (1991), generalmente aparece en muchos países de las zonas templadas del hemisferio norte, pero solamente en algunos países de los trópicos o subtropicos.

La literatura sobre la ocurrencia de la Ascosferiosis es bastante extensa. La primera publicación que se refiere a esta enfermedad data del inicio de los años 10, más concretamente en 1913 en Alemania por MASSEN (TAWARA, 1985 y DUCOS de LAHITTE, 1988) y en el

primer cuarto del siglo XX, solamente había sido relatada en Europa, (TAWARA, 1985; GILLIAM, 1989 y 1990), respectivamente en Escandinavia y Rusia (BETTS, 1932; citada por BAILEY y BALL, 1991). En estas fechas las enfermedades provocadas por los hongos eran descritas como "poco vulgares", "no siendo consideradas una amenaza por los apicultores" y de "poca importancia económica" (TOMASEC, 1955 y BAILEY, 1963 citados por SULIMANOVIC (1989), GILLIAM (1990)). Sin embargo, años después ya la Ascosferiosis representaba 80% de los diagnósticos de micosis en apicultura (ILIESU, 1973).

Así GILLIAM Y VANDENBERG (1990) dieron a conocer un resumen de varios autores que habían relatado la distribución de la Ascosferiosis en Europa, incluyendo las Islas Británicas. Como por ejemplo, MASSEN (1913), BETTS (1919, 1932, 1951), ZANDER (1919), ANDERSON (1934, 1938), MAURIZIO (1934), DREHER (1938), DEANS (1940), MORGENTHALER (1944), TABERLY y MONTEIRA (1961), ROUSSY (1962), BAILEY (1963a, 1968a), MCLELLAN (1964), GIAUFFRET y TALIERCIO (1967), BARTHEL (1971), LUNDER (1972) y MATUS y SARBAK (1974). También SULIMANOVIC y col. (1985) y SULIMANOVIC (1989) relataron que relativamente a los últimos años, en Yugoslavia el primer diagnóstico de la enfermedad se hizo en 1976. En el año siguiente KORDOS (citado por SULIMANOVIC y col., 1985 y SULIMANOVIC, 1989) informaron del elevado daño causado por ésta en Hungría.

Seguidamente citamos algunos de los trabajos sobre la distribución de la Ascosferiosis en otros continentes.

Ya en el año de 1968, BAKER y TORCHIO (citados por GILLIAM y VANDENBERG, 1990) hicieron la primera detección de *A. apis*, en California (América del Norte) (GILLIAM, 1989 y 1990; SHIMANUKI y col., 1992).

Ségun describe GILLIAM (1989 y 1990) en los 12 años siguientes la enfermedad se propagó por todo el continente provocando daños considerables. Sin embargo, Australia parece ser una excepción, quizás debido en parte a las estrictas reglas en lo que respecta a las importaciones.

En el presente, se puede decir, que la Ascosferiosis es cosmopolita, como se puede ver en la tabla nº 2, según ha expuesto GILLIAM (1989).

Tabla nº 2: Distribución de la Ascosferiosis en el mundo (GILLIAM, 1989)

ÁFRICA	CARIBE
Túnez	Cuba
AMÉRICA	San Cristóbal y Nieves
Argentina	EUROPA
Belice	Austria
Canadá	Checoslovaquia
Guatemala	Dinamarca
Honduras	Francia
México	República Federal de Alemania
EE.UU.	Grecia
Venezuela	Hungría
ASIA	Irlanda
Burma	Italia
China	Países Bajos
Irán	Noruega
Japón	Polonia
Filipinas	España
Corea del Sur	Suecia
Tailandia	Suiza
AUSTRALASIA y OCEANÍA	Reino Unido
Nueva Zelanda	URRS
Hawai	Yugoslavia

SEAL (1957) (citado por GILLIAM y VANDENBERG, 1990 y BAILEY y BALL, 1991) la notificó en Nueva Zelanda, sin embargo, solamente fue confirmada en 1984 (MURRAY, 1993).

FURUYA y col. (1981) y TAKATORI y TANAKA (1982) identificaron y relataron su ocurrencia en Japón, aunque la primera noticia corresponde a HIROSE y col., en el año de 1976, según TAWARA (1985). Esto no corrobora el estudio de KODOMA (1985) quien relató que la enfermedad fue detectada en Japón por primera vez en marzo del año de 1973, entre colonias que habían sido transferidas de Kagoshima Prefecture para Gifu Prefecture.

ROSSI y CARRANZA (1980) (citados por GILLIAM y VANDENBERG, 1990) la denuncian en Argentina. Lo que está de acuerdo con HEATH (1985) quien dijo que sólo a partir de los años setenta había sido detectada en Argentina, Japón, Filipinas, América Central y México. Así, HANLIN y SAUNDERS (1989) hicieron la descripción de la enfermedad en

Georgia (EE.UU.). Sin embargo, ya HITCHCOCK y CHRISTENSEN en 1972 habían hecho referencia a esta enfermedad en los EE.UU. según TAWARA (1985) y más tarde TABER y col. (1975) (citados por SULIMANOVIC, 1989) ya habían informado sobre su propagación por todos los EE.UU. con un incremento del porcentaje de colmenas enfermas.

Este mismo hecho también apareció como la primera aparición de *A. apis* en Canadá por GOCHNAUER y col. (1972) (citados por GILLIAM y VANDENBERG, 1990) y TAWARA (1985). Sin embargo, HEATH (1985) dijo que solamente a partir de 1970 fue oficialmente reconocida en los EE.UU. y Canadá. Un ejemplo puede ser el trabajo de NELSON y col. (1977), que inspeccionaron 5374 colonias en cinco provincias de Canadá y encontraron que 32% tenían momias en los cuadros, además 72% de las colonias infectadas tenían, cada una, menos de 10 celdas con Ascosferiosis. Observaron también que 33% de los paquetes de abejas y 20% de las colonias invernales tenían momias en el momento de la inspección y sugirieron que aunque no se hubiera demostrado experimentalmente, el número total de colonias incluidas podría indicar que la enfermedad afectaba la producción de miel. A continuación NELSON y GOCHNAUER (1982) intentaron determinar el nivel de infección necesario para demostrar las pérdidas económicas relativamente a la cría y a la producción de miel y concluyeron que el nivel de pérdidas de cría variaba en un rango de 0,004 a 4% y que la producción de miel no estaba afectada con este nivel de infección. Además ROSENTHAL y col. (1992) constataron, que el grado de infección de micosis apreciado según los signos exteriores de la enfermedad influía directamente en el desarrollo de las colonias, lo que implicaba una disminución de la cosecha obtenida.

Hasta el momento, existen controversias en cuanto al origen y propagación de esta enfermedad entre países e incluso en lo que se refiere al interior de cualquier país.

Así pues, un punto de vista es el de HEATH (1985) para lo cual su detección quizás haya sido debida al aumento de los conocimientos y al interés de los investigadores. Otros, como GOCHNAUER y col. (1975) y CONNOR (1974b) (citados por GILLIAM y VANDENBERG, 1990 y GILLIAM 1989, 1990) han relatado la opinión expresada solamente por los apicultores americanos, para los cuales posiblemente la enfermedad ha estado presente durante décadas pero ha sido considerada insignificante, lo que es muy improbable según GILLIAM (1989 y 1990) en la medida que muchos microbiólogos e inspectores de colmenas han examinado las enfermedades de las abejas y harían su detección si estuviera presente. Otra idea es la generalizada por varios autores que piensan que probablemente los hongos hayan sido solamente introducidos recientemente, quizás en el polen importado o entonces como afirma GILLIAM (1990), su rápida propagación haya sido debida probablemente a la comercialización de reinas abejas embaladas industrialmente y a la trashumancia. Además, otras posibilidades también referidas por la misma autora son la función que se puede atribuir a las abejas solitarias o las abejas salvajes como reserva de inóculo para las abejas melíferas y también al hecho de

que quizás el hongo solamente haya sido introducido recientemente en el polen importado o reinas y abejas ilegalmente comercializadas. Otro factor considerado en el incremento de importancia de la Ascospferiosis ha sido la utilización excesiva de antibióticos y acaricidas provocando el debilitamiento de las colonias de abejas por la disminución de la resistencia de las larvas a los hongos (SULIMANOVIC y col., 1987; SULIMANOVIC, 1989). Anteriormente SULIMANOVIC y col. (1985) habían referido que además del uso excesivo de los antibióticos un insuficiente cuidado en la selección de abejas serían los principales factores de la propagación de la Ascospferiosis.

Continúan haciéndose estudios, una vez que existen muchas posibilidades que todavía no han sido examinadas. Una investigación muy interesante es la que hicieron MOSSADEGH y ALIZADEH (1995) en 14 Provincias de Irán, sobre *Apis mellifera* y *Apis florea*. Este estudio se apoyó en las características morfológicas del hongo y en el efecto de varias temperaturas en el crecimiento medio del micelio, así como en la clasificación de 10 variedades de estructuras sexuales aisladas en Irán cuando comparadas con cepas de referencia de *Ascospaera apis*.

También hay que tener en cuenta el efecto del estrés provocado por otras enfermedades que han ido aumentando, lo que origina un incremento en la incidencia de la Ascospferiosis debido al debilitamiento de nuestras colonias de abejas.

1.5 - PROPAGACIÓN

Esta enfermedad se transmite a través de las esporas del hongo, siendo su periodo de propagación la primavera y el otoño (RAMIREZ, 1994).

Las esporas, a su vez, son transmitidas por las reinas infectadas, obreras, pollos operculado y desoperculado de las colonias enfermas (HERBERT y col., 1977), polen y flores contaminadas, los materiales contaminados del apicultor, el propio apicultor, por la deriva de las pecoreadoras y por el pillaje (DUCOS de LAHITTE, 1988; GILLIAM, 1989; MURRAY, 1993). Este último autor añade que las esporas son pegajosas y pueden ser encontradas en las flores, el polen, en la superficie del cuerpo de las pecoreadoras y en sus ventrículos. Éstas contaminan incluso la miel, la cera y las colmenas (DUCOS de LAHITTE, 1988). A su vez GILLIAM (1989) ya había referido que éstas permanecen viables en el polen por lo menos un año y en la miel pueden sobrevivir dos años, lo que potencializa su poder de infección en las prácticas de manejo.

La Ascospferiosis es considerada una enfermedad factorial, una vez que son muchos los factores condicionantes para el desarrollo del agente patógeno y así GILLIAM (1989 y 1990) los ha clasificado como estresantes y a la enfermedad la denominó enfermedad relacionada con el estrés y lo mismo piensan otros autores, como CRANE (1990) y GILLIAM y VANDERBERG (1990).

Vamos ahora hacer una retrospectiva de algunos de estos factores, que se recogen en la tabla nº 3, según varios autores.

TABLA nº 3: Factores de estrés relacionados con la Ascosporeosis, hallados por diferentes autores

FACTOR DE ESTRÉS	REFERENCIAS
Mala ventilación en las colonias	(CRANE, 1990) (GILLIAM, 1989 y 1990)
Tiempo frío y humedad	(TABER y GILLIAM, 1988) (GILLIAM, 1989 y 1990) (CARDENAL GALVÁN, 1990) (CRANE, 1990)
Colonias parcialmente ocupadas a lo largo del invierno	(GILLIAM, 1989 y 1990) (BAILEY y BALL, 1991)
Temperaturas elevadas y humedad	(DUCOS de LAHITTE, 1988) (TABER y GILLIAM, 1988) (GILLIAM, 1989 y 1990)
Colonias débiles	(DUCOS de LAHITTE, 1988) (CRANE, 1990) (GILLIAM, 1989 y 1990)
Colonias con bajo grado de abejas adultas para cuidar de la cría	(DE JONG, 1976) (DUCOS de LAHITTE, 1988) (CRANE, 1990) (GILLIAM, 1989 y 1990) (GILLIAM y VANDENBERG 1990) (MURRAY, 1993)
Colonias debilitadas con otras enfermedades incluyendo el acáro <i>Varroa jacobsoni</i>	(CHMIELEWSKI y GLINSKI, 1987) (GLINSKI, 1988) (TABER y GILLIAM, 1988) (DUCOS de LAHITTE, 1988) (SULIMANOVIC, 1989) (GILLIAM, 1989 y 1990) (CRANE, 1990) (MOOSBECKHOFER, 1991) (MURRAY, 1993)
Factores genéticos	(SULIMANOVIC y col., 1985) (TABER y GILLIAM, 1988) (GILLIAM, 1989 y 1990) (MOOSBECKHOFER, 1991)
Alimentación líquida	(GILLIAM, 1989 y 1990)
Manipulación excesiva de las colonias	(GILLIAM, 1989 y 1990) (MOOSBECKHOFER, 1991) (BEFUS-NOGEL y col., 1992)
Deficiente aporte alimenticio a la cría Déficit de polen	(DE JONG, 1976) (HERBERT y col., 1977) (KOENIG, 1987) (TABER y GILLIAM, 1988) (GILLIAM, 1989 y 1990) (MURRAY, 1993)
Malas condiciones a lo largo de un periodo para las pecoreadoras	(GILLIAM, 1989 y 1990)
Permuta de reinas, abejas adultas o cría	(VEY, 1990)
Enfriamiento de las larvas	(GILLIAM, 1989 y 1990) (MURRAY, 1993)
El amplio uso de antibióticos para combatir las enfermedades de las abejas	(SULIMANOVIC y col., 1985) (PRABUCKI y GORSKI, 1987) (DUCOS de LAHITTE, 1988) (GILLIAM, 1989 y 1990)

Para Crane (1990) existe evidencia de que las condiciones de humedad y una escasa ventilación en la colmena, así como los climas fríos forman parte de una serie de factores que favorecen la enfermedad y que pueden ser parcialmente controlados por el apicultor (CARDENAL GALVÁN, 1990).

Otro de los factores predisponentes que merecen ser considerados es el padecimiento previo o simultáneo de enfermedades que debilitan la población adulta de las colonias (CRANE, 1990). Lo que está de acuerdo con otros trabajos preliminares, como por ejemplo, el de GLINSKI (1988) que demostró que *Varroa jacobsoni* actuaba como vector de *Ascosphaera apis*. Las colonias infestadas con el ácaro tenían una mayor incidencia de Ascospferiosis que aquellas que todavía no lo habían tenido, una vez que la infestación por *V. jacobsoni* destruye las barreras del mecanismo protector del hospedador y debilita el sistema inmunológico de las abejas *Apis mellifera*. Lo mismo ha sido demostrado en trabajos más recientes como el de LIU (1996) quien aisló las esporas del hongo de los ácaros de *Varroa* por centrifugación en gradiente de Percoll discontinuo, observando en una de las muestras una media de 3598 esporas por ácaro. Sus observaciones al microscopio electrónico de barrido confirmaron que las esporas estaban unidas a la cutícula de los ácaros de *Varroa jacobsoni*.

Así pues, tenemos que tener en cuenta que colonias fuertes con una buena alimentación (CRANE, 1990 y GILLIAM y VANDERBERG, 1990), en las cuales, la cría está bien calentada y estén con una buena situación sanitaria son menos susceptibles a sucumbir, que las colonias débiles con pocas abejas adultas para cuidar la cría y cubrir los cuadros de la colmena (CRANE, 1990; MURRAY, 1993). BAILEY y BALL (1991) han afirmado que las micosis se agravan con las prácticas de manejo provocando pérdidas del calor en las colonias, principalmente en la primavera o en un verano precoz cuando la incidencia de la Ascospferiosis es más elevada.

Un ejemplo de esto es el trabajo desarrollado en Wisconsin, en el año de 1987 por KOENIG sobre los factores que contribuyen en la patogenicidad de la Ascospferiosis. Así estudió las incidencias estacionales en el desarrollo del ciclo de la Ascospferiosis y verificó que la enfermedad inicialmente surgía a lo largo de la primavera, teniendo su pico en el mes de julio y después disminuía gradualmente en agosto y septiembre, con modelo similar al de la producción de la cría. Además, en sus resultados verificó también que los cuadros viejos con cría contribuían al desarrollo de la enfermedad y sugirió que su transmisión podría deberse a la contaminación de las fuentes del alimento, como el agua y el polen. Una confirmación a estos resultados la obtuvo LUGANSKII (1988) en su estudio sobre la identificación del hongo en el polen. Con este objeto realizó un cultivo en el medio agar patata maltosa-dextrosa y Sabouraud e identificó los artrópodos que posiblemente infestan el polen y actúan como vectores de la enfermedad.

Otro factor sugerido como contribuyente para la expresión de la enfermedad ha sido el amplio uso de antibióticos para combatir las enfermedades de las abejas. Una vez que varios autores han referido que los antibióticos podrían incrementar la incidencia de la Ascospferiosis debido a la perturbación de la microflora normal de las abejas (TOMASZEWSKA, 1966; KEDRACKI, 1968; DANYSZ y JELIASZEWICZ, 1976; STASKIEWICZ y col., 1976; HARTWIG, 1981; GORIN, 1983; citados por PRABUCKI y GÓRSKI, 1987; SULIMANOVIC y col., 1985 y GILLIAM, 1989) (DUCOS de LAHITTE, 1988). Un ejemplo es el trabajo de PRABUCKI y GÓRSKI (1987) que testaron cómo diferentes dosis de Fumagillin DCH administradas a las abejas en frecuencias diferentes, afectaban la estimulación del crecimiento (desarrollo) de *Ascospaera apis*. Utilizaron un test χ^2 con el grado de confianza de $P=0,01$ y $P=0,05$ y para el análisis de las características cualitativas calcularon los coeficientes de correlación, lo que les permitió afirmar que el modo de la administración del medicamento (spraying, feeding) no afecta al desarrollo de la Ascospferiosis y un incremento de la dosis de Fumagillin DCH así como una mayor frecuencia de administración a las colonias de abejas inhibe el crecimiento de *Nosema apis* y simultáneamente estimula el desarrollo de *Ascospaera apis*. Posteriormente, MURRAY (1993) comentó que se desconoce con exactitud hasta qué punto el efecto sobre la Ascospferiosis de varios antibióticos utilizados en el tratamiento de otras enfermedades, puede estar relacionado con la mayor gravedad en la presentación de la enfermedad porque si unos afirman que el uso de la oxitetraciclina para el control de la loque americana puede aumentar la incidencia de la Ascospferiosis, otros rechazan este efecto. Lo que está en concordancia con TABARLY (1962), SULAMINOVIC (1983) y MENAPACE (1979) (citados por DUCOS de LAHITTE, 1988) y MENAPACE y HALE (1979) (citados por CARDENAL GALVÁN, 1990) quienes demostraron que el uso de oxitetraciclina y terramicina-R una vez comenzado el proceso, no lo agravaba. Por otra parte MURRAY (1993) añade que observaciones no fundamentadas de apicultores de Nueva Zelanda sugieren que el uso del Fumidil B para el control de *Nosema apis* también podría aumentar la incidencia de la Ascospferiosis.

Es interesante reseñar también el trabajo de BEFUS-NOGEL y col. (1992), sobre el efecto de algunos disturbios en la colmena como el cambio de posición del nido de cría y la manipulación de los cuadros, en los niveles de Ascospferiosis. Primero formaron cuatro grupos con 16 colmenas similares, a las cuales dieron momias a excepción del grupo testigo. Estos autores verificaron que el valor medio más elevado de momias por semana, se dio en las colonias con mayor grado de manipulación. Sin embargo, los resultados no aportaron diferencias estadísticamente significativas relativamente a la gran variación entre colonias sometidas a diferentes niveles de manipulación. Esto podría indicar que los disturbios en la colonia, como por ejemplo, poner miel en el medio del nido de cría quizás han interrumpido la

comunicación y han reducido la alimentación a las larvas, lo que ha provocado estrés a la colonia y ha aumentado el nivel de la enfermedad.

Estos datos corrobora la afirmación hecha anteriormente por DUCOS de LAHITTE (1988) quien refirió que las prácticas apícolas, como el cambio de los cuadros podrían favorecer la contaminación por la propagación de las esporas y a menudo por el desequilibrio provocado en la relación población adulta/cría.

Aun en lo referente a este punto, merece ser destacada según CARDENAL GALVÁN (1990) el hecho de que la puesta irregular de las reinas viejas o insuficientemente fecundadas, que determina colmenas zanganeras en las que el camino está abierto para la aparición de otros procesos patológicos y conduce inevitablemente a la extinción de la colonia al actuar el agente patógeno, así como el efecto de ciertos acaricidas y pesticidas que pueden condicionar y predisponer la cría para la acción fúngica.

Actualmente, se sabe que el hongo *Ascospaera apis* se propaga por las esporas, pero la vía de entrada para iniciar la infección no está claramente definida.

Para entender correctamente este hecho vamos analizar las dos hipótesis principales consideradas por nosotros, según la bibliografía estudiada: la primera es que la enfermedad se puede producir por la vía digestiva, o sea, con la ingestión de las esporas del hongo y su germinación en el aparato digestivo, para después emerger y crecer en la superficie del cuerpo de las larvas, donde se inicia el proceso infeccioso; la siguiente es que ésta se puede producir a través de la cutícula, o sea, con la germinación de las esporas y su crecimiento a través de la superficie del cuerpo de las abejas.

MAURIZIO (1934) (citado por TAKAKI y col., 1985 y por BAILEY y BALL, 1991), TAKAKI y col. (1985), CARRERA y col. (1987), HEATH y GAZE (1987) (citados por BAILEY y BALL, 1991), BAMFORD (1987), BAMFORD y HEATH (1989a,b), GILLIAM (1989; 1990 y 1991) y ALONSO y col. (1993) propusieron que la enfermedad (infección) se puede producir tanto por la vía digestiva como a través de la cutícula.

Lo que ha sido demostrado por CARRERA y col. (1987) en sus estudios histológicos sobre el desarrollo del agente patógeno en el interior de las larvas de *Apis mellifera ligustica*. Estos autores apoyan la teoría de que el desarrollo del parásito se inicia en la porción media del intestino, donde las ascosporas llegan con el alimento, probablemente activadas por el CO₂ y particularmente en la porción posterior del mismo como añade GILLIAM (1989 y 1990), y que este tramo solamente puede ser observado cuando la infección esta en una fase intermedia. Sus células muestran alteraciones, principalmente vacuolizaciones, lo cual cambia completamente la apariencia histológica normal de estas células. Observaron también que todas las larvas con presencia de micelio, que fueron analizadas histológicamente, tenían por lo menos cuatro días de edad y que en este tiempo el hongo ya había invadido todo el cuerpo de la larva y aparecía en su superficie. Por lo cual han sugerido, en sus resultados, que el momento más favorable para

la germinación de las esporas es inmediatamente antes de la operculación y que el desarrollo del hongo ocurre en el espacio de 24 horas. En esta fase del desarrollo de la larva, la porción media del intestino (que hasta ahora estaba cerrado) se abre en la porción terminal del intestino y evacua sus contenidos a través del ano a las paredes de los alveolos. Además también sugiere que este cambio estructural acompañado del incremento de la circulación de oxígeno puede estimular la proliferación del agente patógeno a través de los tejidos. Estos datos confirman el trabajo histológico, que realizaron BAMFORD y HEATH (1989b) quienes observaron que al revés de lo que ocurre en otros géneros de micopatógenos la membrana peritrófica no funciona como una barrera a la infección por *A. apis* y consecuentemente el micelio se propaga a través del hemocele, y después las hifas penetran el tegumento, aparecen y crecen en la superficie del cuerpo de las larvas.

Paralelamente a la primera hipótesis, ALONSO y col. (1993) consagran parte de su trabajo, sobre el complejo enzimático de *Ascosphaera apis* y el desarrollo de la infección del hongo en *Apis mellifera*, a la determinación del mecanismo de penetración en la cutícula larval. Con esta finalidad, realizaron una ingente labor de recogida de cadáveres momificados procedentes de 47 brotes de Ascospferiosis producidos en otros tantos colmenares de 14 comunidades autónomas de España y utilizaron tres cepas de referencia según los métodos cualitativos y semicuantitativos (API ZYM®, BioMérieux). Así propusieron la teoría de que la existencia de la acción enzimática de la acetil glucosaminidasa que degradan los monómeros de la N-acetil glucosamina que forman parte de la quitina, principal constituyente de la cutícula, ayudada por alguna presión mecánica de las hifas cuando éstas se forman en el interior del cuerpo de las larvas puede explicar como el hongo atraviesa la cutícula.

Otra explicación posible, basada en la segunda hipótesis, es la que reseña VEY (1990) quien tomó muestras de los diferentes tramos del intestino de las abejas y los inoculó en el medio malta-agar y encontró que ninguna cepa de *A. apis* se desarrollaba en este medio y la misma conclusión obtuvo en estudios histopatológicos, o sea, no se detectó ningún grupo de esporas del agente patógeno en el tramo digestivo.

Al revés del trabajo de BAMFORD (1987), quien encontró que las esporas no se activaban en la superficie de la cutícula de las larvas. Sin embargo, VEY (1990) en su estudio sobre la evolución espontánea de la Ascospferiosis detectó que la vía de penetración del agente patógeno solamente había sido observada en la superficie de la cutícula y que una posibilidad de su transmisión era la transferencia de las esporas adherentes a las cerdas de las abejas.

Por tanto, hay una gran controversia relativamente a este punto, pero se puede decir que parece existir una fuerte relación entre la propagación por la vía digestiva y a través de la cutícula, aunque otras formas hayan sido sugeridas para dicha contaminación.

Un ejemplo puede ser el trabajo de KOENIG y col. (1986) que han demostrado que cada larva que murió por Ascospferiosis había producido ascoscistos con 10^8 - 10^9 esporas y que

muchos de éstos eran depositados fuera de las colonias por las abejas limpiadoras cuando retiraban las larvas muertas de sus celdas, pero muchas colonias hacían la diseminación por las abejas nodrizas o se quedaban almacenadas en el alimento y especialmente en los cuadros de cría.

Sin embargo, CRANE (1990) añade que es más probable que las esporas viables del hongo estén presentes y germinen porque las condiciones lo permiten de que sean transmitidas a cualquier otra parte.

Una particularidad sobre la naturaleza de la infección describen varios autores estudiando la influencia de la temperatura y otras variables, como el pH, en el ciclo biológico de *Ascosphaera apis*.

Así, ya MAURIZIO (1934) (citado por BAILEY y BALL, 1991) consideró que el agente patógeno crece mejor en las larvas enfriadas levemente, siendo la temperatura óptima para el crecimiento y la formación de los cuerpos fructíferos de 30°C.

BAILEY (1967b) (citado por BAILEY y BALL, 1991) profundizó en estos estudios de MAURIZIO (1934) sobre la naturaleza de la infección y realizó experimentos que demostraron que la cría es mucho más susceptible cuando se enfría inmediatamente después de la operculación. El enfriamiento puede ser solamente una pequeña reducción, en pocas horas, de la temperatura del rango normal de 35°C a los 30°C (MURRAY, 1993). Lo cual puede ocurrir fácilmente incluso en los climas cálidos, en las colonias que han tenido temporalmente pocas abejas adultas para incubar su cría. Probablemente las larvas se enfrían al principio del verano cuando las colonias están creciendo y las larvas de los machos sufren más, una vez que están en la periferia del nido de cría. Lo que está en concordancia con trabajos posteriores (HEATH, 1982a,b; KOENIG y col., 1987) citados por BAILEY y BALL (1991) (MURRAY, 1993) que añaden que la Ascospferiosis se agrava también cuando la razón cría/abejas adultas es elevada. Paralelamente a estos trabajos, BAMFORD y HEATH (1989a) establecieron que los 3 estadios de germinación del hongo eran independientes del pH en un rango de 5-7,8, y de la temperatura en los rangos respectivamente de 10-40°C, 25-40°C y 25 a 37°C.

Además, BAILEY y BALL (1991) refieren que otros factores no letales, como son infecciones por virus, bacterias, intoxicaciones (envenenamientos) o incluso una alimentación inadecuada por las abejas nodrizas enfermas puede provocar el mismo hecho que el enfriamiento, por la reducción del número de las larvas.

1.6 - TRATAMIENTO

Hasta el momento, no hay ningún agente químico-terapéutico que sea universalmente aceptado para uso contra la Ascosporeosis en las abejas melíferas, ni tan poco están definidos los factores de estrés en las diferentes áreas geográficas que puedan dar una respuesta eficaz contra esta enfermedad.

Estos hechos expresan muy claramente la necesidad que tenemos hoy en día de encontrar medidas de control que puedan lograr la resolución de este problema.

Según GILLIAM (1990) y MURRAY (1993) la búsqueda sobre el control de la Ascosporeosis ha sido concentrada en tres áreas: a) la química incluyendo los fumigantes, antisépticos, preservativos y drogas antimicóticas; b) las prácticas de manejo y c) la genética de las abejas.

Siguiendo este orden, empezamos por hacer una retrospectiva de lo hecho hasta ahora. Sin embargo, nosotros haremos un estudio más profundo en lo que respecta a las prácticas de manejo y a la genética de las abejas, una vez que pensamos que la principal vía de control es la lucha biológica.

Así en la tabla nº 4 se recogen algunos de los autores que han trabajado en el control químico de la Ascosporeosis, desde 1932 hasta 1995, y las técnicas y productos químicos que emplearon.

TABLA nº 4: Relación de algunos autores que han investigado en el control químico de *Ascosphaera apis*

AUTOR	FECHA	AGENTE QUÍMICO	DESCRIPCIÓN
KENWARD citado por GILLIAM y VANDENBERG	1932 (1990)	Humo de Sulfuro o Formalina	Utilizó la exposición de los cuadros después de remover las larvas
GIAUFFRET y col. THOMAS y LUCE CANTWELL y col. GOCHNAUER y col. MABUCHI citados por GILLIAM y VANDENBERG	1969 1972 1975 1980 1982 (1990)	Oxido de etileno	Utilizaron la fumigación de los panales con oxido de etileno
GLINSKI y col. JENKO y col.	1984 1990	Nystatina	Estudios del efecto de la Nystatina en el control de la Ascosferiosis
GLINSKI y col.	1986	Sal N-Metil gluca- mina de N-Glucosy- lopolifungine (NMG)	Estudios de la influencia del antibiótico (NMG) sobre las larvas y obreras de la <i>Apis mellifera L.</i>
COLIN y col.	1989	Aceites esenciales derivados de la Familia Labiaceae	Describe la actividad de los aceites esenciales de dos variedades de Labiaceae en la <i>A. apis</i> y su tratamiento en un colmenar
JENKO y col.	1991	Yukoluch-A y As- kocidin (formulación del ácido trichloroiso- cianúrico) ácido acético	Describe dos test de evaporación con la utilización del Askocidin y Yukoluch-A y un experimento basado en la utilización del ácido acético y del Yukoluch-A para la desinfección de los cuadros
VLAMINCK y VAN DEN BRANDE SULIMANOVIC y col. SULIMANOVIC	1988 1987 1989	Enilconazole	Estudios del compuesto Enilconazol utilizado como tratamiento curativo y preventivo de la Ascosferiosis
LIU	1995	Azadirachta	Estudio del posible control de la Ascosferiosis con el extracto de Azadirachta
YOSHIDA	1985	Productos de la fermentación de los ácidos orgánicos (POF)	Describe tres métodos de valoración del POF para su posible utilización en la prevención de la <i>A. apis</i> y <i>V. jacobsoni</i>
NAKANE y KAJI- KAWA	1985	10 desinfectantes: y 2 antifúngicos: PVC (compuesto propiónico de vermiculita) y formaldehido	Testaron varios desinfectantes y antifúngicos para selección de los más efectivos en la prevención de la <i>A. apis</i>

Bajo características diferentes y presentaciones variadas, muchos fumigantes, así como antimicóticos, antisépticos y desinfectantes los testaron varios autores para su posible utilización en el tratamiento de la Ascosporeosis.

KENWARD (1932) (citado por GILLIAM y VANDENBERG, 1990) sugirió la exposición de los cuadros a los rayos solares o la fumigación con humo de sulfuro o formalina al 40%, después de retirar las momias.

Ha sido utilizada años después, la fumigación con óxido de etileno y conclúyese que mataba *A. apis* en los cuadros infectados (GIAUFFRET y col., 1969; THOMAS y LUCE, 1972; CANTWELL y col., 1975; GOCHNAUER y col., 1980 y MABUCHI, 1982) citados por GILLIAM y VANDENBERG (1990)). También DUCOS de LAHITTE (1988) señaló la utilización del óxido de etileno para la desinfección del material apícola, 15 horas a 22°C o 30 minutos a 35°C.

Otro ejemplo de utilización de desinfectantes es el experimento de TAWARA (1985) quien testó el posible efecto del gas hipoclorito resultante de la reacción del ácido trichloroisocianúrico (trichlorinated isocyanuric acid) con una cantidad apropiada de agua. La aplicación de un análisis de varianza al número de pollo infectado en el grupo control reveló que las diferencias observadas son significativas ($P \leq 0,01$) para el test químico, por lo cual presumió que ésto inhibía el crecimiento de las esporas. Además concluyó que como la concentración residual de cloro en la miel era irrelevante, probablemente no perjudicaba la salud humana y además como no hay ningún método práctico para prevención de la Ascosporeosis este sería adecuado para la prevención de la enfermedad en desarrollo o para el tratamiento de las colonias infectadas con diferentes dosis del químico.

Por otra parte, muchos antimicóticos han sido testados para su posible utilización en el tratamiento de la Ascosporeosis así como antisépticos y desinfectantes, sin embargo, si unos revelan alguna eficacia otros no son estables o son tóxicos y otros, además, no impiden el crecimiento del hongo. Un ejemplo es el experimento de GIAUFFRET y TALIERCIO (1967) (citado por GILLIAM y VANDENBERG, 1990) sobre el uso de antisépticos, en el cual se ha comprobado que éstos eran más estables pero más tóxicos para las abejas que los antimicóticos.

Ya en el año de 1982, FAUCON y col. (citados por GILLIAM y VANDENBERG, 1990) usaron el bromuro de metilo para la fumigación de los componentes de la colmena, pero residuos químicos fueron encontrados en la cera y la madera. En el mismo año, HEATH (citado por BAILEY y BALL (1991), registró más de 30 productos químicos que posiblemente serían adecuados para el control de la micosis o por lo menos para inhibir *A. apis* en cultivo. Sin embargo, la persistencia de las esporas, probablemente, no permitió la erradicación de la enfermedad. Un ejemplo de los productos químicos registrados por HEATH (1982) se reflejan en el experimento de TOMAC y col. (1982) (citados por SULIMANOVIC, 1989) que

obtuvieron buenos resultados en los colmenares con la utilización del ácido ascórbico y benzoato de sodio (Na-benzoat) en el tratamiento de esta enfermedad, pero en los test "in vivo" ningún efecto fue observado. Este hecho ha sido justificado por el incremento de la resistencia de las colonias de abejas.

A su vez, GLINSKI y OSIPOWSKI (1984) determinaron la sensibilidad de 145 cepas de *Ascosphaera apis*, aisladas de larvas con síntomas de Ascospferiosis, al nystatin, verificando una gran similitud morfológica, de cultivo y bioquímica. En la práctica han obtenido los mejores resultados con la pulverización de las colonias infectadas con un jarabe (30 mg de nystatin en 0,5 litros), después de retirar los cuadros de cría infectados. Más tarde DUCOS de LAHITTE (1988) refirió que este producto era poco tóxico para las abejas, pero inestable en solución, por lo que había la necesidad de hacer aplicaciones repetidas y que tenía como principal limitación su precio.

La descripción del uso de timol para prevenir e inhibir el crecimiento de *A. apis* también ha sido experimentado, no obstante, fue muy imprecisa, ya que no hay concordancia en el porcentaje de solución utilizada ni en el tiempo y forma de su utilización.

Otro ejemplo de las varias drogas que han sido testadas para su posible aplicación a las colonias enfermas, se refleja en el experimento de NAKANE y col. (1985). Estos autores midieron el efecto de inhibición de varios antimicóticos volátiles y desinfectantes sobre el crecimiento de *Ascosphaera apis*. Con base en sus resultados eligieron como desinfectante el invert soap QAC (compuesto cuaternario de amonio) y como antifúngicos el PVC (compuesto propiónico de vermiculita) y el formaldehído una vez que presentaban un efecto de inhibición sobre el crecimiento de *A. apis* superior a los demás. Por otra parte, en el tratamiento de las colonias contaminadas, ambas drogas eliminaban la Ascospferiosis en un periodo de 3 a 4 semanas, sin observarse ninguna anomalía. Sin embargo, los autores han sugerido que son necesarios más estudios, incluso, sobre el periodo de tratamiento y su efecto sobre las abejas para una utilización más efectiva de las drogas referidas.

A su vez YOSHIDA (1985) observó que cuando se inicia el flujo de néctar y la miel y el polen son recogidos para la colmena, las obreras se alimentan de miel y néctar y segregan leche y jalea real, las cuales contienen gran cantidad de ácidos orgánicos para alimentar y criar su cría. Simultáneamente con el aumento de la población y la actividad de la colonia, la aparición de la Ascospferiosis y de la Varroasis disminuye, observándose principalmente en el pollo de cría y el zángano. Al revés, cuando acaba el flujo de néctar las colonias se quedan debilitadas y las dos enfermedades son más corrientes en la cría de obreras. Consecuentemente el autor notó que la resistencia a estas enfermedades variaba con la cantidad de secreción láctea y jalea real por las obreras y como estas secreciones contienen muchos ácidos orgánicos, entonces el autor produjo artificialmente los ácidos orgánicos para administrarlos a las abejas. En sus resultados demostró la eficacia del POF en la inhibición de la Ascospferiosis y en la eliminación de la Varroasis.

también verificó que su utilización activaba a las abejas con el consecuente aumento de la población y que no provocaba problemas higiénicos a la miel y a la jalea real, pero más estudios serán necesarios sobre la composición del producto POF para mejorar su eficacia y su precio.

Otra sustancia antifúngica que ha sido descrita en el tratamiento de esta enfermedad, es el enilconazole. Su eficacia ha sido testada por SULIMANOVIC y col. (1987) en ensayos de campo después de la obtención de buenos resultados laboratoriales, siendo recomendado su uso en spray en las colmenas más afectadas y la fumigación en las restantes así como método de prevención para todas las colmenas que fueron tratadas con acaricidas contra la Varroasis. Sin embargo, DUCOS de LAHITTE (1988) añadió que aunque sea activo "in vitro" sobre el micelio de la *A. apis*, se queda inutilizable en condiciones de campo, debido a su baja aceptación por las abejas. Más tarde fue oficialmente registrada en Yugoslavia con el nombre comercial "Ascomizol" pero, debido a problemas técnicos no ha sido comercializado (SULIMANOVIC, 1989). Posteriormente, en un estudio "in vitro" sobre la eficacia de una serie de fungicidas realizado en España por CARDENAL y col. (1990) estos obtuvieron en sus resultados que el Enilconazole estaba entre los fungicidas que tenían mayor eficacia, pero que otros estudios deberían de ser hechos, como por ejemplo la evaluación de la toxicidad para la cría y estudios sobre los residuos en los productos apícolas para poder hablar de un producto que ayude a combatir este proceso. Ya, en lo que concierne a su toxicidad, (JOSA, 1997 comunicación personal) encuentra que este producto produce mortalidad en reinas. Lo que pone de manifiesto una gran dificultad sobre su aplicabilidad en la práctica.

Otra investigación muy interesante sobre el control de la Ascospferiosis es la que hizo LIU (1995) en Canadá. El estudio se llevó a cabo alimentando colonias de abejas (*Apis mellifera*) con azadirachta, extracto del árbol "amargoseira", *Azadirachta indica* (*Lelia azadirachta*) en la proporción de 1 ml o 2 ml "Margosan-O" (3000ppm a.i.)/litro de jarabe de azúcar. El autor constató en sus resultados, que las colonias produjeron menos momias (*Ascospaera apis*), bajaron los niveles de esporas de *Nosema apis* y produjeron más miel y colectaran más polen que las colonias testigo. Por otra parte la Azadirachta añadida a un medio de crecimiento inhibe el crecimiento y desarrollo de la Ascospferiosis.

Otra particularidad en lo que concierne al control de la Ascospferiosis es la utilización de microorganismos antagónicos, para inhibir al agente patógeno, que hacen parte de la microflora normal de las colonias de abejas, siendo aislados la mayor parte de estos mohos del pan de las abejas como refirió GILLIAM (1990). La misma autora añade que fueron aisladas 27 especies de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* las cuales también inhiben *A. apis* y que todas ellas son microorganismos normales asociados con la miel. Lo que podría indicar que las abejas, incluso *Apis mellifera* quizás puedan utilizar los *Bacillus* spp. para el procesamiento y conservación del alimento almacenado con el fin de evitar su detereoro y contaminación, particularmente con hongos.

Posteriormente, otro estudio interesante fue el que hicieron SHIMANUKI y col. (1990) quienes demostraron que sustancias antimicrobióticas son producidas por *A. apis* cuando extractos alcohólicos (etanol o metanol solventes) de mezclas de micelio y esporas inhibían crecimiento en cultivo de *Melilotus pluton* y *Bacillus larvae*, consecuentemente otros estudios fueron iniciados en el intento de identificar los compuestos activos relacionados. Por lo que FELDLAUFER y col. (1993a) relataron el aislamiento y la identificación del ácido linoleico como el compuesto antimicrobiano principal de *Ascosphaera apis*. En la continuidad de estos estudios FELDLAUFER y col. (1993b) testaron varios ácidos libres saturados e insaturados para estudiar su actividad antibiótica en el control del *Bacillus larvae* en la tentativa de correlacionar la actividad antibiótica con la estructura de los ácidos grasos. Estos autores demostraron que éstos inhiben el crecimiento de la bacteria que provoca la loque americana, lo que podrá estimular el estudio de su aplicación práctica en la prevención de esta enfermedad.

Además GILLIAM y VANDENBERG (1990) han sugerido que serán necesarias más investigaciones en el control químico y además garantizar que los residuos químicos no vayan a contaminar los productos de la colmena.

Resumiendo: hasta ahora el control a través de los tratamientos químicos presenta los siguientes problemas: muchos de estos esfuerzos no han tenido éxito debido a una variedad de dificultades como son la toxicidad, la inestabilidad de los compuestos testados y la carencia de aceptación por las abejas. Otra limitación es el hecho de que muchos trabajos publicados que incluyen resultados de campo no son repetibles de una región para otra. Además, los productos químicos que inhiben el agente patógeno "in vitro" no controlan la enfermedad "in vivo" o al revés. Por otra parte, algunos de estos productos requieren procedimientos laboriosos para los apicultores que tienen muchas colmenas y generalmente tienen un precio muy alto.

Otra de las soluciones que se ha aconsejado para el control de la enfermedad se basa en las prácticas de manejo. Repetidos hallazgos de una gran cantidad de autores, que se incluyen en esta categoría, nos indican que en general son medidas de prevención.

Paralelamente a esto raciocinio en la tabla nº 5 se pueden consultar las más variadas prácticas de manejo utilizadas a lo largo del tiempo por diversos autores, según estudios de investigación hechos por nosotros.

TABLA nº 5: Prácticas de manejo utilizadas a lo largo del tiempo por diversos autores

Prácticas de manejo	Autor	Año
Quemar las momias	DREHER (citado por GILLIAM y VANDENBERG)	1938 (1990)
Destrucción de los cuadros afectados	KENWARD	1932
	BETTS	1951
	GOCHNAUER y col. (citados por GILLIAM y VANDENBERG)	1975 (1990)
	DUCOS de LAHITTE	1988
Renovación de cuadros	NELSON y GOCHNAUER (citados por GILLIAM y VANDENBERG)	1982 (1990)
	KOENIG y col.	(1986)
	ROSENTHAL y col.	1992
	MURRAY	1993
	Preparación de las colmenas para impedir la humedad y permitir una adecuada ventilación	SEAL (citado por GILLIAM y VANDENBERG)
Adicionar abejas jóvenes y cría	ROSENTHAL y col.	1992
	SEAL (citado por GILLIAM y VANDENBERG)	1975 (1990)
Alimentación con jarabe de azúcar	ROSENTHAL y col.	1992
	SEAL (citado por GILLIAM y VANDENBERG)	1975 (1990)
	ROSENTHAL y col.	1992
No permitir la subpoblación	SEAL (citado por GILLIAM y VANDENBERG)	1975 (1990)
	ROSENTHAL y col.	1992
	Alimentación con polen fresco	GILLIAM MURRAY
Hábitos de limpieza	DUCOS de LAHITTE	1988
	GILLIAM	1990
Utilización de reinas resistentes	LUNDER (citado por GILLIAM y VANDENBERG)	1972 (1990)
	GILLIAM y col.	(1983)
	DUCOS de LAHITTE	1993
	MURRAY	1988
	Introducción de reinas de estirpes no susceptibles	MRAZ (citado por GILLIAM y VANDENBERG)
Reemplazo de reinas	ROSENTHAL y col.	1992

Por ejemplo, DREHER (1938) acentuó la importancia de quemar las momias permitiendo su acumulación. Este procedimiento confirma muy claramente la teoría de destrucción de los cuadros afectados en los casos más graves (KENWARD, 1932; BETT 1951; GOCHNAUER y *col.*, 1975) citados por GILLIAM y VANDENBERG (1990), una vez que, como afirmó DUCOS de LAHITTE (1988) las dificultades terapéuticas e irregularidad en la eficacia obligan, a menudo, a los apicultores a la destrucción de las colmenas afectadas incluso el hecho de que suministrando nuevos cuadros se reduce la incidencia de Ascospferiosis (NELSON y GOCHNAUER, 1982, citados por GILLIAM y VANDENBERG (1990); KOENIG y *col.* (1986)).

Se ha visto también que una forma de prevenir la propagación de la enfermedad sea cerrar las colmenas en el invierno, manteniéndolas alejadas de la hierba alta para impedir humedad y permitir una adecuada ventilación SEAL (1975) (citado por GILLIAM y VANDENBERG, 1990). El mismo autor añade que se deberían fortalecer las colonias más enfermas colocando abejas adultas jóvenes, cría incubada y alimentándolas con jarabe de azúcar, aunque para DUCOS de LAHITTE (1988) sea preferible alimentarlas con candi, pues el jarabe es muy rico en agua. Además, SEAL (1975) (citado por GILLIAM y VANDENBERG, 1990) también refiere que no debe permitirse que se quede a lo largo del invierno una colmena con mucho espacio en el nido de cría. A su vez, DUCOS de LAHITTE (1988) añadió la necesidad de limitar la penetración del agua en la colmena inclinándola ligeramente hacia delante para impedir la humedad, pues como refuerza posteriormente TOSCANO y HARRIET (1994) este factor tiene dentro de la colmena una importancia de orden biológico, productivo y sanitario, sugieren también proceder al cambio periódico de las reinas y cambiar las ceras de 4 ó 5 años para limitar la persistencia de las esporas.

Las medidas adoptadas son las descritas también por GILLIAM (1990) lo que es para nosotros de gran interés, pues comprobamos que siguiendo la idea de varios autores, GILLIAM (1990) y CRANE (1990) se constata el hecho que la Ascospferiosis es una enfermedad relacionada con el estrés siendo más probable que las colonias, bajo un manejo adecuado, no estén tan afectadas.

Otras opiniones interesantes son las de LUNDER en el año 1972 y MRAZ (1973) (citados por GILLIAM y VANDENBERG, 1990) y MURRAY (1993) quienes sugirieron respectivamente, la utilización de reinas resistentes y la introducción de reinas de estirpes no susceptibles. Así como GILLIAM y *col.* (1983) demostraron que es posible la reproducción de abejas resistentes a la Ascospferiosis y que el aumento de la resistencia se evidencia por un comportamiento higiénico elevado por parte de las nodrizas y por la reducción de la longevidad de las esporas del hongo en las colonias resistentes. Lo que está de acuerdo con trabajos anteriores como el de DE JONG (1976) quien utilizó técnicas experimentales para inducir la

infección con *Ascosphaera apis* y observó que había una correlación positiva elevada entre la resistencia de las larvas y el grado de limpieza de las abejas adultas en la colonia.

A su vez, ROSENTHAL y col. (1992) afirmaron que la prevención y la lucha basada en técnicas de manejo, tales como, reemplazo de reinas, renovación de cuadros, mantener las colmenas en lugares secos y aireados, etc., hasta el momento no han impedido la transmisión ni la manifestación aguda de la enfermedad. Por lo que los mismos autores sugirieron que en la actualidad solamente existen dos vías de investigación para combatir la enfermedad: encontrar tratamientos eficaces y reales y seleccionar las abejas con un fuerte instinto de limpieza, obteniendo así colmenas resistentes.

En conclusión se puede afirmar que, entre las varias soluciones que se han estudiado, se ha constatado una particularmente interesante, el comportamiento higiénico. Este estudio se apoyó en otros de selección y cría de abejas resistentes, al cual hacemos referencia en el apartado de revisión bibliográfica siguiente.

1.6.1 - LA SELECCIÓN DEL COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO EN ABEJAS DE LA ESPECIE *Apis mellifera* L. COMO UN MECANISMO DE RESISTENCIA A LA ASCOSFERIOSIS

Las abejas tienen muchos mecanismos diferentes de resistencia a las enfermedades y uno de estos mecanismos es comportamental. La aplicación de técnicas apropiadas al estudio de este mecanismo ofrece una herramienta de gran potencial para demostrar que esta resistencia es genética y puede ser heredable.

Así, en lo que concierne al tercer área de estudio, basada en la mejora genética de las abejas, se puede decir que probablemente el mejor ejemplo conocido es la herencia del comportamiento higiénico (MORITZ y SOUTHWICK, 1992).

Hace más de 30 años se descubrió un mecanismo genético muy básico que podría determinar un comportamiento social tan complejo, como es el comportamiento higiénico.

ROTHENBUHLER (1964a), siguiendo los estudios de PARK (1937), citado por MESSAGE (1979); GILLIAM y col. (1983); MILNE (1985); HOLM (1985); NEWTON y OSTASIEWSKI (1986); RINDERER y COLLINS (1986); MORITZ y SOUTHWICK (1992); PAGE y LAIDLAW (1992); SPIVAC y GILLIAM (1993); KEFUSS y col. (1996) demostró que este comportamiento de limpieza o higiénico era considerado el principal mecanismo de resistencia a la loque americana causada por la bacteria *Bacillus larvae*, y en la Ascosferiosis causada por el hongo (*Ascosphaera apis*) (MILNE, 1983; GILLIAM y col., 1988; MURRAY, 1993) y probablemente uno de los mecanismos potenciales del control del ácaro *Varroa jacobsoni* (MORITZ, 1994; SAMMOTARO, 1996).

Este principio fue explicado genéticamente por el control de dos pares de genes independientes y recesivos, uno (u/u) para la desoperculación y el otro (r/r) para la remoción de las larvas muertas, según ROTHENBUHLER (1964a,b) citado por WOYKE (1976), MESSAGE y GONÇALVES (1980b); HOLM (1985); NEWTON y OSTASIEWSKI (1985); RINDERER y COLLINS (1986); CARDENAL GALVÁN y col. (1988); MORITZ (1988); GILLIAM (1990); MORITZ y SOUTHWICK (1992); PAGE y LAIDLAW (1992); SPIVAC y GILLIAM (1993); KEFUSS y col. (1996).

Todavía, ROTHENBUHLER y sus colaboradores (MORITZ y SOUTHWICK, 1992) y seguidamente se dieron cuenta de que este fenómeno podría ser mucho más complejo, porque las diferencias entre los tipos comportamentales no eran tan claras como inicialmente había supuesto. Esto indicó la dificultad de hacer corresponder los fenotipos comportamentales de las distintas clases de individuos con los respectivos genotipos, lo que refleja, por un lado, la dificultad de obtener estimaciones precisas de un gen de acción sencilla, porque las interacciones entre las obreras pueden fácilmente sobreponerse a algunos fenotipos individuales y por lo otro, la necesidad de analizar los datos mediante métodos estadísticos.

Así, MORITZ (1988), profundizó en estos estudios de ROTHENBUHLER (1964) y realizó un análisis de cluster para calcular la media y la varianza de los respectivos tipos comportamentales. Comprobó que los datos originales no sustentan la hipótesis de dos loci porque los datos del comportamiento de remoción se separan significativamente de la distribución bimodal, lo que es de esperar si solamente hay dos tipos de obreras, las que remueven y las que no lo hacen. Por lo que, sugirió que para el comportamiento de remoción es posible que más de un loci pueda afectar la determinación de la expresión del fenotipo y que un modelo de 3-loci se ajusta mejor al mecanismo básico ya descrito.

Otros trabajos preliminares en genética cuantitativa fueron llevados a cabo, utilizando tests laboratoriales, por MILNE (1982, 1983) para estimar la heredabilidad del comportamiento de desoperculación y de remoción y la correlación genética entre estos dos caracteres, por medio de los componentes de varianza de grupos emparentados MILNE (1985a, 1985b). Basado en las diferencias de los fenotipos individuales obtuvo $h^2 = 0,144$ para la desoperculación, $h^2 = 0,022$ para la remoción y $r = 0,215$. Esto indica que la selección para el aumento de comportamiento higiénico era posible, pero difícil y también que no había antagonismos genéticos para impedir los aportes de la selección simultánea para ambos caracteres. MILNE (1985b) da una explicación a la magnitud de la heredabilidad basándola en que probablemente estos valores pueden haber sido subestimados debido a varios factores tales como: el hecho de que el método de los grupos emparentados incluye algunos efectos maternos y efectos genéticos no aditivos; los cálculos eran dependientes del número de abejas (30 y 90 obreras incluidas en el comportamiento de desoperculación y remoción, respectivamente, en colmenas de observación con abejas marcadas) y es posible que éste no sea constante y pueda variar entre

las abejas del mismo origen en las colonias; si el verdadero número de las abejas que hacen la remoción es significativamente más bajo, entonces la heredabilidad estimada podrá ser significativamente mayor, etc, y lanza la posibilidad de que estos valores puedan aumentarse con la repetición de las observaciones.

Los valores bajos de estas estimaciones, confirman, según MORITZ y SOUTHWICK (1992), la opinión bastante generalizada entre los investigadores de que la expresión del comportamiento higiénico está influenciada por el medio ambiente. Un ejemplo de esto podría ser el trabajo de GILLIAM (1990) quien sugirió que la variación en la susceptibilidad de las colonias de abejas a la enfermedad es un factor importante de su expresión. Lo cual se señala en distintos puntos, como es, la dificultad en los trabajos experimentales de inducir la infección; cuando constatamos en los colmenares que algunas colonias están profundamente infectadas, mientras que las adyacentes no la están o su nivel es muy bajo y también en el grado de remoción de las momias en colonias diferentes. Por tanto, parece existir una fuerte relación entre las condiciones ambientales y la baja heredabilidad genética.

Por otra parte, MORITZ y SOUTHWICK (1992) afirman que por lo menos, dos *loci* constituyen las bases genéticas de la remoción y que con la posibilidad de las interacciones epistáticas cualquier otro modelo genético será igualmente probable.

Otras hipótesis han sido consideradas en la tentativa de explicar este comportamiento, por ejemplo, GOULD (1982), citado por SPIVAC y GILLIAM (1993), conjeturó que el comportamiento no higiénico era debido a un bloqueo o defecto en algunos cruces en la línea que origina el comportamiento higiénico paterno. También en 1993, SPIVAC y GILLIAM, en un estudio sobre la expresión del comportamiento higiénico en lo que concierne a la resistencia de las abejas melíferas a la Ascosferiosis, observaron que aunque el comportamiento higiénico sea genéticamente determinado su expresión parece ser facultativa y dependiente de la fuerza de la colonia, de la composición de las obreras dentro de la colmena, de la necesidad de espacio en las celdillas, de las condiciones del medio y además de factores todavía no conocidos.

Mientras que KEFUSS y col. (1996) recientemente lanzan la posibilidad que este comportamiento esté regido por 20 a 30 caracteres genéticos, de los cuales solamente dos ya fueron identificados.

Así pues, tenemos que tener en cuenta que todavía no están muy claros los mecanismos genéticos que rigen el comportamiento genético y consecuentemente será necesario investigar mucho más en este campo, para entender correctamente su verdadera naturaleza.

Otro de los mecanismos que probablemente determina la resistencia a las enfermedades, clasificado como el segundo mecanismo de resistencia a la loque americana (STURTVENT y REVELL, 1953), citados por SPIVAC y GILLIAM (1993), es la propia resistencia física o fisiológica de las abejas inmaduras o adultas ante el agente patógeno (TABER, 1987 y PAGE y

LIDLAW, 1992). ROTHENBUHLER y THOMPSON (1956), citados por PAGE LIDLAW (1992), demostraron que después de suministrar alimento a la cría con esporas de *Bacillus larvae*, las larvas resistentes de la línea Brown tenían una mayor capacidad de sobrevivir que las larvas de las colonias susceptibles, lo que indicaba que éstas podrían ser fisiológicamente resistentes. A su vez, las abejas adultas remueven la cría enferma a través de la ingestión de las larvas enfermas y defecan sus esporas en el exterior del nido (en el caso de la abeja americana), o por la extracción de las larvas momificadas de las celdillas (en el caso de la abeja europea, en el caso de la Ascosferiosis) lo que explica su resistencia fisiológica (SPIVAC y GILLIAM, 1993). Según los mismos autores, las abejas que no tienen ningún mecanismo de neutralización o remoción de los agentes infectantes internos o externos, pueden consecuentemente infectar a las larvas susceptibles cuando las alimentan o pueden diseminar las esporas a otras abejas adultas cuando se alimentan, lo que se hace a través de los movimientos de las mandíbulas y por el contacto de las antenas (FREE, 1987), propagándose la enfermedad a través de la colonia. Simultáneamente, las larvas pueden ser resistentes o susceptibles dependiendo del agente patógeno, de la forma de transmisión y de su propia respuesta fisiológica.

Paralelamente a estos mecanismos de resistencia a las enfermedades, DANKA y VILLALBA (1994) estudiaron el comportamiento higiénico y compararon la resistencia fisiológica de las colonias de abejas europeas y africanizadas ante la infección con el *Bacillus larvae*. Para la evaluación del comportamiento higiénico siguieron la técnica de muerte por punción (NEWTON y OSTASIEWSKI, 1986). Utilizaron como tratamiento estadístico dos test t de student para determinar que caracteres eran, la proporción de celdillas desoperculadas o la proporción de crías removidas. En sus resultados obtuvieron, comparativamente, un bajo grado de infección e incluso un reducido comportamiento higiénico de las abejas africanizadas. Por lo que sugirieron que estas abejas podrían tener alguna resistencia fisiológica a la enfermedad y que el reducido comportamiento higiénico podría ser consecuencia del hecho de que estas poblaciones aún no habrían sido enfrentadas a las enfermedades de la cría.

HARBO (1995) midió las relaciones entre la Ascosferiosis y el comportamiento higiénico en un grupo de 27 reinas, apareadas individualmente con un zángano, y concluyó que las larvas podrían ser resistentes a la Ascosferiosis y también a la Varroasis (HARBO y HOOPINGARNER, 1995).

En otras especies del género *Apis* también se han realizado estudios de resistencia a esta enfermedad. STEPHEN y FICHTER (1990) investigaron el mecanismo de resistencia a la Ascosferiosis provocada por el agente patógeno *Ascospaera aggregata* en la abeja salvaje *Megachile rotundata*.

SPIVAC y GILLIAM (1993) demostraron que hay una baja correspondencia entre el comportamiento higiénico y la resistencia fisiológica a la Ascosferiosis, por lo que sugirieron que las colonias que simultáneamente sean muy higiénicas y fisiológicamente resistentes pueden

aparecer en una frecuencia muy baja. Esto corroboró los estudios de ROTHENBUHLER (1964a), citado por SPIVAC y GILLIAM (1993), quien investigó la correlación entre el comportamiento higiénico y la resistencia a las enfermedades y halló que ésta era más evidente en colonias consanguíneas, que fueron seleccionadas experimentalmente, a través de la inseminación instrumental, a lo largo de varias generaciones. Lo que está de acuerdo con RATH y DRESCHER (1987) quienes inseminaron reinas vírgenes de colonias resistentes a la Ascospferiosis con el semen de los zánganos de las mismas colonias y las larvas resultantes (A) fueron comparadas con otras (B) obtenidas de forma similar pero con una baja resistencia a esta enfermedad. En sus experimentos, cuando alimentaron las larvas A y B, con alimento conteniendo esporas del agente patógeno, obtuvieron una mayor incidencia de *Ascospaera apis* en el grupo B, si su crianza era hecha por abejas nodrizas o en un incubador sin abejas. A su vez, cuando compararon el comportamiento higiénico entre los dos grupos, observaron una mayor eficacia en las abejas del grupo A.

WATANABE (1987), citado por SPIVAC y GILLIAM (1993), sugirió que de las colonias originadas por múltiples líneas paternas se podrían esperar diferencias en la expresión del comportamiento higiénico y en las formas de resistencia. Lo que indica la importancia de seleccionar las colonias para una enfermedad particular y aún, refleja el interés de la inseminación instrumental con la utilización del semen de un zángano para una detección más sencilla de la resistencia a la misma enfermedad.

Por tanto, esto refleja que, las abejas pueden tener un buen comportamiento higiénico, pero esto, no significa que la colonia demuestre necesariamente resistencia a las enfermedades. Además todos estos mecanismos están bajo control genético, sin embargo, ellos aún no son totalmente comprensibles y como se evidencia por la naturaleza de la reproducción y cría de los Apidae, es muy difícil seleccionar en un programa de mejora.

Así pues, tenemos que tener en cuenta que la expresión total del comportamiento higiénico y de la resistencia en el interior de la colmena depende primariamente de la enfermedad, de la proporción de abejas que manifiestan el comportamiento higiénico y del grado de resistencia fisiológica en las abejas adultas y larvas.

Este punto es para nosotros de gran interés, pues es el objeto de nuestro trabajo, paralelamente a la línea de investigación de otros autores, se lanza la posibilidad de determinar medidas de control basadas en el comportamiento higiénico de las abejas limpiadoras. Por otra parte tenemos también como objetivo sensibilizar a los apicultores de la importancia de este comportamiento para mantener las colonias de sus explotaciones con un mayor grado de resistencia a las enfermedades y familiarizarlos con los test de limpieza demostrándoles que se pueden determinar de una forma práctica. En este sentido, hemos intentado probar la influencia de las condiciones climáticas y de la "performance" de la colonia en el comportamiento

higiénico, poniendo a punto estas técnicas, para posteriormente utilizarlas en trabajos de selección de abejas resistentes a enfermedades de la cría.

1.6.1.1. - Estudios de comportamiento higiénico

Las abejas melíferas construyen los panales para almacenamiento de la comida y de la cría, por lo que el estado sanitario del nido de cría es muy importante para el desarrollo de ésta en sus ciclos repetidos de cerca de 21 días. La acumulación de materia orgánica o detritus excluye la utilización futura del nido al reducirse el espacio disponible. Así, cuando ocurre la muerte de la cría por enfermedad, en las fases de huevo, larva o de pupa, el nido acumula fuentes continuas de infección y los panales quedan infectados. Por lo que una importante actividad de las abejas adultas es la limpieza del nido de cría (NEWTON y OSTASIEWSKI 1986).

Así, comenzamos por definir lo que es el comportamiento higiénico y cómo se mide.

Este concepto ha sido referido por varios autores en la bibliografía, tales como MESSAGE (1979); GILLIAM y col. (1983); MORITZ y SOUTHWICK (1992); MILNE (1985); SPIVAK y col. (1995); KEFUSS y col. (1996). Nosotros hemos seguido la definición adoptada por CARDENAL GALVÁN y col. (1988): "El comportamiento higiénico es un mecanismo de resistencia a las enfermedades de la cría basado en la rapidez del desoperculado de las celdillas con prepupas muertas o enfermas y la extracción de las mismas".

Un aspecto del comportamiento higiénico de las abejas melíferas es el canibalismo de la cría. En circunstancias muy particulares, los huevos y la cría, en todas las fases de su desarrollo pueden ser comidos por las obreras (MORITZ y SOUTHWICK, 1992). En el caso de canibalismo de la cría de los zánganos, dos circunstancias son esencialmente comunes, siempre que en la colonia haya una carencia de proteína porque el polen no puede ser pecoreado por las abejas, debido a las malas condiciones atmosféricas (WEISS, 1984) y cuando las larvas de los zánganos son diploides, éstas son comidas en el día 1-2 de la fase larval, en *Apis mellifera* y entre los días 2-3 en *Apis cerana* (WOYKE, 1962, 1984), citado por CRANE (1990) y MORITZ y SOUTHWICK (1992).

Según MORITZ y SOUTHWICK (1992), la cría de las obreras, solamente es canibalizada en situaciones de rara emergencia. Uno de los ejemplos conocidos es el caso del canibalismo de las larvas jóvenes que aparece frecuentemente en las colonias con obreras ponedoras, en las que se presenta la postura de varios huevos por celdilla (PAGE y ERICKSON, 1988).

Una tercera situación de canibalismo ocurre en la cría, debida a la mortalidad en la colonia. Seguidamente comentamos algunos de los factores que pueden originar esta mortalidad.

WINSTON y col. (1979), encontraron que cuando las colonias de las abejas africanizadas se preparan para la enjambrazón y están en una situación de carencia alimentaria, las obreras probablemente comen todos los huevos y larvas, lo mismo puede ocurrir para otras abejas tropicales.

MORITZ y SOUTHWICK (1992) observaron que si la temperatura del nido de cría disminuía sustancialmente por debajo de los 34°C, por un largo periodo de tiempo, las obreras limpiaban los panales por remoción e ingestión de las larvas dañadas o muertas. Ya previamente, este fenómeno fue denominado comportamiento higiénico y tuvo una particular importancia a través del trabajo de ROTHENBUHLER (1964a), citado por MORITZ y SOUTHWICK (1992), sobre la resistencia a la loque americana, una vez que, algunas de las larvas infectadas por el *Bacillus larvae* eran ingeridas por las obreras (CRANE, 1990) y SPIVAK y GILLIAM (1993), siendo este un ejemplo de canibalismo asociado a la mortalidad de la cría por enfermedad.

Paralelamente a esto, el canibalismo o la ingestión de los estadios infectados y de los cadáveres también ha sido referido en otras especies de insectos, como por ejemplo, en la títula (*Tipula oleracea*), (CARTER, 1973). En esta especie este comportamiento estaba asociado a la propagación de patógenos. Otro ejemplo de canibalismo asociado al comportamiento higiénico es referido por MILNE (1985), en la cuantificación del comportamiento de remoción, quien observó que una abeja es removedora (limpiadora) si ella mantiene la cabeza en la celdilla conteniendo la larva, por lo menos, 20 segundos y observó que la mayoría de las larvas eran parcialmente ingeridas.

Este punto es para nosotros de interés, una vez que pensamos que el canibalismo también ocurre, al menos en el caso particular de la Ascosferiosis, y por lo que debe ser referido como un tercer componente del comportamiento higiénico. Indica que las obreras remueven la cría enferma a través de la ingestión de las larvas enfermas y la extracción de las larvas cuando ya están momificadas. Lo que está en concordancia, con GÓMEZ PAJUELO (1986) y con SPIVAK y GILLIAM (1993), estos últimos autores, en el caso de la Ascosferiosis, solamente se refieren a la extracción. Por tanto, la opinión generalizada entre los investigadores es que la remoción ocurre a través del canibalismo de la cría, pero son pocos los que lo han referido en la bibliografía referente a la Ascosferiosis.

Así pues, nosotros proponemos además de los dos componentes del comportamiento higiénico referidos anteriormente, la desoperculación de las celdillas y la extracción de las larvas momificadas, otro basado en el canibalismo de la cría enferma o muerta, siguiendo a numerosos especialistas (ROTHENBUHLER, MILNE, NEWTON y MICHII, SPIVAK y GILLIAM, GÓMEZ PAJUELO, etc).

Este comportamiento se mide de acuerdo a la rapidez de una colonia para limpiar una muestra de cría muerta. KEFUSS y col. (1996) consideran que una colonia es higiénica cuando

limpia una muestra de 5x5 cm (2x2 pulgadas) de cría muerta en menos de 48 horas y las que tardan más de 48 horas no son consideradas higiénicas. Este es el principio general de todos aquellos que han trabajado en esto, presentándose variaciones en la metodología utilizada relativas a la técnica de muerte de la cría (punción, congelación, gas cianhídrico o cría enferma), al área de la muestra, al tiempo de congelación y a los grados utilizados en la misma y también en el tiempo de remoción o extracción de las crías.

1.6.1.2. - Técnicas de comportamiento higiénico para determinar la resistencia a Ascosferiosis (*Ascosphaera apis*) en *Apis mellifera*

Las diferentes enfermedades de las abejas pueden tener el mismo o diferentes mecanismos de resistencia o susceptibilidad. La aplicación de técnicas apropiadas ofrece una herramienta de gran utilidad para demostrar que esta resistencia es genética y puede ser heredable.

La literatura sobre los test utilizados para medir el comportamiento higiénico y así determinar la resistencia de las abejas a las enfermedades es extensa. Sin embargo, hasta ahora la mayoría de los test están fuera del alcance de los apicultores y están orientados para trabajos experimentales. Seguidamente citamos algunos de los trabajos más importantes sobre los test de limpieza que se han diseñado en abejas melíferas (tabla nº 6).

Tabla nº 6: Relación de autores que han investigado el comportamiento higiénico en *Apis mellifera* L.

Autor	Fecha	Metodología
PARK (citado por NEWTON y OSTASIEWSKI y KEFUSS y col.)	1936-1937 (1986) (1996)	Test de introducción de un trozo de panal conteniendo aproximadamente 75 momias
ROTHENBUHLER (citado por NEWTON Y OSTASIEWSKI y MESSAGE y GONÇALVES)	1958-1964 (1986) (1980a) 1964	Test de introducción de un trozo de panal conteniendo aproximadamente 75 momias o inoculación de 200 larvas con las esporas de la enfermedad en los panales
JONES Y ROTHENBUHLER (citados por MESSAGE y GONÇALVES y NEWTON y OSTASIEWSKI)	 (1980a) 1964	Test de muerte de la cría con gas cianhídrico
NEWTON y col.	(1986) 1975	Técnica de muerte de la cría por congelación durante 48 horas. Tiempo total considerado para la extracción fue de 3 a 6 días.
NEWTON y OSTASIEWSKI	1986	Test de muerte de la cría por punción Tiempo total considerado para la extracción fue de 24 horas
GONÇALVES y KERR	1970	Test de muestra de cría (5x10cm) muerta por congelación durante 48h y puesta a temperatura normal o a 34°C durante 6 horas. Tiempo total considerado para la extracción de 48 horas
MESSAGE y GONÇALVES	1980	Empleo del test diseñado por GONÇALVES y KERR (1970)
GILLIAM y col.	1983	Test de muerte por congelación
KEFUSS y col	1996	Test de muerte por congelación
SPIVAK y GILLIAM.	1993	Test de muerte por congelación
SPIVAK y col.	1994	Test de muerte por congelación
MURRAY	1993	Empleo del test diseñado por GILLIAM y col. (1983) y test de muerte de la cría por punción
MILNE	1982-1985a y b	Test de muerte de la cría por congelación y punción
TABER	1995	Introducción del pollo muerto operculado en el centro del nido de cría, con su eliminación en 48 horas o menos

En la tabla nº 6 se recogen los autores que han trabajado en el comportamiento higiénico los métodos y técnicas estadísticas que emplearon.

Bajo metodologías diferentes y diseños variados, el comportamiento higiénico utilizaron varios autores para la determinación de la resistencia de las abejas a diversas enfermedades. PARK (1936, 1937) citado por NEWTON y OSTASIEWSKI (1986); TABER (1995); KEFUSS y col. (1996) descubrió que se podían seleccionar abejas resistentes a la loque americana (*Bacillus larvae*), cuando observó que las larvas y pupas muertas por esta enfermedad eran frecuentemente extraídas de las celdillas. Este principio lo introdujo ROTHENBUHLER en el año 1964, quien realizó varios trabajos sobre el comportamiento higiénico para control de la loque americana y encontró que las estirpes resistentes de abejas eliminaban rápidamente las larvas muertas de los cuadros, mientras que las estirpes susceptibles no lo hacían (MILNE, 1985; NEWTON y OSTASIEWSKI, 1986; GILLIAM, 1990; TABER 1995 y KEFUSS y col., 1996). Hasta ahora el test diseñado para la determinación de la resistencia a esta enfermedad se basaba en la inserción de un trozo de un panal contaminado conteniendo aproximadamente 75 momias de cría enferma en una colonia sana o en la alimentación de 200 larvas con esporas de la enfermedad (NEWTON y OSTASIEWSKI 1986).

Así, la identificación por los apicultores de la resistencia a la loque americana se utilizó en la cría de reinas seleccionadas, pero los métodos corrientes eran difíciles y conllevaban mucho tiempo.

En el mismo año, JONES y ROTHENBUHLER, citados por MESSAGE y GONÇALVES (1980a) y NEWTON y OSTASIEWSKI (1986) propusieron la utilización de una muestra de cría muerta por gas cianhídrico y demostraron que las abejas resistentes removían las larvas y pupas muertas de esta forma, significativamente más deprisa que las abejas susceptibles.

NEWTON y col. (1975) estudiaron un test para medir este comportamiento basado en la técnica de muerte de la cría por congelación durante 48 horas y consideraron que las colonias eran higiénicas cuando la muestra era desoperculada y las crías removidas de 3 a 6 días, lo que probó ser un test fiable. Lo mismo hicieron MESSAGE y GONÇALVES (1980) quienes estudiaron el efecto de diferentes condiciones de las celdillas test, en el comportamiento higiénico, por medio de métodos no paramétricos, utilizando un test U de Mann-Whitney para dos muestras independientes. Siendo la metodología seguida para matar la cría la que propusieron GONÇALVES y KERR (1970), basada en la sustitución de una muestra de cría de 5x10cm por otra mantenida 48 horas en congelación y posteriormente a temperatura ambiente a 34°C durante 6 horas. El tiempo de extracción considerado fue de 48 horas.

Paralelamente a esta metodología MILNE (1983) puso a punto la misma técnica para la Ascosteriosis y realizó varios trabajos laboratoriales para la determinación de la resistencia ante las enfermedades de la cría.

Más tarde NEWTON y OSTASIEWSKI (1986) diseñaron un test de limpieza para determinar el comportamiento de resistencia de las colonias a la loque americana, para lo cual sacrificaron 21 crías (prepupas y pupas en las celdillas operculadas) por punción con un alfiler entomológico nº 5, en tres lotes de 7 crías operculadas, situadas en otras tantas zonas del cuadro. Estos lotes fueron identificados mediante chinchetas de colores. Simultáneamente, varios test de muerte por punción y por congelamiento fueron hechos para determinar si había alguna correlación en la respuesta de las abejas a la cría muerta. Los datos fueron sometidos a estudio estadístico mediante un Test χ^2 ($P \leq 0.0001$; $n=76$). Las colonias eran consideradas higiénicas si la extracción ocurría en un día y no higiénicas si tres o más días eran necesarios a la eliminación de todas las crías sacrificadas por punción. Además obtuvieron una correlación positiva ($r=0,956$; $gl=3$) entre la rapidez del desoperculado de la cría muerta por punción y la rapidez de la remoción de la cría muerta por congelación, lo que no es causado ni por el agujero hecho con el alfiler en la celda operculada ni tampoco por la pérdida de hemolinfa de las prepupas y pupas moribundas.

Otros como GILLIAM y col. (1983) llevaron a cabo un test utilizando la inserción de una porción de cría congelada en los cuadros para medir este comportamiento. Así como MURRAY (1993) cita que en Nueva Zelanda, algunos criadores utilizan la técnica de la muerte por congelación de GILLIAM y col. (1983) y la técnica del sacrificio de la cría por punción para la selección y cría de reinas resistentes a la Ascosteriosis.

Lo mismo hicieron posteriormente SPIVAK y col. (1994) quienes estudiaron el comportamiento higiénico y la tolerancia de las abejas ante *Varroa jacobsoni* y sugirieron la importancia de esta técnica en la determinación de la reacción de las abejas higiénicas a los ácaros.

También TABER (1995) sugiere una forma de descubrir abejas que poseen algunos genes del comportamiento higiénico, introduciendo cría muerta en el centro del nido de cría. Las abejas que necesiten más de 48 horas para su eliminación, poseen menos genes relativos a este comportamiento y, por lo tanto, serán más sensibles a la loque americana.

Los resultados más interesantes relativamente a estos experimentos han sugerido la sustitución de las reinas de colonias que tenían una gran susceptibilidad a la Ascosteriosis y la selección de abejas resistentes a la enfermedad (GILLIAM y VANDENBERG, 1990). Además estos mismos autores han sugerido que solamente la integración de varias formas de prevención en el manejo de las abejas podrá asegurar su control. En este sentido para mejorar la salud de las colonias de abejas melíferas habría que utilizar, en vez de los medicamentos, las informaciones de que se dispone con respecto a la genética de las abejas.

2 - CRÍA E INSEMINACIÓN DE REINAS

Actualmente, la cría de reinas representa una alternativa apícola importante, puesto que permite la renovación de las reinas según las necesidades de los apicultores, haciendo nuevas colonias mejorando sus cualidades genéticas, todo lo cual se traduce en un aumento importante de la producción. A su vez la inseminación artificial representa un eslabón importante, pues es un medio auxiliar obligatorio en el trabajo de cría por selección, permitiéndonos mantener la pureza de las líneas de cría y obtener también más fácilmente ciertas combinaciones.

2.1 - CRÍA DE REINAS

La puesta a punto de la cría de reinas empezó después de los descubrimientos de DZIERZON en el año de 1845, sobre la determinación del sexo y sobre el hecho que la reina después de iniciar la puesta no se vuelve a acoplar otra vez; y las de LANGSTROTH en el año de 1851, sobre el descubrimiento del espacio por la abeja y el desarrollo de la colmena móvil. DOOLITTLE en el año de 1889, desarrolló un método de cría de reinas que incluía la transferencia de las larvas jóvenes de celdas de obreras para cúpulas de cera de abeja hechas con el esbozo de la celda real (HARBO, 1986), como respuesta a la necesidad de producir más reinas italianas para vender a sus amigos apicultores. Con la introducción de la raza italiana en los años 20 en América del Norte se inició el desarrollo de la cría industrial de reinas (PAGE y LAIDLAW, 1992) y con pequeñas o ningunas modificaciones los métodos de DOOLITTLE continúan siendo utilizados actualmente (HARBO, 1986 y PAGE y LAIDLAW, 1992). Consecuentemente hace más de un siglo que los apicultores se han tenido que decidir a criar reinas, induciendo a las mismas a construir celdas reales para utilizarlas cuando ellos necesitaban renovarlas, aumentar el número de las colonias o para su venta, y desde entonces varios métodos han sido desarrollados.

De este modo, existen muchos y diversos métodos, así como variantes de los mismos, los cuales varían según los objetivos propuestos. Empezaremos por hacer una retrospectiva muy resumida de la evolución de la cría de reinas, una vez que su metodología exige un desarrollo tan amplio que no es posible exponer aquí más que lo esencial.

Desde hace muchos años los apicultores utilizan las celdas reales, construidas espontáneamente por las propias abejas, de las colonias que están a punto de enjambrar o a punto de proceder a la sustitución natural de la reina. La reina vieja puede ser retirada de una colonia que está construyendo alveolos reales y dejándole una celda real para su remplazo, las celdas reales excedentes, usualmente operculadas pueden ser cortadas y colocadas en cuadros de colonias cuyas reinas hayan sido retiradas o en cuadros de colonias que necesitan remplazar la reina.

(LAIDLAW, 1979). Este método fue considerado el más sencillo para un apicultor que necesita cambiar sus reinas o para la cría de pocas reinas (JOHANSSON y JOHANSSON, 1973; LAIDLAW, 1979). Este último autor añade que el camino más sencillo para criar reinas, con un mayor control por parte del apicultor, es retirar la reina de una colonia, o enjaular ésta lejos del nido de cría, o colocar un panal con huevos y larvas jóvenes de una colonia seleccionada en una colonia sin reina y después dejar que las abejas hagan el resto. LAIDLAW (1979) también afirmó que una pequeña modificación a este método para obtener reinas de mejor calidad consistía en seleccionar en un panal varias larvas de dimensión apropiada, abundantemente alimentadas y dilatar las paredes de los alveolos alrededor de estas celdas o retirar una parte del panal por debajo de las abejas seleccionadas. Otro método sencillo para la cría de pocas reinas, en una colonia que no está a punto de enjambrar ni tampoco necesita cambiar su reina e incluso no es necesario proceder a la búsqueda de la reina fue referido por JOHANSSON y JOHANSSON (1973). Consistía en poner mitad de los cuadros de cría de una colmena sencilla en el centro de una segunda colmena e introducir en el espacio vacío restante cuadros llenos con abejas y reservas, o si no las tenemos, panales estirados. La segunda colmena se coloca encima de la primera con un excluidor de reinas entre las dos. Ocho días después, ya se pueden observar huevos en la primera colmena indicando la presencia de la reina, la cual se coloca en un nuevo lugar y en la otra colmena las abejas inician la construcción de celdas reales si están presentes huevos o larvas muy jóvenes, caso contrario se introduce un cuadro con cría para estimular a las abejas a edificar celdas reales.

Otros métodos han sido desarrollados y modificados a lo largo del tiempo, como por ejemplo, el método empleado por ALLEY en el año de 1882, que fue el primero en desarrollar un sistema práctico de cría de reinas o el método de MILLER introducido en el año de 1912 (LAIDLAW, 1979 y MORSE, 1994).

Sin embargo, nosotros haremos un análisis más profundo en lo que respecta a la cría y manutención de las reinas para la inseminación artificial, una vez que se supone que en los lugares donde se efectúa la inseminación se conoce y se practica un método sistemático de cría de reinas, pues es muy importante que éstas sean grandes y vigorosas, así se inseminan más fácilmente, lo que conlleva un mayor porcentaje de éxito.

De este modo, para producir reinas el apicultor tiene que manejar las colonias de abejas de forma que las obreras puedan criar algunas larvas, elegidas por el apicultor, para reinas.

En el trascurso de la cría de reinas en grandes cantidades e independientemente del método utilizado hay que tener en consideración los cinco factores principales para la obtención de reinas de calidad: la "genética" de la colonia, o sea, la mejor de todas las colmenas (la colmena madre), la colonia incubadora o nodriza, la colonia criadora o de acabado, un incubador y la colonia de fecundación (WOYKE, 1980a, citado por CRANE, 1992). El comienzo de la cría real exige la ausencia de la reina, pero después de la aceptación de las larvas en las colonias

iniciadoras, la cría final puede ser hecha de distintas formas: a menudo se utilizan colonias con una reina ponedora, confinada en una parte de su colmena, detrás de un excluidor de rejas (separador vertical) o bajo una rejilla (separador horizontal); otras veces se utilizan colonias con reinas y otras veces una colmena madre utiliza dos cuerpos, uno como colonia nodriza y otro como colonia de acabado (HARBO, 1986 y JEAN-PROST, 1989). HARBO (1986) empleó los dos, colonias con reina y sin reina, y recomienda las colonias sin reinas para todos aquellos que producen muchas reinas por año. Trabajos detallados de colonias iniciadoras han sido publicados por CLARKE (1992) quien describió diferentes tipos de colonias iniciadoras utilizadas durante la cría de reinas, las cuales eran mantenidas en colmenas con dos cuerpos colocados verticalmente y la reina confinada en el cuerpo inferior bajo un excluidor de reinas. El cuerpo de arriba se hace temporalmente huérfano, sustituyendo el excluidor por una plancha de madera, aproximadamente 3-4 horas después se introducen 96 celdas artificiales con larvas injertadas, 20-24 horas más tarde, las aceptadas, son transferidas para las colonias de acabado (10-12 celdas/colonia), el excluidor vuelve a la colmena que se deja así 3-7 días antes de repetir el proceso. Al final el autor refiere que como media, las colonias iniciadoras, crían reinas en un 72-83% de las celdas artificiales.

En lo que respecta a la metodología empleada, se puede decir que los métodos modernos de la cría de reinas fueron desarrollados a finales del último siglo, siendo considerado G. M. DOOLITTLE el padre de la moderna industria de cría de reinas. Él no inventó las cúpulas artificiales pero fue el primero que vio que éstas podrían ser hechas y aceptadas por las abejas además fue el primero que demostró que la cría de reinas se puede hacer en colonias en presencia de una reina (MORSE, 1994).

Diversos autores refieren que casi todos los criadores especializados han adoptado el método americano de DOOLITTLE y PRATT, por injerto de larvas (DRESCHER, 1976; LAIDLAW, 1979; JEAN-PROST, 1989 y GUTH, 1990a), pero con los perfeccionamientos aportados son también numerosas las variantes utilizadas, en este método.

HARBO (1986) afirmó que la técnica del injerto de huevos, es una forma del doble transvase, pero en vez de depositar otra larva en la cúpula se transfieren uno a dos huevos juntos de 2 a 3 días de edad. Éstos son transferidos con la porción de cera que llevan (JEAN-PROST, 1989), que es un disco de cera de abejas de 3mm de diámetro circundado de jalea real pero sin tocar a los huevos (HARBO, 1986). Sin embargo, este último afirmó que para el injerto de los huevos se necesitan huevos de edad conocida y una forma de transferir los huevos y el círculo de cera para las cúpulas artificiales.

A su vez, el doble transvase o doble injerto consiste en transferir una primera serie de larvas a las celdas artificiales y colocarlas en las colonias nodrizas. Un día después del injerto original extraer las larvas de esta primera serie sin quitar la jalea real del fondo de los maestriles, seguidamente aportar una segunda serie de larvas jóvenes (esta vez seleccionadas) y colocarlas

sobre la jalea real que había sido destinada a las larvas de la primera serie, con la ayuda de una aguja (LAIDLAW, 1979; HARBO, 1986; DELAPLANE y HARBO, 1988; JEAN-PROST, 1989 y MORSE, 1994).

Relativamente a estas dos variantes del método de DOOLITTLE y PRATT, según DRESCHER (1976) se emplea frecuentemente la técnica del doble trasvase, una vez que el trasvase de los huevos en las cúpulas reales, según la técnica desarrollada por OROSI-PÀL en el año de 1960, presenta más riesgos y requiere un mayor trabajo, aunque se obtienen reinas con mayor número de ovariolas. Lo que está de acuerdo con el trabajo de VAILATI y col. (1986) quienes constataron que el número medio de ovariolas en los ovarios de reinas italianas oscilaba alrededor de 29, en reinas criadas a partir de la técnica del doble injerto (en los finales de agosto, con poca flora apícola y alimentadas con una mezcla de jalea real con agua destilada), hasta 162 en reinas criadas a partir de la técnica del doble injerto (a finales de julio, con un buen flujo de *Castanea* y alimentadas solamente con jalea real). Paralelamente al trabajo de DEDEJ (1994) quien encontró que los siguientes parámetros: número de larvas aceptadas, número de reinas que emergieron y el peso de las reinas cuando emergieron y después del acoplamiento natural, presentaban mejores resultados en el grupo en que se empleó el doble injerto comparados con el grupo en que fue empleado un injerto sencillo. Lo que indicó, según el mismo autor, que la técnica del doble injerto producía reinas superiores. Esto se contradice con lo que afirmó MORSE (1994) que la técnica del doble injerto no es merecedora del tiempo extra empleado y que se pueden obtener buenos resultados sin recurrir a ésta. Ya anteriormente, JEAN-PROST (1989) había afirmado que el injerto de huevos tiende a convertirse en práctica corriente, aunque en un principio, se ha establecido un debate sobre el valor comparativo de las reinas obtenidas a partir de jóvenes larvas injertadas y de las maestras obtenidas a partir de huevos transferidos, pero en los ensayos para establecer las diferencias entre los defensores de uno y los partidarios del otro método no se han puesto de manifiesto diferencias sensibles entre las reinas obtenidas. Por lo que, se piensa en la posibilidad, que las diferencias en los resultados obtenidos sean consecuencia de diferentes condiciones de manejo consecutivas a la cría o debido a la desigual habilidad de los operadores para hacer el injerto. Lo que está de acuerdo con LAIDLAW (1979) quien refirió que el doble trasvase puede asegurar excelentes reinas y ser un buen procedimiento, en el caso de la técnica ser debidamente efectuada. Al revés puede resultar en reinas de calidad inferior al trasvase sencillo, si el doble trasvase ocurre en el segundo o tercer día después del primer injerto, una vez que el alimento en las cúpulas artificiales no es adecuado para las larvas tan jóvenes o si las larvas del doble trasvase son muy viejas o fueron insuficientemente alimentadas previamente al injerto. También se ha emitido la idea de que la doble transferencia producirá reinas más pesadas que las procedentes del injerto simple, sin embargo, es necesario medir los rendimientos si queremos comparar los métodos (JEAN-PROST, 1989). Fue lo que hicieron DELAPLANE y HARBO (1988) y concluyeron

que las reinas no pesaban más cuando eran comparadas con las producidas por el injerto sencillo y así esta técnica no era superior a la otra.

GUTH (1990a) llega más simplemente al mismo fin empleando la metodología tradicional del trasvase de larvas con menos de 24 horas de edad en las cúpulas en plástico con la ayuda de una aguja.

A su vez, un trabajo interesante fue desarrollado por DEGRANDI-HOFFMAN y colaboradores (1989) quienes seleccionaron una línea de abejas europeas para que el desarrollo de la reina hiciera en un periodo menor y lo compararon con una población cerrada. Sus resultados demostraron que las reinas seleccionadas emergían 9,5-10,6 días después del injerto, el periodo total del desarrollo era de 13,5-14,6 días, mientras que, las reinas obtenidas de la población cerrada emergían 10,4-11,0 días después del injerto y su periodo de desarrollo total era de 14,4-15,0 días. Consecuentemente, estos autores recomendaron a los apicultores registrar el periodo de desarrollo de las reinas injertadas, para seleccionar las que lo hacían en un periodo más corto suponiendo que la descendencia de estas reinas pudiese heredar esta característica, así las colonias resultantes podrían ser más resistentes a enfermedades como la Varroasis.

En el desarrollo de las diferentes técnicas y métodos utilizados en la cría de reinas DRESCHER (1976) encontró que una condición necesaria para obtener reinas grandes es el empleo de cúpulas artificiales de 9 mm de diámetro y la introducción en estas de larvas jóvenes, unido a la utilización como cifra máxima de 30 celdas reales abiertas por colmena nodriza. Mientras que, GUTH (1990a) ha utilizado dos cuadros portacúpulas con 24 realeras artificiales cada uno, o sea 48 realeras, introducidas 1 a 2 horas después de orfanar la colmena y 6 días después del injerto las realeras operculadas situadas en las colonias de acabado son colocadas en un incubador a 35°C.

Otra técnica interesante fue desarrollada por VANDENBERG y SHIMANUKI (1987) para la cría de obreras en laboratorio. Las larvas eran criadas en celdas artificiales de cera de abejas en cajas de Petri a 34°C y 96% humedad relativa, después de ser trasladadas con un día de edad y alimentadas con una mezcla de jalea real, agua, glucosa, fructosa y extracto de levadura o con jalea real 1 a 2 días añadiendo después la mezcla alimenticia. En sus resultados observaron que solamente 75% de las larvas sobrevivían cuando la mezcla alimenticia era preparada sin el extracto de levadura e incluso que las larvas tenían un mayor grado de supervivencia (90%) cuando se empleaban las celdas artificiales hechas de cera y no de plástico (57%). Observaron también que el peso de las obreras adultas era más elevado (media 112mg) cuando éstas se criaban sólo con la mezcla alimenticia que cuando se desarrollaban en la jalea real por 1-2 días y seguidamente con la misma mezcla anteriormente referida. Por lo que, estos autores sugirieron que esta técnica podría facilitar estudios sobre las enfermedades de la cría.

2.1.2 - TÉCNICAS DE INTRODUCCIÓN DE REINAS

Aunque existen diferentes técnicas de introducción de la reina en la colonia no las vamos a detallar aquí todas, algunas se aplican a reinas que no han interrumpido la puesta, otras a las colmenas huérfanas, aquí haremos referencia a las más eficaces. Muchas veces, la aceptación de una reina inseminada instrumentalmente es un problema, por lo que, para reducir la frecuencia de la muerte de las reinas se utilizan diversas técnicas.

Según DRESCHER (1976), a menudo se utiliza el empleo de una jaula de alambre en la que la reina joven es introducida sobre un panal construido, sin abejas, en la zona de las crías a punto de nacer, a los pocos días, 5-6 días más tarde (JEAN-PROST, 1989) se saca la jaula con la reina y las abejas que nacieron entre tanto en su cercanía y se mezclan con las demás obreras del núcleo. También es difícil el mantenimiento de la reina en jaulas pequeñas, con pocas abejas, fuera de la colonia, en una incubadora con 25°C y sólo se recomienda en el caso de una merma temporal de abejas (DRESCHER, 1976). Otras técnicas pueden ser utilizadas, como la cría de las reinas jóvenes e incluso las reinas para la inseminación instrumental en colonias nodrizas especiales, sin reina, en las que pueden introducirse de manera aislada en jaulas de red, hasta 20 reinas, método muy utilizado en los EE.UU. (DRESCHER, 1976 y MORSE, 1994). Sin embargo, en esta técnica es importante que cada caja que contiene una reina tenga las aberturas suficientemente anchas para el contacto de la reina con las obreras por lo que generalmente se usa una rejilla con aberturas de 2,5mm, aunque, se presentan a veces lesiones en las reinas, principalmente en las patas (WOYKE, 1989). En consecuencia han sido puestos a punto varios tipos, y recomendándose una jaula con rejilla de 1,2 a 1,5mm (WOYKE, 1988). Cuando el periodo de almacenamiento es pequeño, de 4 a 10 días después de la emergencia de las reinas, el porcentaje de reinas no dañadas aumenta de 46 a 100%. Además cuando las celdas reales son introducidas en los núcleos (en vez de las reinas vírgenes) el grado de aceptación aumenta de 40-60% hasta 100% (WOYKE, 1989).

Otro método recomendado y que biológicamente es lo más adecuado para mantener la reina, es su introducción en un núcleo de 3-5 cuadros, con suficientes abejas jóvenes y cría operculada (DRESCHER, 1976). Anteriormente SZABO y TOWNSEND (1974) habían referido que las obreras de hasta 7 días de edad aceptan mucho mejor a las reinas jóvenes que las abejas de 14-21 días de edad. HARBO (1986) recomendó la introducción de cada reina enjaulada en núcleos nuevos sin cría con 2000-5000 obreras, por lo menos 4 días antes de colocarlos en los colmenares, liberándose la reina 3 días después si las obreras no pican las jaulas y observando cerca de 10 minutos después de su liberación para ver si alguna está siendo perseguida o picada por una o más obreras, en esta situación deben permanecer enjauladas más dos o tres días. El mismo autor cita que las reinas con 3 a 4 semanas de edad inician la puesta 1-2 días después de su liberación. SCRIVE (1989) describió un método original de introducción,

con el que obtuvo buenos resultados y que consistía en sumergir una reina en jalea real diluida al 30% en agua y después introducirla por la parte superior de la colmena, en el centro del cuadro de cría. En el mismo año, reinas fecundadas eran mantenidas (A) enjauladas en cajas dentro de núcleos durante 61-65 días, o (B) en paquetes de abejas durante 51-65 días, o (C) en cajas de transporte durante 21-54 días. Fueron comparados la supervivencia y aceptación de las reinas, su peso y el daño corporal, obteniéndose para A los mejores resultados, no tan buenos para B y un considerable daño corporal en C (KLEINSCHMIDT, 1989).

De manera similar, GUTH (1990a) describió una nueva técnica de introducción de reinas consistente en una jaula mayor que las existentes, con una rejilla de malla fina, se fija al cuadro con cría operculada, de tal forma, que ninguna abeja exterior pueda entrar, y el canal de liberación se llena con "candi". La aceptación de la reina por las abejas jóvenes que están a punto de nacer está asegurada y ésta inicia la postura en las celdas liberadas, dos días después que el "candi" es retirado saliendo la reina de la caja y continuando su puesta en los otros cuadros de la colmena. Pasados 8 a 10 días se puede verificar la aceptación y retirar la jaula. Este autor garantiza que los resultados son superiores a las técnicas ya existentes. También, en el mismo año, un aparato fue diseñado para la captura, el enjaulamiento y el transporte e introducción de las reinas (GEFEN, 1990).

Posteriormente, BUYS (1993) ha proporcionado un método de supervivencia de las reinas antes y después de la inseminación instrumental; 13 reinas inseminadas instrumentalmente con 8ml de esperma originaron un contenido medio en la espermateca de 6.362 millones de espermatozoides, una cantidad similar a la de las reinas acopladas naturalmente. Sin embargo, el esperma se quedaba depositado en el oviducto de 3 reinas resultando con un bajo contenido en la espermateca y 10 reinas con los oviductos limpios presentaban un contenido medio de 7.278 millones espermatozoides en la espermateca. Los resultados demostraron que las reinas no necesitan necesariamente de la atención de las obreras para el éxito en los resultados de la inseminación instrumental, una vez que, la supervivencia de 21 reinas después de más de tres semanas era del 95% y la principal ventaja del sistema de mantenimiento de las reinas sin ayuda de las obreras daba un elevado grado de supervivencia bajo condiciones controladas y la ausencia de enfermedades propagadas por las obreras.

Un ejemplo de la importancia de la cría de reinas y su comercialización es el estudio hecho por LOCKE (1988), quien cita que en California más de 500 000 reinas fueron comercializadas a través de los EE.UU., Canadá y otras partes del mundo, y que esta industria movía un valor superior a 2,8 millones de dólares en 1984. Además, en ese mismo año, los apicultores habían producido más de 600 000 paquetes de abejas cada uno con una reina fértil.

2.2 - ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL

La inseminación instrumental fue ensayada por primer vez por FRANÇOIS HUBER, a finales del siglo XVIII, a través de la introducción del esperma en la vagina de la reina con ayuda de un pequeño pincel (WOYKE, 1976b; LAIDLAW, 1989a y LAIDLAW, 1989b), otros autores como WANKLER en 1883, MCLAIN en 1866 y BISHOP en 1920, intentaron introducir el esperma con ayuda de una pequeña jeringa, pero sin éxito (WOYKE, 1976b y LAIDLAW, 1989b).

Según HARBO (1986) los principios básicos de la inseminación instrumental fueron desarrollados entre los años 1926 a 1947, iniciándose la técnica moderna en los EE.UU. con el trabajo de WATSON (1927) (WOYKE, 1976b; LAIDLAW, 1989a,b; CRANE, 1990; GUTH y SCHLEY, 1990; MORSE, 1994). Este método se basaba en la utilización de una microaguja fijada a un micromanipulador, la reina se fijaba con un hilo de seda a un pedazo de madera y la cámara del agujón era abierta con una pinza mantenida con la mano (WOYKE, 1976b y LAIDLAW, 1989b), además introdujo otras características que se mantienen en la actualidad en la práctica de la inseminación, como son, la utilización del microscopio y luz artificial, la decapitación de los zánganos para provocar la eyaculación, la utilización del esperma de varios zánganos en la inseminación e incluso desechó la denominación de "inseminación artificial" por la de "inseminación instrumental", como añade LAIDLAW (1989a).

NOLAN (citado por GUTH y SCHLEY, 1990) basado en los estudios de WATSON, desarrolló y perfeccionó un aparato entre 1929 y 1937 (LAIDLAW, 1989b) este fue el primer aparato especialmente construido para la inseminación instrumental de las reinas (WOYKE, 1976b y LAIDLAW, 1989b), sin embargo, los resultados obtenidos de la inseminación no fueron buenos. Mediante este, algunas particularidades de la reproducción fueron clarificadas y un descubrimiento muy importante hecho por LAIDLAW en el año de 1944 (WOYKE, 1976b y LAIDLAW, 1989a,b; GUTH y SCHLEY, 1990), fue el papel de la válvula vaginal, por la que, el esperma debería inyectarse detrás de esta válvula en el oviducto común (WOYKE, 1976b; HARBO, 1986; LAIDLAW, 1989a,b) debido a que la vagina no era una línea recta como se demostró en el estudio de la morfología de la vagina de las reinas (GUTH y SCHLEY, 1990). Otra aportación hecha por este mismo autor, a partir de 1930, fue la utilización del CO₂ como anestésico (WOYKE, 1976b y LAIDLAW, 1989a,b).

Posteriormente, MACKENSEN y ROBERTS (1948) mejoraron el aparato de NOLAN siguiendo estos nuevos conocimientos. En su aparato la cavidad del agujón se abre con dos ganchos fijados en un soporte y la válvula vaginal es bajada con ayuda de una sonda y la extremidad de la jeringa se introduce en el oviducto común de la reina. En este mismo año, LAIDLAW también construyó un aparato que controlaba con unos tornillos todos los movimientos de los ganchos y de la aguja (WOYKE, 1976b y LAIDLAW, 1989a,b).

Otra aportación importante referida por WOYKE (1976b) fue la construcción de una jeringa con un nuevo tipo de aguja de membrana por MACKENSEN en 1948, plástica y removible (RUTTNER y col., 1976 y LAIDLAW, 1989a) donde el pistón del interior de la jeringa plástica fue reemplazado por una solución salina fisiológica y los cambios de presión para la absorción y evacuación del semen son provocados por los movimientos de la membrana de caucho. La jeringa fue posteriormente mejorada por MACKENSEN (1954) y el modelo perfeccionado es universalmente usado hasta el presente (LAIDLAW, 1989a) así como las jeringas de LAIDLAW y LORENZEN (1957), HARBO (1979) y SCHLEY (1982) como añade SCHLEY y GUTH (1990), en que esta última y otras como la de LAIDLAW (1988) utilizan el pistón y las jeringas cilíndricas de dosis única, modelo Tuberculin (1ml) de fabricación corriente.

Hubo un tiempo en que se recomendaba el agua y varias soluciones fisiológicas para el llenado de la jeringa de MACKENSEN pero el esperma no sobrevivía en éstas, mientras tanto fue recomendada el agua de coco por CAMARG entre los años de 72 a 75. En 1973 RUTTNER recomendó otra solución en la que los espermatozoides sobrevivían muy bien constituyendo estas soluciones un importante refinamiento de la técnica de inseminación (LAIDLAW, 1989a). RUTTNER y TRYASKO (1976) recomiendan una solución fisiológica de cloruro de sodio (0,9 por mil NaCl). No obstante, los mismos autores describen otras soluciones salinas que dan muy buenos resultados, como por ejemplo, la solución fisiológica de Hyes y un diluyente a base de citrato, conocido bajo el nombre de Kiev o Varohm empleado para conservar el esperma de verraco.

Ya en 1960, VESELY modifica la forma de la punta de la aguja y RUTTNER cuatro años después modificó la forma del soporte de la reina, como cita WOYKE (1976b).

El soporte utilizado para las reinas se fue modificando y una nueva aportación surgió con el perfeccionamiento de éste para el aparato de inseminación tipo MACKENSEN. Así LAIDLAW (1988) refirió que el tiempo que conlleva para poner la reina en el tubo de soporte de ésta es menor, si el tubo de soporte de la reina tiene un diámetro uniforme, en vez de la abertura en la extremidad superior del tubo ser más estrecha. El soporte para la reina se ajusta a un tubito del mismo material, perforado y con orificios para permitir la entrada del gas y el tubo de soporte es fijado firmemente y solo es retirado para su limpieza. También en el mismo año SCHLEY describió dos nuevos ganchos para la abertura de la cámara del agujón, en que sus dos principales ventajas eran el hecho de que no es necesario que la cámara del agujón esté muy abierta y así el orificio de la vagina no se contrae.

Similarmente, WOYJE (1991) describió una jeringa guía, la cual consiste en un largo tubo metálico que se fija al bloque de la jeringa, este tubo permite al inseminador hacer todo tipo de movimientos con la jeringa, una vez que la guía de los movimientos se hace con la mano izquierda y la derecha se queda libre para introducir el pico de la jeringa y el esperma en la

vagina, sin el inconveniente de retirar la mano de la jeringa. Así, esta guía permite que las reinas sean inseminadas más deprisa, de una manera más confortable y su construcción es sencilla y económica.

Otras particularidades fueron perfeccionadas a lo largo del tiempo y aportaron mejoras a esta técnica, como por ejemplo, la observación hecha por MACKENSEN (1947) donde una reina tratada dos veces con CO₂ está obligada a poner huevos (WOYKE, 1976b; MACKENSEN y RUTTNER, 1976; HARBO, 1986; LAIDLAW, 1989a,b). Las dos narcosis pueden durar 10 minutos y se practican a intervalos de un día, pudiendo estar o no seguidas por la inseminación; también se puede administrar un tercer tratamiento, para estar seguros del éxito, como añadió MACKENSEN y RUTTNER (1976). El empleo del dióxido de carbono puede variar debido a muchos factores, según los distintos autores. Es interesante reseñar el trabajo de KONOPACKA (1991), sobre la aplicación de diferentes duraciones de narcosis utilizando CO₂ o N₂O₃ en reinas inseminadas instrumentalmente con una o dos dosis (cada una de 8mm³) de esperma. Primero observó que la proporción de reinas ponedoras y no ponedoras, el número de espermatozoides en la espermoteca, y el intervalo entre el periodo de narcosis hasta la postura no estaban afectados por el tipo de gas utilizado. A su vez, la duración del tratamiento tenía un efecto significativo en el inicio de la postura: reinas con dos dosis (narcotizadas 10 minutos cada vez) empezaban a poner, después de 7 a 8 días; reinas con dos dosis pero narcotizadas sólo 1 minuto, empezaban a poner después de un largo periodo. Dosis simples, con narcosis de 0,5-1.0 minutos o de 2 ó 3 minutos no reducían significativamente el inicio de la postura y dos dosis de esperma con 3 minutos de narcosis provocaban el inicio de la postura a lo largo de 15 días, al 80% de las reinas. Similarmente, 118 ejemplares de *Apis mellifera carnica* y 87 de *A. mellifera ligustica* fueron tratados dos veces con dióxido de carbono para inducir la puesta (huevos infértiles); 48 días después del primer tratamiento fueron inseminados instrumentalmente con una media de 6,06 mm³ de esperma; después de la inseminación sólo el 5% de las reinas se quedaron estériles y los mejores resultados fueron obtenidos con la *A. m. ligustica* (BIENEFELD y KUHNERT, 1992).

Una particularidad relativa a los machos es el hecho de que el esperma de los zánganos puede conservarse "in vitro" a temperaturas mayores a 0°C, durante algún tiempo (TABER y BLUM, 1960 y TABER, 1961, citados por WOYKE (1976b)), más precisamente, en la jeringa almacenado a una temperatura de 20 a 25°C durante dos días (HARBO, 1986) y cuando es mezclado con estreptomycin y introducido en capilares de vidrio, cerrados y conservado a una temperatura de 13-15°C, todavía pueden lograrse inseminaciones con él después de 35 semanas (POOLE y TABER, 1970, citados por WOYKE (1976b)).

Recientemente, KAKPAKOV y col. (1995) proponen un método mejorado de conservación criobiológica del esperma de zángano a través del cual el esperma dispone de una viabilidad del 80 a 95%, después de 3 años de conservación en nitrógeno líquido. Su

conservación a largo plazo desempeña un papel importante en la inseminación instrumental de las reinas de *Apis mellifera* L. a lo largo de todo el año.

Uno de los factores en la técnica de inseminación es la edad de los zánganos. El espermatozoide maduro, de color crema amarillento puede obtenerse mediante la eversión artificial de los zánganos de al menos 12 días de edad (RUTTNER y TRYASKO, 1976; HARBO, 1986).

KOENINGER y col. (1995) afirman que en *Apis cerana indica* la inseminación instrumental, hasta el momento, sólo se ha practicado con motivo de algunos estudios científicos debido a dos razones, la primera sería por el número reducido de espermatozoides en esta especie en comparación con los de *Apis mellifera* (aproximadamente 10%) y también por la concentración más baja del espermatozoide, la otra razón sería la presencia de un número más bajo de zánganos sexualmente maduros en la abeja asiática. Además discuten si la extracción de espermatozoides de la vesícula seminal de los zánganos, y no del eyaculado como hasta ahora, sería más favorable para la inseminación instrumental, viendo hasta que punto este método hace posible en el futuro la utilización práctica de la inseminación instrumental en el marco de los programas de cría. Sin embargo, estudios anteriormente hechos revelaron que el espermatozoide recolectado directamente de las vesículas seminales, solamente podría ser necesario algunas veces y que no era tan eficaz como el recolectado después de la eversión y eyaculación (MACKENSEN, 1955, citado por MACKENSEN y RUTTNER (1976)). Esto nos lleva a pensar y a reseñar el estudio de MARTÍ y col. (1996) sobre la presencia de glicoproteínas y cambios en la composición del semen asociados con la maduración de los zánganos. Mediante el empleo de lectinas, demostraron con la ayuda de las técnicas de microscopía óptica y electrónica, que no existen diferencias ultraestructurales entre espermatozoides procedentes de zánganos maduros y de inmaduros. Por otra parte observan que la maduración de los espermatozoides se produce en las vesículas seminales y además que los espermatozoides localizados en éstas presentan el mismo modelo de reacción con las tres lectinas que los procedentes del eyaculado, lo que puede ser debido al hecho de que la composición de las glicoproteínas no se altera durante el paso del espermatozoide por los conductos deferentes hasta la eyaculación. Otro trabajo similar fue el realizado para estudiar el efecto de la parasitación por *Varroa jacobsoni* sobre la expresión de las glicoproteínas en los espermatozoides de *Apis mellifera* (DEL CACHO y col., 1996).

Por otra parte, el número de inseminaciones y la cantidad de espermatozoides dependen principalmente del propósito para el que se hace la inseminación. Una técnica común en los esquemas de selección y en experiencias de genética, es la inseminación de cada reina con un sólo zángano (MACKENSEN y RUTTNER, 1976; HARBO, 1986), pero otras pueden ser utilizadas; recientemente un nuevo procedimiento que permite obtener una representación más equilibrada del patrimonio genético de cada zángano, es la técnica de homogenización del espermatozoide (KUHNER, 1990). Ya en 1988 KUHNER había descrito un método, en el cual se

hacia la extracción del semen para su conservación en tubos capilares de vidrio, y almacenando los tubos cerrados a 15°C hasta el momento de su utilización. Una muestra de igual cantidad de semen era mezclada con una gran cantidad (12 veces el volumen del semen) de diluyente (el tampón Tris con 2 aminoácidos), y la solución resultante era centrifugada durante 10 minutos a cerca de 2500-2750 rpm. Reinas de 6 días de edad eran, entonces, inseminadas con 10-12 ml de semen y después introducidas en núcleos de 4 cuadros, obteniéndose con este método cerca de 90% de éxito en las inseminaciones con las reinas que iniciaron la puesta 4,35 días después de la inseminación.

Entre otras posibilidades esta técnica puede ser usada para mantener la heterogeneidad en un programa de selección y para producir inseminaciones uniformes, pero genéticamente heterogéneas, las cuales incluyen la diversidad genética de los espermatozoides, pero son uniformes porque éstos fueron tomados del mismo tubo (HARBO, 1986). KUHNERT (1990) obtiene buenos resultados con tubos Eppendorf (0,4 ml) en los cuales fija el cuerpo de una jeringa que puede ser adaptable al centrifugador. KAFTANOGLU y PENG (1980) demostraron que los espermatozoides pueden ser diluidos (utilizaron el diluyente de Kiev), mezclados y después recuperados por centrifugación. En la práctica con la técnica de centrifugación se han obtenido excelentes resultados utilizando el diluyente Kiev, también usado por KUHNERT (1990) y con el tampón Tris utilizado por MORITZ (1984) quien refirió que solamente algunos diluyentes pueden ser utilizados con este método. Éxito en la inseminación de reinas con este método lo obtuvieron, entre otros, KAFTANOGLU y PENG (1980); MORITZ (1983, 1984) y KUHNERT (1990). La técnica de homogenización fue utilizada también en un programa de selección en Australia, durante 5 años, con una media de éxito en las inseminaciones de 85%. Se verificó que las reinas empezaban la puesta con más de 4,35 días después de la inseminación y que a lo largo de 4 años la viabilidad de la cría variaba de 88 a 94% y que no eran observadas diferencias apreciables entre la productividad de las reinas inseminadas por este proceso cuando eran comparadas con otras inseminadas sin la homogenización del esperma, como constataron KUHNERT y col. (1989).

De manera similar, FISCHER y MAUL (1991) en sus estudios realizados sobre la técnica de homogenización del semen, encontraron que las reinas inseminadas con ésta proporcionaban resultados satisfactorios referentes al número de días para iniciar la puesta y a la propia puesta, cuando eran comparados con reinas inseminadas por el método convencional. Sin embargo, observaron que el número medio de espermatozoides en la espermateca era más bajo en las reinas inseminadas con este proceso que en las inseminadas por el método convencional.

Otros procedimientos han sido ensayados a partir de mezclas de esperma de zánganos. HARBO (1990) realizó el siguiente estudio: en cada uno de 6 experimentos, aproximadamente, 300 ml de esperma fueron diluidos, mezclados y utilizados para inseminar cerca de 20 reinas.

La mezcla en cada experimento contenía una porción de espermatozoides marcados genéticamente y las reinas también eran marcadas y así la proporción del esperma marcado y el no marcado en cada reina podría ser estimada a través del porcentaje de descendientes marcados y no. El objetivo era determinar si cada reina recibía igual proporción de esperma marcado. En sus resultados constató que los cambios casuales en la frecuencia de la descendencia eran independientes del volumen del esperma, del tiempo de inseminación y del procedimiento utilizado con el esperma en la inseminación. Una vez que la mezcla del esperma no provocaba cambios casuales en la frecuencia de la descendencia, dedujo que mucha de la variabilidad podría haber sido originada por la competición del esperma para vivir en la espermateca, para alcanzar y penetrar en el óvulo o para alcanzar el pronúcleo del óvulo.

Desde que empezó a utilizarse hasta ahora, muchas variaciones en las técnicas de inseminación y en los materiales han sido hechas por los investigadores de diferentes países. Por lo que, la premisa para el empleo usual, de rutina y a gran escala, de la inseminación instrumental es un aparato sencillo y seguro, que deriva de un sinnúmero de mejoras aplicadas a los aparatos de LAIDLAW (1948) y el de MACKENSEN-ROBERTS (1948) (RUTTNER y col., 1976). Éste último aparato se afianzó con la práctica debido a su construcción sencilla y fácil manejo, pero a lo largo del tiempo fue mejorado por MACKENSEN (RUTTNER y col., 1976) y posteriormente descrito por MACKENSEN y TUCKER en 1970 (HARBO y MAUL, 1989). Otro aparato basado en el modelo anterior fue construido por RUTTNER, SCHNEIDER y FRESNAYE, en 1974 (WOYKE, 1976b y RUTTNER y col., 1976) y es llamado el "modelo de aparato estándar" una vez que conlleva las mejores y más originales innovaciones, siendo el más perfecto en términos de evolución de la inseminación instrumental (LAIDLAW, 1989a). Además, SCHLEY y GUTH (1990) refieren que debido a estos perfeccionamientos un aparato de inseminación mejorado estuvo disponible al comienzo de los años 80 e incluso se señala igualmente una evolución en sus accesorios, por ejemplo, actualmente casi solamente se utilizan puntas de vidrio de micropipetas que son más fácilmente desinfectadas y de precio más accesible. Por otra parte los mismos autores añaden que la instalación del dióxido de carbono es más sencilla, una vez que puede ser ligado, a una cápsula de una sola utilización como también a una botella de gran capacidad. Otro ejemplo es la utilización hoy en día de lupas binoculares que tienen una óptica que permite una luminosidad intensa y muy buena nitidez, así como el alumbrado blanco y frío de la reina que aporta una mejora en la iluminación gracias al uso de la fibra de vidrio.

Según HARBO y MAUL (1989) el material utilizado en la inseminación instrumental de las reinas se puede dividir en tres eslabones: el material apícola (jaulas para las reinas y zánganos), material estándar de laboratorio (botella de dióxido de carbono con válvula reductora con manómetro, recipiente de narcosis, recipiente de lavado para el control del flujo de gas, microscopio de 10X) y el material especializado (soporte de inseminación, los ganchos y

jeringa). El mismo autor refirió que estos materiales variaban según los autores, existiendo los modelos estándar del aparato de inseminación utilizados en los EE.UU. y los que se usan en Europa. Así, en los EE.UU. el modelo más utilizado es el aparato descrito por MACKENSEN-TUCKER en 1970 con la utilización de varios tipos de jeringas y agujas, pero los más comunes son las jeringas y agujas de material plástico tipo MACKENSEN. En Europa, inicialmente con la introducción de la técnica de la inseminación, se adaptó el aparato de MACKENSEN-ROBERTS como afirmó HARBO y MAUL (1989), pero con el objetivo de facilitar su manejo casi todas las partes constituyentes han sido cambiadas (como por ejemplo el soporte de la reina que fue desarrollado por RUTTNER), también las agujas de material plástico tipo MACKENSEN fueron sustituidas por los de vidrio debido a que proporcionaban unas mejores condiciones higiénicas y a su bajo precio. Un ejemplo es la jeringa con pistón de SCHLEY que puede ser fácilmente retirada para esterilización en el autoclave. Por lo que el modelo adoptado posteriormente fue el aparato estándar de RUTTNER, SCHNEIDER y FRESNAYE, perfeccionado (HARBO y MAUL, 1989). Este aparato fue también el adoptado por SIRERA MORENO y CAÑAS LLORIA (1996) en sus trabajos sobre inseminación.

Además del aparato de inseminación modelo estándar se pueden utilizar otros, tales como, el aparato realizado en la República Socialista de Checoslovaquia según VESELY, que es amplamente utilizado en la Europa oriental (HARBO y MAUL, 1989) y tiene una construcción muy similar al aparato estándar, pero difiere en cuanto a los detalles (RUTTNER y col., 1976). Por ejemplo, las agujas de inseminación fabricadas en cristal o plástico tienen una forma cilíndrica que facilita la inseminación de reinas muy pequeñas de varias razas, además la aguja puede introducirse en el oviducto mediano sin emplear la sonda vaginal, a través de un tornillo de reglaje introducido por primera vez en 1967 por VESELY. A su vez la jeringa se parece al tipo MACKENSEN-ROBERTS pero se introduce a través de movimientos de atornillar, como en el aparato de LAIDLAW, sin embargo, se diferencia de este último por el hecho de que el sistema de tornillos permite también establecer el ángulo de inclinación de la jeringa (RUTTNER y col., 1976). Un aparato de inseminación fue integrado con un microscopio y un recipiente de suministro de CO₂ en una unidad portátil, con la utilización de jeringas, similares al tipo SCHLEY (A. y C. WINKLER, (1981,1986), citados por Harbo y MAUL (1989)). En Dinamarca HOLM en 1986 desarrolló un aparato inicialmente dibujado por SWIENTY, en el cual los movimientos de los ganchos y de la jeringa eran controlados por micromanipuladores. Además ha sido desarrollado un aparato muy similar al instrumento de NOLAN-MACKENSEN con los micromanipuladores de la reina y de la jeringa son montados en bases separadas para permitir movimientos independientes de cada uno de ellos y algunos de sus componentes son ajustables, lo que impide la posibilidad de ajustes impropios por parte de los operadores inexpertos.

KUHNERT y LAIDLAW (1994) han proporcionado un aparato simplificado para la inseminación instrumental de las reinas; con este aparato no es necesario utilizar los ganchos para mantener la cámara del aguijón abierta y para retraer el aguijón, en cambio, el aguijón es presionado por un par de forceps y empujado para crear una abertura amplia en la cual la jeringa puede ser fácilmente insertada, el esternito es mantenido en su lugar por un pequeño gancho fijado al soporte de la reina. Estos autores inseminaron 10 pares de reinas con el método clásico y con el nuevo y no encontraron diferencias significativas en el número de espermatozoides que llegaron a la espermateca, además el tamaño y el precio del nuevo equipo es más bajo y el procedimiento más rápido.

Actualmente, hay una gran divergencia entre los investigadores en lo que concierne al uso de la inseminación instrumental, algunos son favorables a su práctica otros no. No obstante, si unos están de acuerdo que ésta no pueda sustituir el acoplamiento natural para la producción masiva de reinas para la comercialización, lo que junto con la dificultad inherente a la propia técnica, nos lleva a analizar algunos factores limitantes en la práctica. En cambio, otros como por ejemplo KOENINGER y col. (1995) afirman que en el caso de *Apis mellifera* la inseminación instrumental es, desde hace 40 años, un componente intrínseco del programa de cría. La mayoría de los autores está de acuerdo en que las reinas acopladas naturalmente viven por término medio, más tiempo que las reinas inseminadas instrumentalmente (WOYKE y RUTTNER, 1976; HARBO y SBAZO, 1984; KANOPACKA, 1987) sin embargo, para Woyke y Ruttner (1976) hay una longevidad ligeramente inferior en las reinas inseminadas instrumentalmente. A su vez, diversos autores han estudiado la posible influencia que tendría la inseminación instrumental en la producción de miel, no obstante los resultados no han aportado una respuesta unívoca. ROBERTS (1964) y RUTTNER (1961) (citados por Woyke y Ruttner (1976)) no aprecian diferencias significativas en cuanto a la cantidad y calidad de las crías y a la cosecha de miel. HARBO y SBAZO (1984) han encontrado una mayor producción de cría y de miel en las reinas acopladas naturalmente. Al revés WILNE (1987) obtuvo resultados superiores a estos dos parámetros en las reinas inseminadas instrumentalmente. Otras investigaciones en este sentido: son las hechas por LODESANI y col. (1991), a lo largo de 5 años en dos localidades de la región del Valle del Po (Pianura Padana), evaluando la actividad de las colonias de *Apis mellifera ligustica* sometidas a la inseminación instrumental con las fecundadas de manera natural. Estos autores hicieron controles periódicos para determinar la cantidad de la cría y de abejas adultas y la producción de miel, siguiendo la técnica de inseminación descrita por RUTTNER (1976). En sus resultados constataron que la actividad de las colonias variaba según el año y la localización geográfica y que no eran afectados significativamente por la edad de la reina. Por otra parte, las colonias con reinas inseminadas instrumentalmente a lo largo de la estación activa producían menor cantidad de cría cuando eran comparadas con las fecundadas naturalmente. Pequeñas diferencias fueron

observadas en el número de abejas adultas y no fueron observadas diferencias significativas en relación a la producción de miel. Lo que está de acuerdo con CRANE (1990a), quien afirma que la inseminación instrumental garantiza la identidad de los zánganos que fecundan a la reina, pero en circunstancias normales no produce una mejor fecundación de ésta ni mejor "performance" de la colonia que con el acoplamiento natural. PRABUCKI y col. (1987) inseminaron un total de 1212 reinas, divididas por 3 colmenares, entre 1985-1986 en Polonia. En el primer colmenar las reinas fueron inseminadas una vez (8mm^3 de esperma) o dos veces ($2 \times 4\text{mm}^3$ de esperma) en colmenas trapezoidales con 0,40 litros de obreras. En el segundo colmenar las reinas eran inseminadas una vez y mantenidas en núcleos de fecundación con 0,25 litros de obreras, en el tercer colmenar las reinas eran inseminadas una vez y mantenidas en núcleos de fecundación Kalinowski con pocas obreras ($< 0,20$ litros de obreras), a su vez la edad de las reinas variaba entre 6 a 16 días. Estos autores en sus resultados no obtuvieron diferencias significativas entre las reinas inseminadas una o dos veces. Las reinas inseminadas entre los 6-9 días de edad tardaban entre 10,7-13,5 días en comenzar la puesta, mientras que las que tenían 10-12 días de edad tardaban entre 6,4-8,3 días. Por lo que sugirieron que las reinas deben ser inseminadas con una edad de 10-12 días y que deben ser mantenidas antes y después de la inseminación en colmenas de fecundación con dos cuadros y 0,25 - 0,40 litros de obreras. También ya recomiendan que las reinas deben ser mantenidas con una humedad relativa de 40%, ya que la migración de los espermatozoides en la espermateca está correlacionada negativamente con la humedad relativa (BUYS, 1992).

Es decir, este procedimiento es hoy en día un instrumento que facilita considerablemente el desarrollo de la selección y la genética de abejas y en este punto la mayoría de los autores están de acuerdo. La inseminación instrumental ha permitido el descubrimiento de muchos mutantes que fueron estudiados genéticamente, contribuyendo a la solución de numerosos problemas de genética y fisiología, ha aclarado el origen de diferentes líneas de abejas y a la determinación del sexo e incluso ha permitido progresos en la cría y selección de abejas más resistentes a las enfermedades, agentes polinizadores más eficaces, o mejores abejas pecoreadoras (WOYKE, 1976a).

Así pues, tenemos que tener en cuenta que la inseminación instrumental, utilizada en estudios y mejoras, se ha convertido en una práctica habitual en los programas de mejora y ha contribuido al desarrollo de la producción apícola de muchos países.

II - MATERIAL Y MÉTODOS

1 - CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio fue realizado en la ciudad de Braganza, perteneciente a la provincia de Trás - os - Montes y ubicada en el Nordeste de Portugal, cuyas coordenadas son latitud 41° 49'N, longitud 6° 40'W y se encuentra, aproximadamente, a 720m de altitud sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).

El ensayo se llevó a cabo entre julio de 1995 y mayo de 1997, en dos colmenares experimentales que el Instituto Politécnico de Braganza posee en el área de influencia del Parque Natural de Montesinho.

El primer colmenar llamado Eiras (E), está ubicado en el paraje de las Eiras, y está situado en una zona de matorral en los extrarradios de la ciudad, aproximadamente a 700m de altitud sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Se encuentra a 7 Km de la carretera nacional y cuya UTM es 29T PG 944, 429 (con latitud 41° 54' 46"N y longitud 6° 40'12"W).

El segundo colmenar R (Rebolal) está en la misma latitud que el anterior pero situado a 3Km y, aproximadamente, a 790m de altitud sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).

El Parque Natural de Montesinho, figura 3, con un área aproximada de 75 000 ha, corresponde a la parte norte de los concejos de Braganza y Vinhais y engloba las sierras de Montesinho y Coroa (GONÇALVES, 1980). Su altitud varía entre los 1400m, valor máximo para la sierra de Montesinho y los 483m, su valor mínimo.

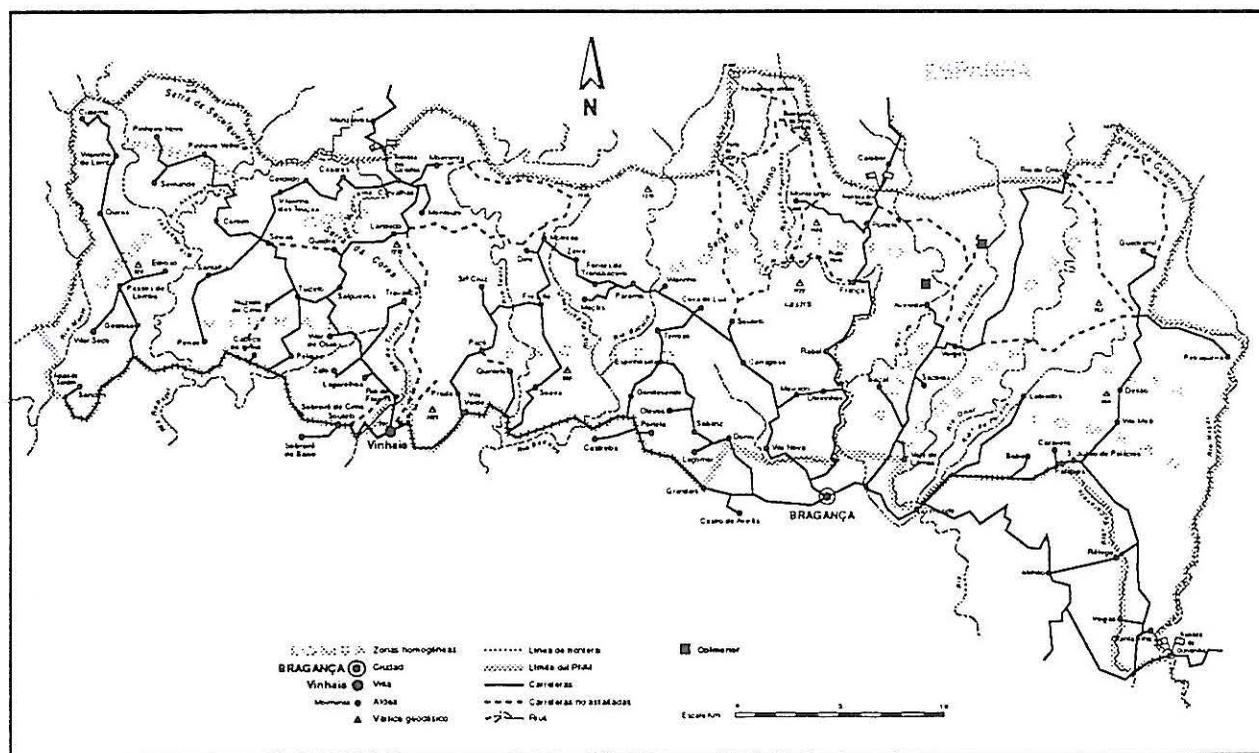


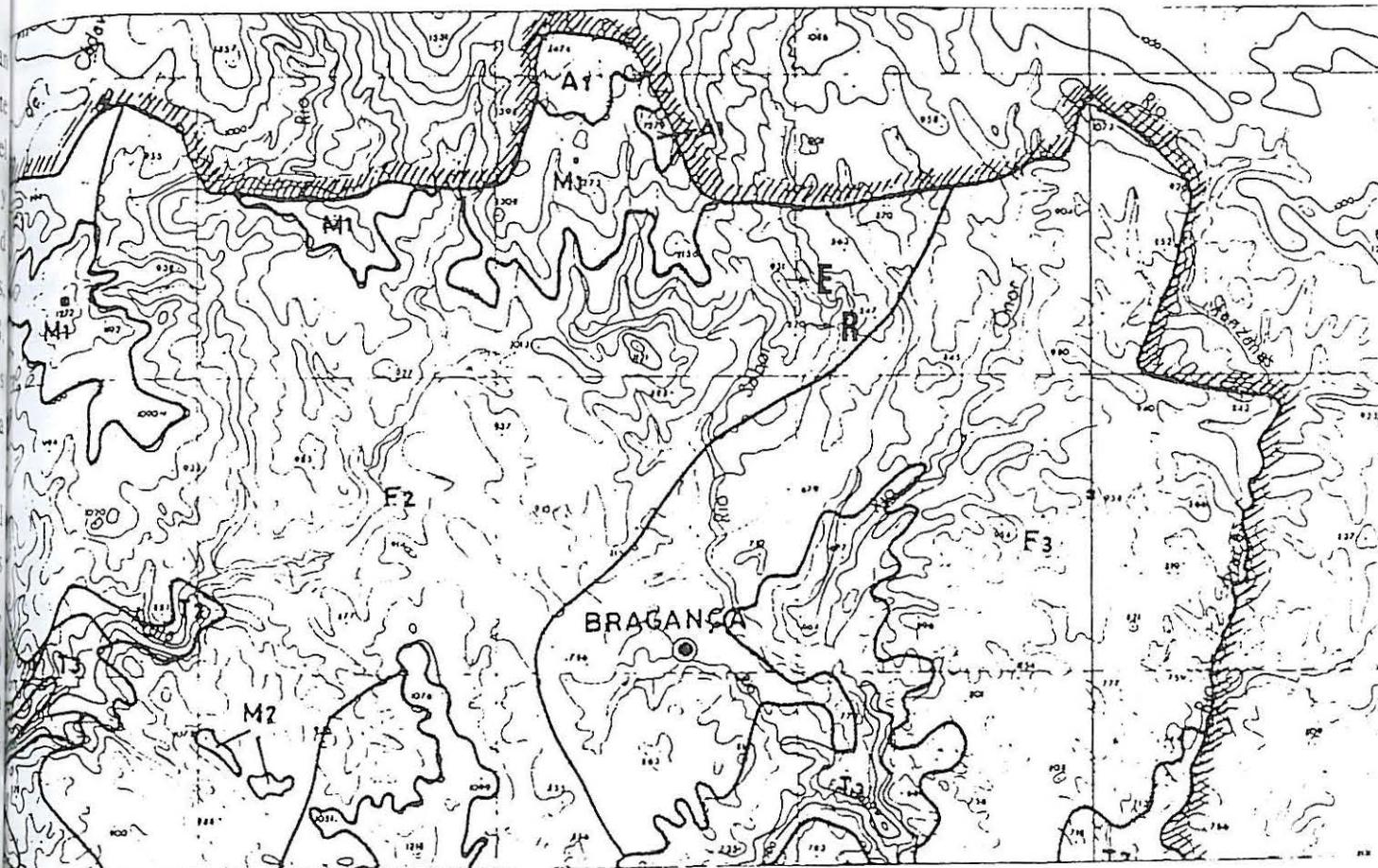
Figura 3 - Parque Natural de Montesinho

1.1 - CLIMA

Del punto de vista climático, es una región, que presenta características que la ubican en una zona de transición de la influencia Atlántica para Continental. Por lo que, el Nordeste Transmontano está ubicado en una zona de clima mediterráneo, sin embargo, con influencia del régimen atlántico, teniendo, además, una importancia fundamental en el régimen climático condicionando la distribución de la precipitación, la fisiografía. Presenta también una propiedad característica de los climas extratropicales, una vez que, por su posición en latitudes templadas tiene un régimen térmico en que la amplitud anual es superior a la diaria (GONÇALVES, 1985b). El mismo autor, en el año de 1991, añadió que se pueden encontrar algunas diferencias regionales en lo que se refiere a la cantidad de precipitación y a la menor o mayor duración de la estación estival, pero que es común la casi inexistente lluvia en el verano.

Es, por consiguiente, posible observar en la figura 4, el clima de la región. El clima pertenece, en buena parte, a la Terra Fría de Planalto (F₁, F₂ y F₃) con precipitaciones superiores a los 1200mm, entre los 1000 - 1200mm/año y entre los 800 y los 1000mm/año respectivamente. Los relieves montañosos están englobados en la Terra Fría de Montaña (M₁) con precipitaciones superiores a los 1200mm y de Alta Montaña (A₁) superiores a los 1400mm y los valles profundos pertenecen a la Terra de Transição (T₁ y T₂) con precipitaciones entre los 800mm y los 1000mm (AGROCONSULTORES y COBA, 1991).

La humedad relativa media anual oscila entre los 60% y los 80% (AGROCONSULTORES y COBA, 1991). A su vez, en la estación invernal, la temperatura media del aire oscila entre los 3 a los 5°C (en el mes más frío) y en la estación estival entre los 20 y los 21°C (en el mes más caliente) y los días de nieve varían entre los 40 a 50 en las zonas de mayor altitud y de 10 a 20 en las restantes zonas (GONÇALVES, 1980).



Leyenda:

Terra Fria de Alta Montaña

A1 —>1200 mm

Terra Fria de Planalto

F1 —>1200 mm

F2 — 1000- 1200 mm

F3 — 800-1000 mm

F4 — 600-800 mm

F5 — < 600 mm

Terra Fria de Montanha

M1 —> 1200 mm

M2 — 1000-1200 mm

Terra de Transição

T1 —> 1200 mm

T2 — 1000-1200 mm

T3 — 800-1000 mm

T2 — 600-800 mm

T2 — < 600 mm

Figura 4 - Mapa de las zonas climáticas homogéneas de la región (AGROCONSULTORES y COBA, 1991)

1.2 - EDAFOLOGIA

Relativamente a la edafología GONÇALVES (1985a) encontró en este área una predominancia de suelos incipientes y argiluvitados (anteriormente denominados por suelos mediterráneos) poco saturados que se caracterizan por una agregación que determina una buena permeabilidad interna, íntimamente relacionada con el grado de resistencia a los fenómenos de erosión. Los datos de AGROCONSULTORES y COBA (1991), sobre la Carta de Suelos del Nordeste Transmontano, revelan sobre todo que, la unidad pedológica más representativa de la región de Braganza son los leptosuelos, siguiéndose con una representación mucho menor, los cambisuelos y todas las otras unidades (luvisuelos, alisuelos y fluvisuelos).

1.3 - FLORA Y VEGETACIÓN

En lo que respecta a los aspectos generales de la vegetación de la región y del Parque Natural de Montesinho, las principales especies arbóreas están representadas por *Quercus pyrenaica*, *Castanea sativa* y *Quercus rotundifolia* (DINIS y RIBEIRO, 1988; CASTRO y col., 1989). Las especies vegetales representativas de las áreas de matorrales son, entre otras, los brezos (*Calluna vulgaris* y *Erica* spp.), la carquesia (*Chamaespartium tridentatum*), el jaguarzo blanco (*Halimium alyssoides*), los rosales silvestres (*Rosa canina*, *Rosa micrantha*). Así como, el tojo (*Ulex* spp.), las jaras ^{estepares} (*Cistus* spp.), la lavanda (*Lavandula pedunculata*), el tomillo (*Thymus mastichina*), la jara pringosa (*Cistus ladanifer*) y la jara estepa (*Cistus salvifolius*) (AGROCONSULTORES y COBA, 1988).

Posteriormente, AGUIAR (1993) (citado por ROCHA, 1996) sugirió que la sucesión ecológica regresiva en las series de vegetación climatófilas de la región puede resumirse, figura 5, en general, por los bosques de tipo forestal que son dominados por *Quercus pyrenaica*, acompañado por especies como *Genista falcata*, *Arenaria montana*, *Brachypodium sylvaticum* y *Viola riviniana*. Ya, en la orla de estos bosques, en los matorrales pre-forestales (*Genista falcatae* - *Ericetum arborea* a *Cytisus scopario* - *Genistetum polygaliphyllae*), dominados por leguminosas como el *Cytisus scoparius*, la *Genista falcata* y la *Genista florida* subsp. *polygaliphylla* a las que se juntan en algunas situaciones la *Erica arborea* y el *Pteridium aquilinum*. En otra etapa regresiva subsecuente de la sucesión, aparecen entonces, las comunidades herbáceas perennes que son dominadas por las gramíneas (*Agrotis castellana*). Al final, surgen las comunidades de plantas anuales que son muy diversificadas y contienen especies como *Helianthemetea guttati*, *Xolantha guttata*, *Ornithopus compressus*, *Anthyllis lotoides*, *Trifolium campestre*, *Leontodon saxatilis* subsp. *hispidus* y *Tolpis barbata*.

SUCESIÓN ecológica regresiva de las series climatófila y edafoxerófila

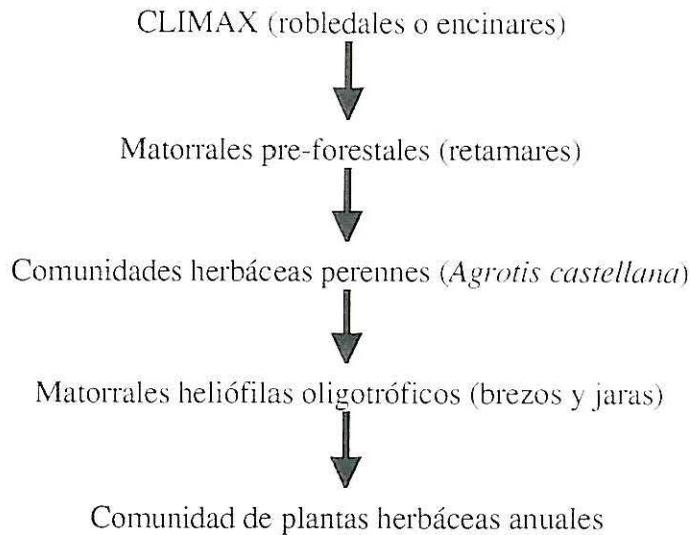


Figura 5 - Sucesión ecológica regresiva propuesta por AGUIAR (1993), adaptada de ROCHA (1996).

En el área de estudio, la vegetación más característica, figura 6 y 7, son los matorrales de brezos, que tienen como ejemplares dominantes, entre otros, la *Erica umbellata* y la *Erica australis* y los matorrales de jaras donde predominan las jaras, como por ejemplo, el *Cistus ladanifer*, la lavanda (*Lavandula stoechas*) y el tomillo (*Thymus mastichina*).



Figura 6 - Vista general de los matorrales de brezos y jaras



Figura 7 - Aspecto particular de los matorrales del área de estudio

2 - LAS ABEJAS DE ESTUDIO

Se trabajó con colonias de abejas de la raza geográfica *Apis mellifera iberica*, según la clasificación atribuida y aceptada por varios autores, como por ejemplo, RUTTNER (1973, 1975), SANTIAGO y col. (1986), MURILHAS y GRAÇA (1992). RUTTNER (1988a) recordó que aunque esta clasificación (nombre) haya sido atribuida por GOETZE en el año de 1964, desde entonces hasta ahora no ha sido debidamente descrita. Sin embargo, en los últimos años, algunos trabajos han sido realizados con el propósito de aclarar la posición taxonómica de esta raza. Uno de éstos es el que hicieron MURILHAS y GRAÇA (1992), quienes estudiaron la identificación de la subespecie de abeja tradicionalmente utilizada en el Sur de Portugal. Utilizaron como tratamiento estadístico un análisis multivariante sobre 25 caracteres investigados y encontraron tres hipótesis aparentemente plausibles para entender correctamente la verdadera naturaleza de nuestras abejas locales. Teniendo en cuenta que la *Apis mellifera iberica* es en realidad una subespecie de *Apis mellifera* entonces, las abejas locales manifiestan alguna hibridación entre *Apis mellifera mellifera* y *Apis mellifera iberica*; en la segunda hipótesis propusieron que las abejas locales manifiestan algún grado de modelación ambiental, cuando se considera que *Apis mellifera iberica* no es una subespecie distinta de *Apis mellifera mellifera*. Otra explicación posible puede estar relacionada con el hecho de que éstas

pertenezcan a una zona de hibridación específica, entre líneas de abejas africanas o de la europa occidental.

Desde el punto de vista de los apicultores hablamos de una abeja llamada en general abeja negra o abeja local que, de acuerdo con el trabajo de FERT (1996a), se trata de la abeja *Apis mellifera mellifera*. Por lo que, haremos referencia a las formas locales de abejas *Apis mellifera* L., puesto que nos encontramos sin datos objetivos.

3 - COLMENARES DE ESTUDIO

En la tabla nº 7 se expone la relación de colmenares que han sido estudiados, localización, resumen de manejo, muestras destinadas para estudios de selección de estirpes con buena capacidad limpiadora y el número de colmenas utilizadas en la cuantificación de la Ascosferiosis.

Tabla nº 7 - Relación de colmenares que han sido estudiados

LOCALIZACIÓN DEL COLMENAR	DENOMINACIÓN DEL COLMENAR	ZONAS DE ORIGEN	RÉGIMEN DE MANEJO	Nº DE COLMENAS UTILIZADAS EN ANÁLISIS		
				TEST DE LIMPIEZA	CUANTIFICACIÓN DE LA ASCOSFERIOSIS	
Alrededores Braganza ciudad	Eiras	Autóctonos	Fijista	20	20	-
Alrededores Braganza ciudad	Rebolai	Autóctonos Recogidos en los alrededores de la ciudad	Fijista	-	-	43

En cada colmenar se realizó un muestreo totalmente aleatorio y se tomaron como mínimo 20 colmenas en el colmenar E y 43 colmenas en el colmenar R, aunque en algunos casos las muestras se vieron reducidas por varias circunstancias, tales como, muerte durante el transporte o presentación de síntomas patológicos.

En el colmenar E se ha trabajado con 20 colmenas, todas ellas eran de modelo Lusitana, de diseño nacional, como se puede observar en la figura 8, 9 y 10.



Figura 8 - Vista general del colmenar Eiras



Figura 9 - Colmena Lusitana



Figura 10 - Cuadro de la colmena Lusitana

Los cuadros tienen como dimensiones externas 300mm de altura y 360mm de largo (ROSÁRIO NUNES, 1980) y como dimensiones internas 275mm de altura y 340mm de largo, con un área interna total de 93,5dm² (PAIXÃO, 1974). Caracteres destacados de éstas son el hecho de que solamente llevan medias alzas. Dichas colmenas tenían cría operculada, una población agrupada entre 2-4 alzas y un cuerpo de cámara de cría. Su origen es simple, una vez que fue formado por enjambres autóctonos ya existentes en el colmenar. A su vez, el manejo es estable, pues, no hacen transhumancia.

El origen del colmenar Rebolal es doble: se formó con colmenas compradas a apicultores en las cercanías de la ciudad de Braganza, que tenían en común la presencia del hongo *Ascosphaera apis* y enjambres ya existentes en el apiario. Se trabajó en plena producción con 43 colmenas tipo Langstroth, con alzas en el período que antecede a la cresta (figura 11).



Figura 11 - Vista general del colmenar Rebolal

Se hicieron cuatro lotes homogéneos (I, II, III y IV) con porcentajes de infestación alto, medio y bajo en todos los grupos. Se tomaron diez colmenas como testigo.

En ambos colmenares experimentales se numeraron las colmenas y los cuadros con números latinos, mientras que los lotes los identificamos con números romanos y las reinas las marcamos con el color del año.

La razón por la cual nos decidimos por estos colmenares fue porque el Parque Natural de Montesinho los llevaba controlando desde hacía varios años y afirmaba que no habían realizado trashumancia. Además, esta es una zona de gran atracción melífera, por la variedad de flora que presenta el matorral y una zona rica en enjambres naturales, y de algunos colmenares tradicionales donde todavía las abejas se mantienen en colmenas fijistas, de corcho, donde no es posible ninguna manipulación de panales y su multiplicación se realiza exclusivamente por enjambrazón.

3.1 - MATERIAL EMPLEADO EN LA CRÍA DE REINAS

Para la realización de la cría de reinas se utilizó el siguiente material:

- colmenas madres, de las que se obtienen las larvas para la cría real,
- colmenas iniciadoras, incubadoras o nodrizas; en ellas se llevó a cabo la primera fase de la cría,

- colmenas criadoras, finalizadoras o de acabado; en ellas se llevó a cabo la segunda fase de la cría,
- núcleos de fecundación o "baby" núcleos, se trata de pequeñas colmenas de fecundación,
- pinza profesional para extraer larvas; pequeño utensilio para efectuar el traslado de las larvas desde su celdilla natural a las cúpulas de cera,
- calibrador, se trata de un molde de goma que nos permitió la fabricación de las cúpulas de cera, donde se alojaron las larvas, pero también empleamos las cúpulas de material plástico,
- barritas porta-cúpulas, pequeñas tablitas de madera, donde se fijaron en una de sus caras, los soportes en plástico de las cúpulas y sobre éstos, se insertaron las cúpulas de plástico sobre las cuales se fijaron las cúpulas de cera,
- marcos y bastidores para la colocación de las barritas porta-cúpulas, obteniéndose así el cuadro portacúpulas,
- marcadores de reinas cilíndricos. Se trata de discos en colores (blanco, rojo, azul, amarillo y verde) de material plástico, numerados de 1 a 99.

3.2 - MATERIAL UTILIZADO EN LA INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL

Para el desarrollo de la metodología de la inseminación instrumental se utilizó un aparato de inseminación tipo estándar, según SCHLEY, como se puede observar en la figura 12, 13 y 14, que se compone de los siguientes elementos tipificados fundamentales:

- soporte con placa base y dos columnas de soporte,
- bloque de la reina con conducto de gas y soporte para la reina,
- gancho dorsal perforado y gancho ventral, fijos en las columnas del soporte, con libertad de movimientos en todas las direcciones,
- bloque de la jeringa, para fijar y dirigir mecánicamente la jeringa,
- jeringa con pistón de SCHLEY, que puede ser fácilmente retirada para esterilización en autoclave, y puntas de vidrio (capilares de cristal) reemplazables,
- fuente de gas carbónico, una botella industrial con una válvula reductora con manómetro, y con conductos hacia el bloque de la reina y el recipiente de narcosis. Para el control del reglaje preciso del flujo de gas se interpone un balón lleno de agua.

Además, se emplearon también los siguientes accesorios:

- una lupa binocular con una ampliación de 7 a 20 aumentos, la cual tiene un brazo flexible y giratorio, con una altura de trabajo de 100mm e iluminación incorporada,
- tubos capilares, para la conservación del esperma,
- marcadores de colores diferentes, para identificar la edad de los zánganos,
- caja de vuelo Andersen, para el transporte de los machos y recolección del esperma,
- jaulas pequeñas, para el transporte de las reinas con 5-10 acompañantes.



Figura 12 - Vista general del aparato de inseminación



Figura 13 - Aspecto del bloque de la reina y de los ganchos

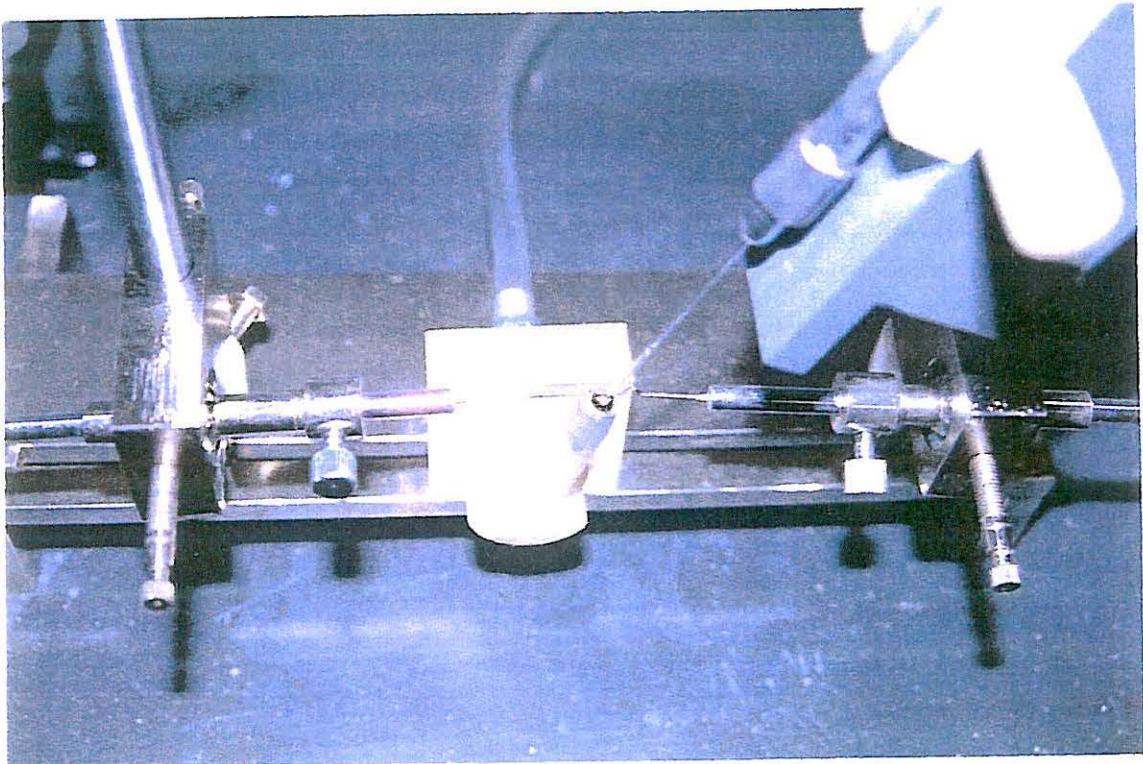


Figura 14 - Aspecto de la jeringa e introducción del semen

3.3 - MATERIAL EMPLEADO EN LA INTRODUCCIÓN DE REINAS (ENJAULADO)

Para la realización de la técnica de introducción se emplearon unas jaulas de plástico, blancas, pequeñas y rectangulares similares a las jaulas de introducción de MILLER, aunque diferían de éstas una vez que sólo tienen un orificio de entrada, como se puede observar en la figura 10.



Figura 15 - Tipo de jaula empleada en la introducción de reinas

4 - TOMA DE MUESTRAS PARA LOS ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO

Se trabajó con 20 colmenas de experimentación del colmenar E, en agosto de 1995, donde se realizaron dos tipos de test. La zona de cría fue dibujada en papel de acetato.

Todas las operaciones ejecutadas fueron anotadas en fichas para un control individual de cada colmena.

4.1 - TEST DE CONGELACIÓN DE LA CRÍA

En el primer test (Test 1), se cortó un trozo de panal de cría de 10x10 cm de cada colmena (aproximadamente 150 celdillas) y se llevó al laboratorio donde se congelaron las

muestras durante 48 horas, según la técnica descrita por NEWTON y col. (1975), en bolsas de plástico cerradas herméticamente y rotuladas con el lugar de origen y fecha de admisión. Se abrió una ficha de cada colmena y se anotaron los datos conocidos (origen de la colmena, localización, productividad, mansedumbre, observaciones particulares).

Las muestras se mantuvieron a -20°C y, posteriormente, a temperatura ambiente durante 12 horas como describió en su técnica CARDENAL GALVÁN y col. (1988). A continuación el trozo se insertó en el espacio vacío, se marcó el listón superior del cuadro, siendo colocado de nuevo en la colmena.

Los cuadros seleccionados para los dos test, eran cuadros de cría típicos con reservas en los extremos de polen y miel, y con un área de cría que comprendía aproximadamente dos tercios ($2/3$) de cría de obreras operculadas y un tercio ($1/3$) de cría abierta en todos los estadios. Se eligieron celdillas de cría en la fase de operculación conteniendo prepupas y pupas jóvenes, siendo la edad determinada de una forma aproximada por la observación de la forma del cuerpo y del color de los ojos.

4.2 - TEST DE MUERTE DE LA CRÍA POR PUNCIÓN

Simultáneamente se ejecutó el segundo test (Test 2) que consistió en el sacrificio de 21 crías por punción, como describieron entre otros, NEWTON y OSTASIEWSKI (1986) y CARDENAL GALVÁN y col. (1988). Para lo cual, se mató, mediante punción con alambre fino, tres lotes de 7 crías operculadas situadas en otras tantas zonas del cuadro. Para una mejor identificación se utilizaron chinchetas de colores colocadas dos celdillas encima de aquellas.

En ambos test, nos interesaba la rapidez con que las nodrizas iniciaban el desoperculado de las celdillas y la rapidez con que extraían las crías. Por lo que, anotamos y controlamos, en los dos test, a las 24h., 48h., y a los 5 días, la proporción de cría desoperculada y extraída en ambos lados de cada cuadro y cada colmena. El porcentaje de celdillas desoperculadas fue calculado por el cociente del número de celdillas desoperculadas en el cuadro por el número total de celdillas operculadas que se quedaban en cada una de las observaciones. El porcentaje de la cría muerta que fue extraída en cada observación, fue calculada por el cociente del número de celdillas vacías en cada observación por el número total de celdillas operculadas inicialmente. En el test de muerte por congelación, hay que destacar que para calcular el número total de celdillas operculadas inicialmente tuvo que restarse, el número total de celdillas inicialmente vacías, una vez que, algunas de las muestras no tenían al inicio (cuando se cortó el trozo de panal) la totalidad de las celdillas operculadas, en ambos lados del cuadro.

Consideramos que una colonia es higiénica, para ambos test, cuando limpia la cría muerta hasta las 48 horas. Las colonias que tardan más de 48 horas, o sea hasta los 5 días no son consideradas higiénicas.

La metodología seguida tuvo presente la característica del hongo de presentarse en ambas fases sexuales.

Se trabajó fundamentalmente con colmenas no afectadas de micosis clínica (colonias sanas) y todas las variables ambientales y microambientales fueron tenidas en cuenta.

4.3 - MUESTREO PARA LA CRÍA DE REINAS

El muestreo para la cría de reinas fue realizado entre el 15 de mayo y el 13 de junio de 1996.

El sistema de cría utilizado obedece al método del translarve o Doolittle. No obstante, se introdujo una serie de variantes con respecto a él, que describiremos posteriormente. Con ello lo que se pretende es promover un sistema de cría que mejor se adapte a los ecotipos de abejas locales integradas en una zona de condicionalismos ambientales y climáticos propios y de esta forma también simplificar el trabajo de cría, que incluye las operaciones que a continuación describimos.

Para empezar, escogemos aquellas reinas de las colonias que limpian la cría muerta en el menor tiempo, por lo que, se realizó la selección de las colmenas madre en base a su comportamiento higiénico y, si era posible, a sus cualidades de mansedumbre, productividad y poco instinto de enjambrazón; así como en las que servirán para formar las colmenas inicializadoras y de acabado, para lo que se tuvo en cuenta además de su comportamiento de limpieza, el grado de desarrollo de los enjambres.

A su vez, para favorecer la aceptación de las cúpulas artificiales que servirían de base para la cría real, se introdujeron éstas durante 24 horas en el interior de una colmena fuerte. El número de cúpulas a colocar por colmena iniciadora fue de 24, distribuidas en dos listones de 12 cúpulas cada una, lo que está de acuerdo con RUTTNER (1988b) que recomienda una cifra de 20 a 25 como máximo de cúpulas a colocar simultáneamente por colmena iniciadora. El cuadro portacúpulas contiene alimentador incorporado (fabricado manualmente, por nosotros), como se puede observar en la figura 16.

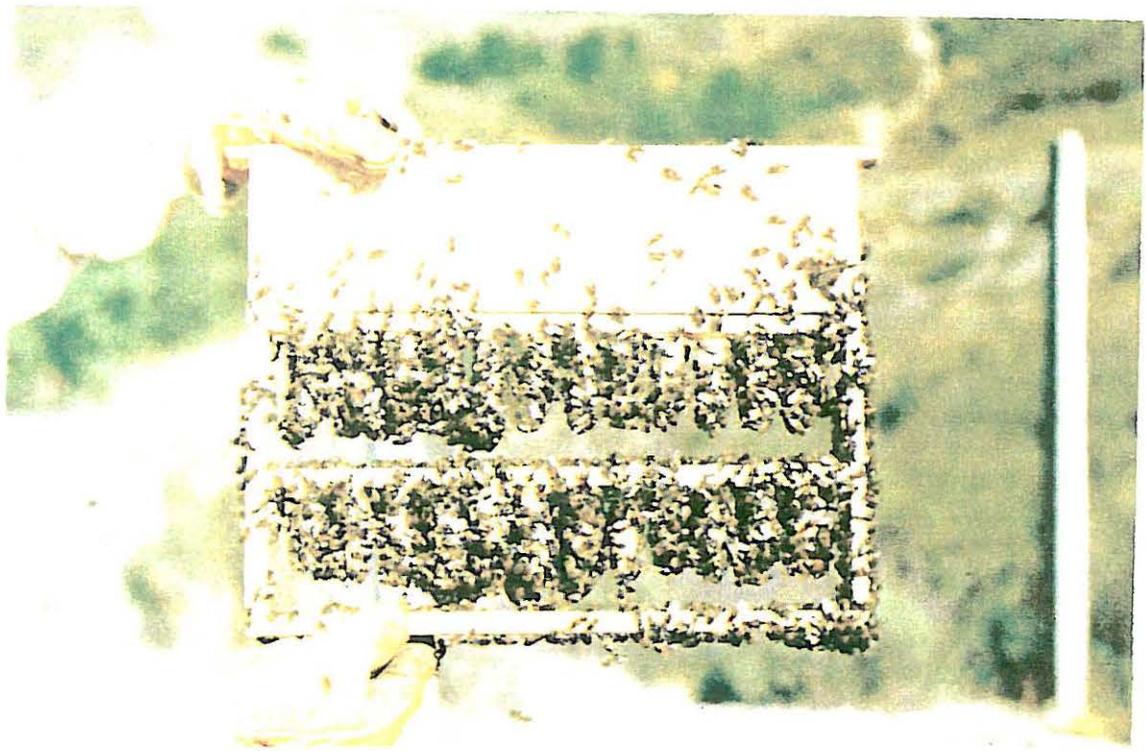


Figura 16 - Cuadro portacúpulas con alimentador incorporado

A continuación se formaron las colmenas incubadoras (se utilizaron cuatro) y finalizadoras. Las incubadoras se preparaban aproximadamente 8 a 10 días antes, colocando en su interior uno a dos cuadros con polen, otros con pollo operculado, un alimentador superior con un litro de jarabe (50% de agua, 50% de miel) y de 1 a 1,5 kg de abejas nodrizas. La preparación de las colmenas finalizadoras (se utilizaron cuatro) lo mismo que se ha descrito anteriormente, pero estas colmenas tenían reina, dos nidos de cría (un cajón inferior y otro superior), el excluidor de reinas y, dos alzas. Estas colmenas tienen que ser fuertes, llenas de abejas y con excelentes provisiones de miel y polen. En el centro del nido de cría superior se transportaron dos panales de cría abierta, dos panales de cría operculada, extraídos del nido inferior y recubiertos por abejas adultas.

En el día del translarve, las colmenas iniciadoras se dejaron huérfanas 10 horas antes de la introducción de las cúpulas, de acuerdo con el método de ALLEY, descrito por MORSE (1994). Sin embargo, RUTTNER y RUTTNER (1983) recomiendan un período de orfandad de 3 a 5 horas y GUTH (1990) utilizó un período de 1 a 2 horas. Las colmenas se hicieron huérfanas con el objetivo de aumentar el grado de aceptación larvar y además, se retiraron todos los cuadros con pollo, como describió GUTH (1990a), que eran introducidos en las colonias de acabado. La razón por la cual nos decidimos por este periodo de orfandad y por la retirada de todos los cuadros con cría, fue debido al mayor grado de aceptación larvar que fue observado de esta forma en el desarrollo de otros experimentos.

A primera hora de la jornada de trabajo, se realizó el translarve, que consistió en coger, con la ayuda de una pinza profesional, una larva apenas visible (12 a 36 horas), según lo recomendado por RUTTNER (1987), del interior de su celda natural y transferirla a la cúpula artificial. El cuadro portacúpulas fue colocado en el centro del nido de cría, entre un cuadro de miel desoperculado y otro con polen; los restantes cuadros tenían miel desoperculada y polen. Nuestra variante fue adaptada del método de GUTH (1990a), aunque este autor haya empleado 48 cúpulas (2 cuadros con 24 cúpulas) y se afirman que generalmente la aceptación no es inferior a 45 realeras, realizando dos series con un intervalo de 24 horas.

Realizamos 4 series, todas en colmenas diferentes, las dos primeras con un intervalo de 24 horas (30 y 31 de mayo) y las últimas cuatro días después (4 de junio). La razón por la cual no realizamos el translarve simultáneo para las 4 series en el mismo día fue debido al hecho de que solamente teníamos 40 núcleos de fecundación además de otros factores, tales como, las condiciones climáticas y la propia distancia del colmenar.

El día siguiente (24 horas, después) se retiraron los cuadros portacúpulas de las colmenas incubadoras, momento en que se procedió al control de aceptación, y se introdujeron en la colmena de acabado, donde las realeras permanecieron durante 5 a 6 días.

Después de su permanencia en la colmena de acabado, las celdas se trasladaron a los núcleos de fecundación, que fueron preparados 5 a 6 horas antes, con un volumen aproximado de 400 ml de abejas nodrizas y alimento ("candi" en forma de pasta). Así, una vez en el colmenar de fecundación, se procedió a colocar una celda en cada núcleo de fecundación, injertándola en un lateral de la parte superior de uno de los cuadros centrales, los cuales fueron colocados aproximadamente, a 5Km del colmenar E.

Por lo que, el nacimiento y la posterior iniciación de la puesta, una vez fecundadas las jóvenes reinas, por acoplamiento natural o inseminación instrumental, tuvo lugar en pequeños núcleos "baby-núcleos", que pueden ser observados en la figura 17.

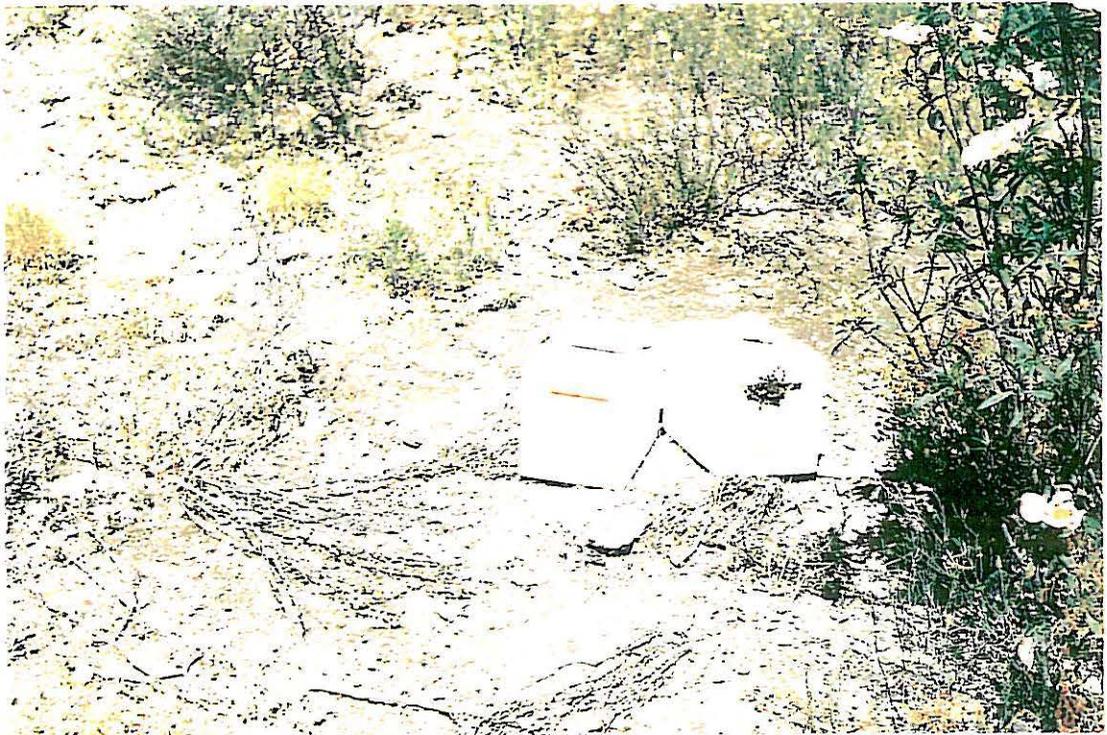


Figura 17 - "Baby-núcleos" utilizados para el nacimiento y posterior iniciación de la puesta de las jóvenes reinas

El control de la eclosión fue efectuado 12 a 14 días después de realizado el translarve y, al mismo tiempo, también se marcaron las reinas destinadas al acoplamiento natural. Para lo

cual, se empleó el disco de color blanco, con el respectivo número, de acuerdo con el código internacional de colores, que fue fijado sobre el tórax de cada reina. Aproximadamente 7 días después, algunas reinas hicieron su vuelo nupcial y una semana después se hizo el control de la iniciación de la puesta.

4.4 - PREPARACIÓN DE LAS REINAS PARA LA INSEMINACIÓN

Las reinas destinadas para la inseminación fueron mantenidas en libertad en los "baby-núcleos" o núcleos de fecundación, desde la eclosión hasta el quinto o sexto día de vida. Para evitar el vuelo no controlado de estas reinas se instaló, delante de la piquera, un excluidor, cuyos separadores eran de plástico.

En el día de la inseminación, las reinas fueron transportadas por la mañana desde el colmenar de fecundación hasta el laboratorio, en una jaula pequeña con 5 a 10 acompañantes y el respectivo alimentador con "candi" en pasta. La distancia aproximada fue de 20Km.

4.5 - PREPARACIÓN DE LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE LOS ZÁNGANOS PARA LA INSEMINACIÓN

Para la producción de los zánganos se partió de colonias selectas, conocidas por su excelente capacidad limpiadora y su rendimiento como criadoras. Algunos días antes de la eclosión, los panales con crías de zánganos eran marcados con alfileres, con el objeto de controlar su eclosión, para conocer la edad mínima de los zánganos presentes y, durante 2 a 3 días, a lo largo de la eclosión, los individuos recién nacidos fueron marcados con tinta de colores diferentes. Esto se realizó a primeros de junio de 1996.

Al cabo de algunos días (10 a 12 días), los zánganos eran llevados de las colmenas al laboratorio de Fisiología y Reproducción de la Escuela Superior Agraria (Instituto Politécnico de Braganza), en una caja de vuelo tipo Andersen, descrita por DUSTMANN y col. (1991). La caja fue construida manualmente, de madera con una parte de red de alambre, un alimentador y una jaula para separar los zánganos de las eventuales obreras agregadas para su cuidado (en número por lo menos igual al de los machos), como se puede observar en la figura 18. Los zánganos fueron capturados en la piquera cuando regresaban del campo.



Figura 18 - Caja de vuelo tipo Andersen, para el transporte de los machos y recolección del esperma

4.6 - PREPARACIÓN DE LA INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL

Se siguió la técnica de inseminación de SCHLEY, descrita por SCHLEY y GUTH (1990) y DUSTMANN y col. (1991).

La recolección del esperma se realizó a mediados de junio, mediante recogida artificial, prensando el abdomen de cada zángano, y éste fue conservado en tubos capilares a temperatura ambiente de 21°C, como describieron HARBO y WILLIAMS (1987), HARBO (1989) y GUTH (1990b). Se utilizó como diluyente la solución salina fisiológica de Hyes (una vez que es más sencilla su elaboración y que fue comprobada su eficacia) de acuerdo con varios autores, RUTTNER y TRYASKO (1976), MORITZ (1989), KUHNERT (1990) y DUSTMANN y col (1991). En la tabla nº 8 se describe la composición de la solución fisiológica de Hyes.

Componentes	Cantidad (Gramos)
Cloruro de sodio	9,0
Cloruro de calcio	0,2
Cloruro de potasio	0,2
Hidrocarbonato de sodio	0,2
Diluyendo en 1000ml de agua destilada	

TABLA nº 8 - Composición de la solución fisiológica de Hyes (RUTTNER y TRYASKO, 1976).

Las inseminaciones se efectuaron a finales del mismo mes. Para las cuales respetamos los siguientes pasos: toma del esperma en la jeringa, instalación y narcosis de la reina e inseminación.

Se efectuaron dos tratamientos con dióxido de carbono, uno 24 horas antes de la inseminación durante un periodo de 10 minutos, como describen MORITZ (1989), SCHLEY y GUTH (1990b). Al día siguiente se efectuó el segundo tratamiento para proceder a la inseminación (inseminación reina =10 minutos). Las reinas fueron inseminadas con 6-8mm³ de esperma. A continuación, eran marcadas con el disco de color blanco cuando se encontraban todavía en estado de narcosis.

4.7 - MANTENIMIENTO DE LAS REINAS DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN

Las reinas inseminadas fueron introducidas en las jaulas para posterior transporte hasta el colmenar de fecundación, donde se dejaron libres en los respectivos "baby-núcleos". El excludor se sacó de la piquera sólo después de haber comprobado el comienzo de la puesta.

4.8 - TÉCNICA DE INTRODUCCIÓN DE LAS REINAS

Se siguió la técnica de las jaulas de introducción, según MILLER descrito por LAIDLAW (1979) y RUTTNER (1987).

El día anterior a la realización del repoblamiento se dejaron huérfanas 33 colmenas del apiario del Rebolal. A su vez, las jóvenes reinas, ya marcadas, se transportaban del colmenar de fecundación en las jaulas de introducción tipo MILLER. Éstas se introdujeron, sobre un panal, en la zona de la cría a punto de nacer. El principio básico de esta técnica de introducción tiene como objetivo estimular las abejas de la colonia a consumir la solución azucarada del compartimento del "candi", permitiendo de esta forma, su entrada y familiarización con la reina. Al cabo de dos a tres días, la entrada se queda libre y las obreras pueden entrar en el compartimento donde está la reina y ésta, ya aceptada, puede salir. A los pocos días se saca la jaula y la reina y las abejas que nacieron, se mezclan con las demás abejas de las colmenas.

4.9 - MUESTREO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ASCOSFERIOSIS

Se trabajó con 43 colmenas afectadas de micosis clínica del colmenar Rebolal.

Previamente a la introducción de las reinas seleccionadas, lo que ocurrió en la primavera de 1996, se anotó el número de alveolos contaminados (recuento del número total de momias blancas y negras) por panal y por colmena, de acuerdo con la metodología seguida por NELSON y col. (1977), TABER (1986), (1987), TABER y GILLIAM (1988), GILLIAM y col. (1988), lo que denominamos de conteo inicial antes de cambiar las reinas (C.I.A.C.R).

En el verano del mismo año, un mes después de la aceptación de las reinas seleccionadas, se contabilizó la cantidad de momias totales (blancas y negras) presentes en cada uno de los 10 cuadros (fueron contabilizadas ambas las caras de cada cuadro) de cada colmena y lo mismo fue hecho para las colmenas testigo. Este control se realizó al final de 30, 60 y 90 días, aproximadamente, que corresponden respectivamente, a los meses de septiembre, octubre y noviembre y se repitió en la primavera del año siguiente (1997), en los meses de marzo, abril

y mayo. Al primer conteo realizado después de cambiar las reinas de las colmenas enfermas por las reinas seleccionadas, lo que ocurrió en septiembre, le llamamos C.I.D.C.R.

Para calcular el grado de afección de cada colmena se confeccionó la siguiente escala de 1 a 10:

0 (celdillas sin momias), 1 (1-10 momias), 2 (11-20), 3 (21-30), 4 (31-40), 5 (41-50), 6 (51 - 60), 7 (61 - 70), 8 (71 - 80), 9 (81 - 90) y 10 (más de 91).

5 - ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos fueron procesados en un ordenador Macintosh modelo LCIII, con los siguientes programas Statview 4.0 y Super Anova.

Con el sentido de comparar las frecuencias obtenidas de los test de muerte por punción y por congelación, para la determinación del comportamiento higiénico, hemos utilizado un Test χ^2 (SNEDECOR y COCHRAN, 1980). De manera similar hemos aplicado el mismo test, para estimar su significado, sobre los datos del grado de aceptación de las reinas seleccionadas (inseminadas y fecundadas naturalmente) y para los datos relativos a la eficacia del programa de cría.

A su vez, el análisis principal de los resultados fue realizado con la ayuda de un ANOVA (STEEL y TORRIE, 1980) para cada una de las siete variables estudiadas, considerando los factores lote y clase.

El factor lote, con cuatro niveles, corresponde al efecto de la localización de los distintos grupos de colmenas distribuidas por el colmenar. El factor que incluye tres niveles, es la clase y que corresponde al efecto de las colonias testigo, de las colonias con reinas fecundadas naturalmente y colonias con reinas inseminadas instrumentalmente en relación al grado de contaminación en los distintos periodos.

Fueron analizadas siete variables dependientes, cinco de las cuales (D1, D2, D3, D4 y D5), basadas en las diferencias de la cuantificación del grado de contaminación entre los meses, y al largo de los seis meses considerados. La sexta variable (D6) basada en la diferencia del recuento medio (del grado de contaminación) obtenido en la primavera anterior al otoño y la séptima variable (D7) basada en la diferencia del recuento final (recuento de mayo) respecto al inicial (recuento de septiembre).

Las interacción lote x clase fue también testada.

La comparación entre las medias fue realizada según el test de Bonferroni/Dunn (DUNN, 1961).

i por
cala
41 -
los
ción
Test
para
adas
a de
: un
das,
los
s, es
inas
n al
04 y
ses.
del
y la
o al
unn

III - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla nº 9 - Valores del χ^2 y de P hallados entre los test de limpieza (muerte por congelación y punción de la cría operculada)

Test 1/Test 2	χ^2	Valores de P
Colmena 1	—	—
Colmena 2	114,961	0,0001
Colmena 3	—	—
Colmena 4	87,770	0,0001
Colmena 5	46,914	0,0001
Colmena 6	0,113	NS
Colmena 7	17,921	0,0001
Colmena 8	3,150	NS
Colmena 9	30,721	0,0001
Colmena 10	—	—
Colmena 11	24,175	0,0001
Colmena 12	20,275	0,0001
Colmena 13	3,150	NS
Colmena 14	3,150	NS
Colmena 15	46,914	0,0001
Colmena 16	4,711	0,005
Colmena 17	4,253	0,005
Colmena 18	12,500	0,001
Colmena 19	32,062	0,0001
Colmena 20	—	—

NS - No significativo

De estos análisis y según nuestra opinión podemos pensar que la gran variabilidad de respuesta que existe entre las colonias en estudio frente a este comportamiento refleja la heterogeneidad genética y fenotípica que enfrentamos cuando trabajamos con las formas locales de abejas. Esto era de esperar, dado el sistema de manejo común en el apiario, donde la reproducción suele ser totalmente libre y dado el peculiar sistema de acoplamiento inherente a esta especie.

Tras la evaluación de los dos test de limpieza para ver la proporción de cría extraída, a las 24 horas, podemos concluir que el test 2 (punción) es el más eficiente en este tiempo. No obstante, un dato que podría aportarse, acerca de esta evaluación, sería hacer su análisis en la escala del tiempo total necesario para el desoperculado y extracción de la cría muerta en ambos test. Una vez que, cuando los test fueron diseñados las colonias eran evaluadas como higiénicas solamente si la extracción ocurría hasta las 48 horas y no higiénicas si tres o más días eran necesarios para la eliminación de todas las crías sacrificadas por punción y congelación.

Por otra parte, este factor es de gran importancia también, en la medida que nos permite obtener un método de determinar de forma práctica qué colmenas pueden presentar un elevado comportamiento higiénico entre las colmenas de nuestras explotaciones.

Así, en lo que se refiere al tiempo necesario para la extracción completa de todas las celdillas con la cría muerta por punción, estos estudios sugieren que éste, varía entre un día, con remoción completa hasta más de tres, con extracción incompleta. Sin embargo, en la mayoría de los casos hubo un gran porcentaje de desoperculado y extracción en el primer día, Figura. 19 y 20.

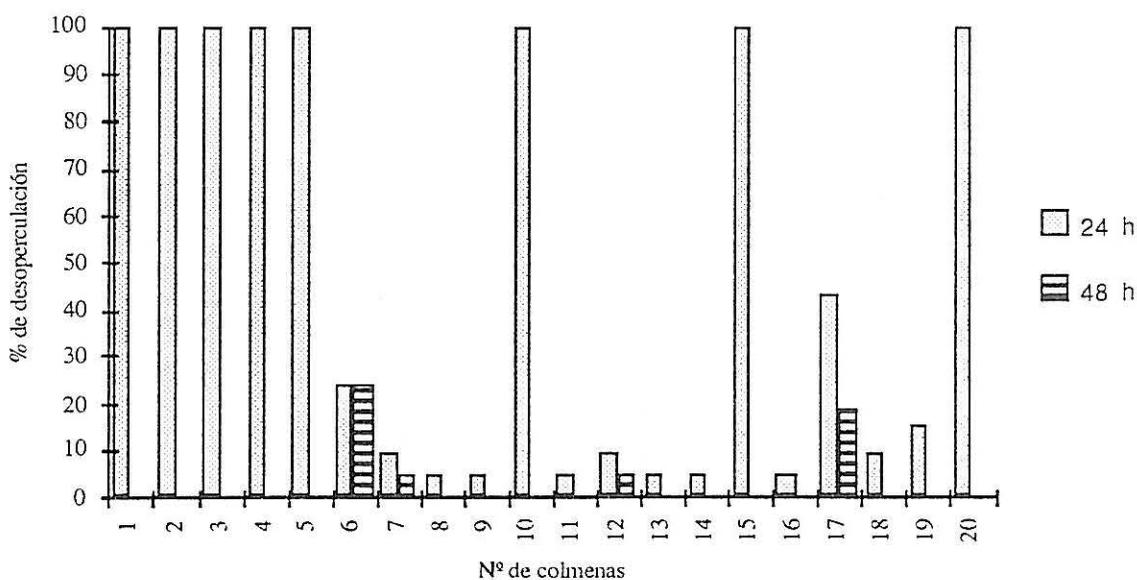


Figura 19 - Porcentaje de desoperculación en el test de muerte por punción

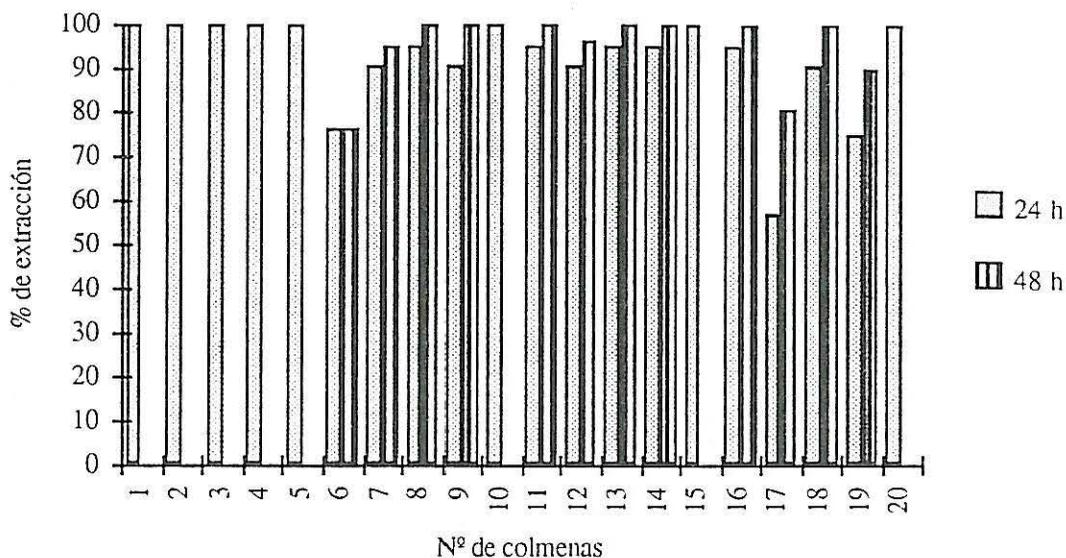


Figura 20 - Porcentaje de extracción en el test de muerte por punción

Si nos referimos a los días necesarios para la completa extracción con la utilización del Test 2 (punción), nuestros resultados son similares a los obtenidos por NEWTON y OSTASIEWSKI (1985), aunque difieren ya que estos autores sólo encuentran un pequeño porcentaje de desoperculado y extracción en el primer día, no haciendo observaciones después de los tres días y además han trabajaban con colonias afectadas con loque americana.

Por otra parte, en nuestros resultados, los valores del porcentaje de desoperculado a las 48 h., varían entre un 4,8 % valor mínimo y un 100% valor máximo, mientras que el porcentaje de extracción de cría muerta a las mismas horas fluctúa entre un 76% y un 100%. A los 5 días, ambos valores son iguales, una vez que, la totalidad de las celdillas se encuentran limpias. Téngase en cuenta que se trabaja con colmenas no enfermas y, por tanto, con buen instinto de limpieza, aunque sea desconocido, en todos los casos, el porcentaje de obreras con genotipo para el desoperculado y/o extracción. Por tanto, nuestros resultados son diferentes de los obtenidos por CARDENAL GALVAN y col. (1988), quienes trabajaron con colmenas afectadas de micosis clínica y encontraron que, el porcentaje de extracción de cría muerta o enferma a las 48 y a las 120 horas presentaba un mínimo de 4,8%, de desoperculado mientras que el máximo era de un 62% a las 48 horas y de un 76% a las 120 horas. Pero, por el contrario son similares en lo que concierne al tiempo total considerado para evaluar el comportamiento higiénico de las obreras.

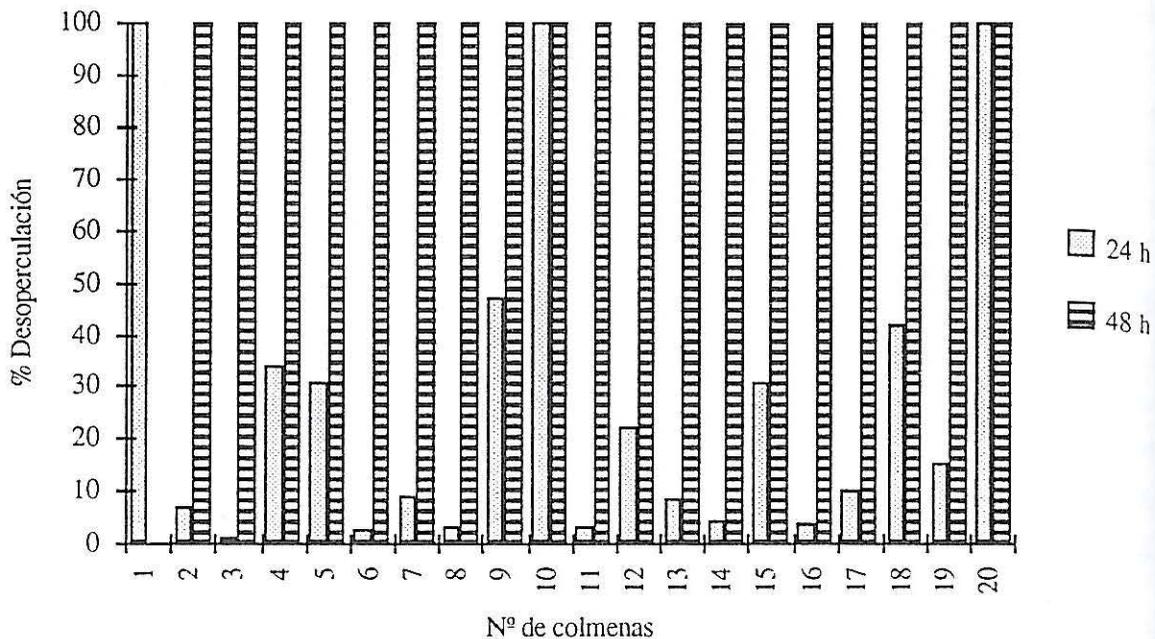


Figura 21 - Porcentaje de desoperculación en el test de muerte por congelación

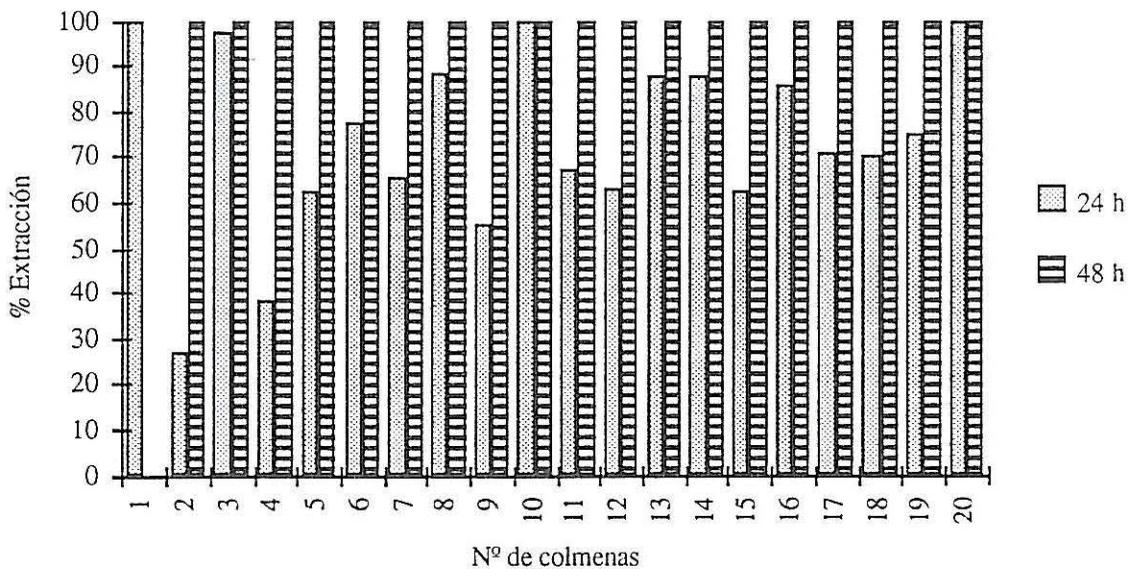


Figura 22 - Porcentaje de extracción en el test de muerte por congelación

Del mismo modo, también se puede observar en las Figuras 21 y 22, la proporción de cría desoperculada y extraída cuando es utilizada la técnica de muerte por congelación. Es interesante resaltar que el tiempo total necesario para la extracción de todas las celdillas, en ambos lados del cuadro, fue mucho menor (48 horas) aunque en la mayoría de los casos hubo

un bajo porcentaje de desoperculado y extracción a las 24 horas, con 1% y 27% de mínima, respectivamente.

Nuestros resultados no concuerdan con los de NEWTON y OSTASIEWSKI (1985), quienes obtuvieron 14 días como el tiempo total necesario para la extracción completa de toda la cría muerta por congelación, ni tampoco, con los obtenidos por NEWTON y col. (1975) quienes observaron que un cuadro con un trozo de cría muerta por congelación era desoperculado y los cuerpos muertos extraídos entre 3 a 6 días en una colonia con buen instinto de limpieza.

Por el contrario, son semejantes a estudios previos donde ya se describen las 48 horas como el tiempo total considerado para la extracción (GONÇALVES y KERR, 1970; MESSAGE y GANÇALVES, 1980; TABER Y GILLIAM, 1988 y SPIVAK y GILLIAM, 1993).

La explicación de porqué encontramos esta diferencia en el tiempo de eliminación de la cría muerta, puede deberse a que, algunas veces, cuando el alfiler perfora el opérculo la prepupa o pupa no muere, y consecuentemente su color es normal y no presenta señales de descomposición.

Todas estas hipótesis pueden ser válidas y por esta razón, es difícil por el momento especificar esta diferenciación de una forma más clara; serán necesarios el realizar más trabajo de investigación sobre el comportamiento general de la abeja, así como sobre el comportamiento higiénico de ésta para una mejor comprensión.

Se refuerza nuestra hipótesis de que, además de la técnica de matar la cría, el tamaño de la muestra considerada, las condiciones ambientales, el tipo de manejo practicado y la propia raza y naturaleza de la colonia son factores de estudio que tendremos que considerar.

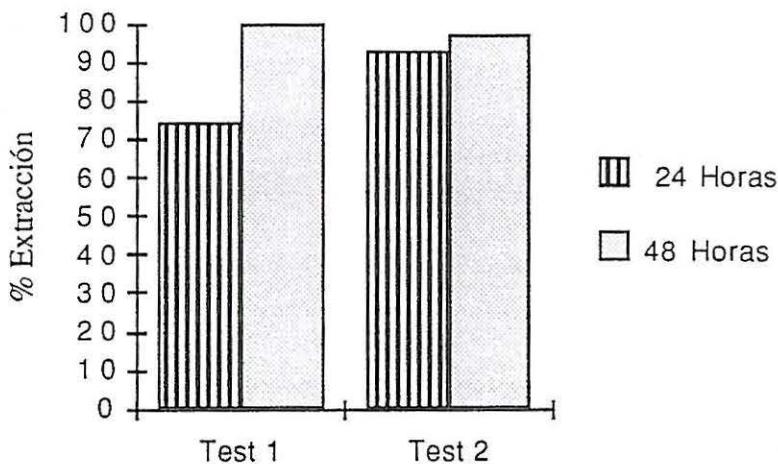


Figura 23 - Porcentaje de cría extraída en ambos test

De la representación gráfica de la Figura 23, podemos deducir cuando comparamos los valores obtenidos por nosotros para el porcentaje de cría extraída a las 48 horas con ambos test (100% para el test 1 y 96,9% para el test 2) con los resultados expresados por otros autores, para otras patologías utilizando los mismos test, que las abejas que pueblan el colmenar de nuestro estudio pueden ser consideradas con un elevado instinto de limpieza. No obstante, queremos hacer hincapié en el reducido tamaño de la muestra, que le confiere más un valor testimonial que la posibilidad de inferir de ella conclusiones válidas para la población apícola de la región.

1.1 - VALORES OBTENIDOS DEL PROGRAMA DE CRÍA DE REINAS

Para obtener las reinas, que fueron objeto de nuestro estudio, podíamos haber seguido varias pautas de acuerdo a los distintos métodos que existen, como por ejemplo:

- Método de MILLER
- Método de H. ALLEY
- Método de G. DOOLITTLE con trasvase de larvas y sus variantes como la técnica del injerto de huevos o la técnica del doble trasvase.

Nosotros empleamos el método de DOOLITTLE por injerto de larvas apenas visibles (12 a 36 horas), lo que está de acuerdo con RUTTNER (1987), una vez que en estudios previos habíamos comprobado que era el sistema de cría que mejor se adaptaba a nuestras condiciones y ecotipos locales. Esta metodología está de acuerdo con varios autores que han trabajado en el mismo sistema de cría, entre otros DRESCHER (1976); LAIDLAW (1979); HARBO (1986); DELAPLANTE y HARBO (1988); JEAN-PROST (1989); GUTH (1990); SANTANA y col. (1993).

Respecto a los valores obtenidos del programa de cría, tabla nº 10, se observó que el porcentaje de aceptación en las colmenas incubadoras, al igual que el de nacimientos, fue aumentando y alternando según transcurría la experiencia, alcanzándose las cifras máximas de 83,3% y 80,0% en la segunda y cuarta series, respectivamente y las cifras mínimas de 75,0% y 66,6% en la tercera y primera series.

Del mismo modo, el porcentaje de cría total alcanzó el máximo valor 66,6% en la segunda y cuarta series y el valor mínimo 50,0% en la primera y tercera series.

Tabla nº 10 - Relación de valores procedentes del programa de cría

Nº de series	Fechas	Nº de celdillas	Acept. starter	Nacimiento	% Acept. colm. incu.	% Acept. crías	% Cría total
1	30/5/96	24	18	12	75,00	66,66	50,00
2	31/5/96	24	20	16	83,33	80,00	66,66
3	4/6/96	24	18	12	75,00	66,66	50,00
4	4/6/96	24	20	16	83,33	80,00	66,66

Teniendo en cuenta los resultados observados para el porcentaje de aceptación en las colmenas incubadoras, nacimientos y de cría final, hemos comprobado utilizando el estadístico χ^2 , si las frecuencias observadas concuerdan con la distribución de las frecuencias esperadas en todas las series de cría que realizamos.

Observamos, según la tabla nº 11, que el χ^2 obtenido no es significativo más que en dos de los análisis: % de nacimientos y % de cría total. El resto se encontró homogéneo, al ser χ^2 observado menor que el χ^2 teórico y aceptar la hipótesis de que no hay diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las cuatro series en relación a la proporción de aceptación en las colmenas incubadoras. Hay que tener en cuenta que en esta tabla solamente están representados los valores entre las series uno y dos, una vez que, para las series tres y cuatro los valores son los mismos.

Tabla nº 11 - Valores de χ^2 y respectivo grado de significación aplicados a las frecuencias obtenidas de la aceptación larvar en la colmena iniciadora, nacimientos y cría total, entre series

Serie 1/serie 2	χ^2	Valores de P
% aceptación	1,929	NS
% nacimientos	4,338	0,05
% cría total	5,952	0,05

NS - No significativo

Nuestra opinión al respecto es que esta circunstancia podría ser consecuencia de una adaptación al tipo de sistema de cría utilizado, que se produce en esta especie. No hay que olvidar que hasta ahora ningún método había sido aplicado para la cría de reinas y el método de multiplicación del colmenar se basaba en la recogida de enjambres de las propias colmenas o en impedir la enjambrazón natural de éstas, por división en dos o más núcleos o a partir de colmenas madres donde las obreras huérfanas criarán una nueva reina hija de la anterior. Hay que tener en cuenta también, que las cuatro series fueron realizadas en colmenas diferentes, lo que podría explicar en parte, las diferencias significativas en las talas de nacimiento y de cría final entre las series, por la propia variación natural entre colonias, aunque lo mismo no haya ocurrido para las talas de aceptación en las colmenas iniciadoras.

Del mismo modo, la propia variación, aunque pequeña en la hora en que fue realizado el traslarve (por la mañana, a primera hora de la jornada de trabajo y en días diferentes) podría provocar algunas oscilaciones en la temperatura ambiente o en la humedad relativa que son necesarias para la realización de esta técnica y consecuentemente, hacer que las talas de aceptación en las colmenas incubadoras no presentaran diferencias significativas entre las series, ni tampoco, un valor muy elevado. Esto está en concordancia con las consideraciones de FERT (1996b) quien describe que el trasvase debe realizarse con una temperatura próxima a los 25 °C y una humedad relativa alrededor del 50%. Pero, por el contrario, difieren relativamente, del valor obtenido en la tasa de aceptación, que según su opinión podrá sobrepasar más del 95%, mientras que nosotros como cifra máxima obtuvimos el 83%.

Sin embargo, otros autores han descrito valores semejantes, aunque un poco más elevados para el porcentaje de aceptación, eclosión y cría total, cuando comparan la raza italiana y la caucásica con el objetivo de conocer que raza presenta mejores cualidades para la cría artificial de reinas en las islas Canarias (Tenerife) en el año 1989 y en los meses de máxima producción (enero a junio) (SANTANA y PÉREZ, 1993).

De este modo, el hecho de trabajar con razas distintas puede ser otro factor que contribuya a la explicación de los valores obtenidos por nosotros.

1.2 - ANÁLISIS DE LOS VALORES RESULTANTES DE LOS DOS TIPOS DE APAREAMIENTOS (INSEMINACIÓN INSTRUMENTAL Y FECUNDACIÓN NATURAL) Y DE LA TÉCNICA DE INTRODUCCIÓN DE REINAS

Tras la realización de la inseminación instrumental y mediante el acoplamiento natural, hemos expresado en la tabla nº 12 la comparación entre tratamientos, relativos al porcentaje de pérdidas, eficacia del tipo de tratamiento, aceptación de las reinas en las colonias y producción de reinas fértiles y vivas después de su introducción en las colonias. Mediante los dos tratamientos pudimos estudiar con mayor detalle la eficacia durante el período de apareamiento.

Tabla nº 12 - Comparación entre los dos tipos de fecundación a que fueron sometidas las reinas seleccionadas

Técnica	Nº de reinas	% total de pérdidas	% de la eficacia de la técnica	% de aceptación en las colonias	nº total de reinas vivas y fértiles
<u>Inseminación instrumental:</u> • semen de varios zánganos	30	20,0	80,0	58,4	46,7
<u>Fecundación natural</u>	26	15,0	85,0	72,7	61,5

En la inseminación instrumental obtuvimos pérdidas del orden del 20% que fueron debidas, en parte (7%) a pérdidas en el transporte de las reinas desde el colmenar de fecundación hasta el laboratorio donde hacíamos la inseminación y posteriormente, del laboratorio hasta el colmenar de fecundación. No hay que olvidar que las inseminaciones se efectuaron casi a finales de junio y que además de las temperaturas elevadas que ya teníamos, era necesario recorrer una distancia aproximada de 20Km. Por lo cual, pensamos que estas razones pueden explicar posibles daños que hayan ocurrido y llevado a la muerte de las reinas.

Las otras pérdidas, del orden del 13%, fueron observadas en los "núcleos baby", ya después de la inseminación. Este hecho demuestra posiblemente el papel importante que juega la experiencia del inseminador, pues aunque ya habíamos comprobado la técnica de inseminación instrumental, todavía no la hacíamos con mucha frecuencia.

A su vez, en la fecundación natural las pérdidas fueron más bajas y presumiblemente ocurrieron en los vuelos de apareamiento.

En lo que concierne al éxito de cada técnica puede observarse que obtuvimos una tasa de 80% con la inseminación instrumental. Por tanto, del valor obtenido deducimos que nuestra tasa es normal, una vez que, según RUTTNER (1987) una producción del 80% de reinas fértiles puede ser considerada como satisfactoria.

También se puede observar una tasa del 85% resultante de los acoplamientos naturales, sin embargo, esta diferencia no es muy elevada si hacemos la comparación entre los dos tipos de fecundación. Estos resultados están en concordancia con otros trabajos preliminares, como el de RUTTNER (1961), quién constató en 10 reinas acopladas naturalmente una capacidad de puesta de un 106% y en sus hermanas (10) inseminadas instrumentalmente un 92%, en comparación con el promedio general. Ya posteriormente, WOYKE y RUTTNER (1976)

añadiran que parece que las reinas acopladas naturalmente viven, por término medio más, pero que estas diferencias son insignificantes en el primer año.

Por otra parte, para contrastar los resultados entre la aceptación de las reinas inseminadas y fecundadas naturalmente, y las reinas vivas y fértiles, después de su introducción en las colonias, respecto al tipo de técnica, realizamos una prueba de contingencia, usando el estadístico χ^2 , para probar la hipótesis de independencia nula entre ambas variables (tabla nº 13).

Tabla nº 13 - Valores de χ^2 y respectivo grado de significación aplicados a las frecuencias obtenidas de la aceptación de las reinas después de su introducción en las colonias, y del número de reinas vivas y fértiles entre los dos tipos de fecundación

I.I./F.N.	χ^2	Valores de P
% aceptación	4,978	0,01
% total de reinas	4,537	0,01

Obtuvimos un χ^2 bajo pero significativo para $P \leq 0,01$, por lo que rechazamos la hipótesis nula y afirmamos que existe asociación y, por tanto, hay diferentes frecuencias en la aceptación de las reinas en las colonias según el tipo de apareamiento. Este hecho demuestra la dificultad que hay, muchas veces, en la aceptación de reinas inseminadas instrumentalmente. Vemos también que, efectivamente hay diferencias significativas ($P \leq 0,01$) entre el número total de reinas vivas y fértiles (total de reinas), respecto al tipo de técnica seguida, lo que está relacionado con el bajo o elevado grado de aceptación de dichas reinas en las colonias.

Lo que evidencia, el gran número de reinas introducidas y no aceptadas y que puede ser explicado, por el hecho de que, estábamos en una época en que la flora melífera ya había pasado su clímax y así, el flujo de néctar era más bajo y las abejas se quedaban más agresivas, consecuentemente disminuía el grado de aceptación de las reinas. Otros factores externos pueden ser señalados tales como el pillaje, estación del año y las condiciones climáticas en el período de la introducción (RUTTNER, 1983). Este autor afirmó que el éxito de la introducción depende no solo de esto, sino también de una multiplicidad de factores, tales como, las condiciones de la reina residente (edad, puesta y actividad), las condiciones de la reina a introducir (tipo de apareamiento, daños en el transporte, actividad de puesta, producción de feromonas), el tamaño y el peso de las reinas y las condiciones de la propia colonia que vaya a recibir la joven reina (raza, agresividad, desarrollo estacional y la proporción entre las abejas jóvenes y las más viejas).

Por tanto, cabe suponer que aunque sean muchos los métodos recomendados para la introducción de las reinas en las colonias parece que no hay referencias disponibles sobre que

ninguno de ellos resulta infalible, pues la aceptación de una reina o su no aceptación por parte de la colonia sigue siendo aún difícil de entender.

Así, nuestros resultados están de acuerdo con la bibliografía revisada sobre las mismas técnicas aplicadas por los varios autores, entre ellos, DRESCHER (1976), RUTTNER (1983), (1987), JEAN-PROST (1989) y WOYKE (1989).

1.3 - ANÁLISIS DE LOS VALORES OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACIÓN DE LA ASCOSFERIOSIS

En la tabla nº 14 se recogen las frecuencias, en cada uno de los niveles de afección considerados, de los recuentos que fueron realizados en el periodo comprendido entre la primavera de 1996 hasta la primavera de 1997. Hay que señalar que de las 43 colmenas iniciales una murió al final del verano de 1996, por lo que solamente estudiamos 42 colmenas.

Tabla nº 14 - Nivel de afección en las 42 colmenas estudiadas a lo largo del periodo de seguimiento de la Ascosferiosis

Secuencia de la cuantificación / Nivel de afección*	0	1 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90	+ 91
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
**C.I.A.C.R.	2	16	8	4	3	2	2	2	1	1	2
**C.I.D.C.R (Septiembre)	9	9	7	5	3	4	1	1	1	—	2
C. Octubre	10	15	5	5	3	1	—	2	1	—	—
C. Noviembre	15	14	6	3	—	3	1	—	—	—	—
C. Marzo	3	27	6	3	—	3	—	—	—	—	—
C. Abril	9	26	4	—	1	—	—	—	1	—	—
C. Mayo	11	22	6	—	1	—	—	—	2	—	—
C. Media Otoño	9	11	10	3	3	4	—	1	1	—	—
C. Media Primavera	1	31	5	1	3	1	—	—	—	—	—
Nº de colmenas	69	171	57	24	17	18	4	6	7	1	4
%colmenas afectadas	18,25	45,24	15,10	6,53	4,50	4,76	1,06	1,59	1,85	0,26	1,06

* 1=1 - 10 celdillas con momias/colmena; 2 =11 - 20; 3 =21 - 30; 4 =31 - 40; 5 =41 - 50; 6 =51 - 60; 7 =61-70; 8= 71-80; 9 = 81- 90; 10 =más de 91

** C.I.A.C.R = Cuantificación de la Ascosferiosis antes de cambiar las reinas

**C.I.D.C.R = Cuantificación de la Ascosferiosis después de cambiar las reinas

Del total de las colmenas que hemos investigado a lo largo de todos los recuentos observamos que el porcentaje más elevado de colmenas afectadas (45%) corresponde al grado 1 y contiene solamente un bajo nivel de infección (igual o menor que 10 celdillas con la enfermedad visible) siguiéndose el nivel 2 y 3 que representan, respectivamente, 15% y 6% de las colmenas enfermas. Del orden del 4% tenemos las colmenas que pertenecen al nivel de afección 4 y 5, y con los niveles más elevados de la afección tenemos aproximadamente 1 al 2% de las colmenas enfermas. Sin embargo, hay que hacer notar que el 18% de las colmenas enfermas no contienen celdillas con la enfermedad visible, lo cual fue aumentando, aunque no uniformemente, a lo largo de los sucesivos recuentos. Del mismo modo, se observa de una forma general, pero, no linealmente, una disminución del número de colmenas en cada nivel de afección. Esto puede indicar una evolución positiva aunque no constante en la disminución del número de colmenas en cada grado de afección a lo largo de los sucesivos recuentos.

Por lo que, aplicamos un ANOVA a cada una de las siete variables (D1, D2, D3, D4, D5, D6 y D7) (ver pag. 83) para ver como pueden actuar en su variabilidad, circunstancias tales como los lotes y las clases (tablas nº 15 y 16, y en anexos, las tablas nº 1, 4, 7, 10 y 13).

Los valores medios del grado de afección de cada una de las siete variables, respecto a los cuatro niveles del factor lote y a los tres niveles del factor clase, se representan en las figuras 24-27, y en los anexos, (figuras 1-10).

Posteriormente a estos análisis hicimos pruebas de comparación entre medias según el test de Bonferroni/Dunn que se adapta a nuestro modelo por el hecho de no tener todas las clases representadas en todos los lotes y porque tenemos números diferentes en el muestreo para cada lote y para cada clase. Las medias de las variables, por lote y por clase, se recogen en las tablas nº 17- 20 (tablas nº 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 y 15, en anexos).

Así, hemos analizado la varianza y observamos que sólo son significativas las F entre lotes para la variable D1 (diferencia mensual del nivel medio de afección entre octubre y septiembre) y la variable D7 (diferencia entre la medición inicial y final del grado de cuantificación de la Ascosporeosis) (tablas nº15 y 16).

Tabla nº 15 - Análisis de varianza de la diferencia mensual del grado de afección de la Ascosferiosis

Variable dependiente: D1 (afección octubre/ septiembre)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Lote	3	12,694	4,231	5,138	0,0053
Clase	2	1,486	0,743	0,903	0,4159
Lote-Clase	5	4,978	0,996	1,209	0,3281
Error	31	25,528	0,823		

Tabla nº 16 - Análisis de varianza de la diferencia entre el grado inicial y final de afección de la Ascosferiosis

Variable dependiente: D7 (CF-CI)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Lote	3	32,988	10,996	2,876	0,0519
Clase	2	1,722	0,861	0,225	0,7997
Lote-Clase	5	15,929	3,186	0,833	0,5361
Error	31	118,518	3,823		

Esto indica que la variabilidad entre lotes para estas dos variables es mayor que entre las diferencias de los recuentos mensuales de noviembre/octubre, marzo/noviembre, abril/marzo, mayo/abril y la de primavera/otoño, lo que analizaremos seguidamente.

Para la primera variable D1 (afección octubre/ septiembre) hemos obtenido valores de F significativos entre lotes (tabla nº 15), lo que evidencia una variabilidad significativa entre lotes, respecto a la evolución de la afección en este periodo. Según estos resultados se analizó la prueba de comparación entre medias, por lotes y clases, respectivamente, tabla nº 17 y 18.

Tabla nº 17 - Las medias de los valores de la diferencia D1 (afección octubre/ septiembre) en relación a los lotes

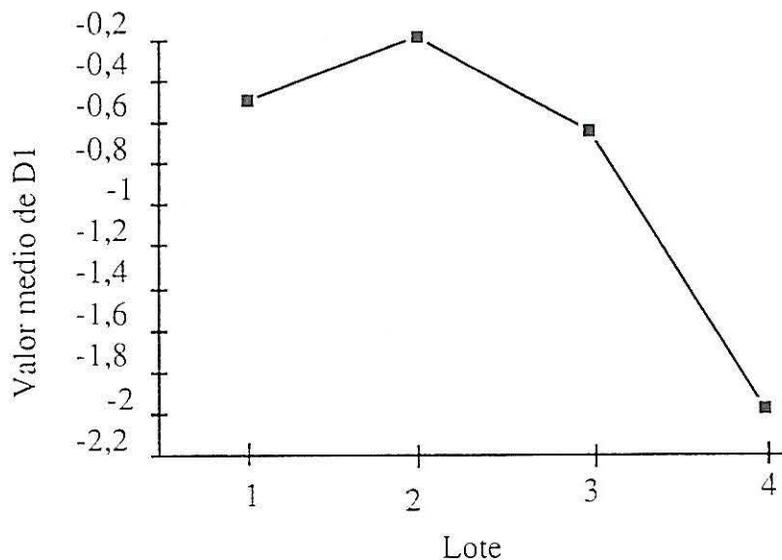
Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	11	- 0,491 _b	1,166	0,351
2	12	- 0,192 _b	0,396	0,114
3	11	- 0,645 _b	0,877	0,264
4	8	- 1, 975 _a	1,116	0,394

a≠b, para $P \leq 0,01$

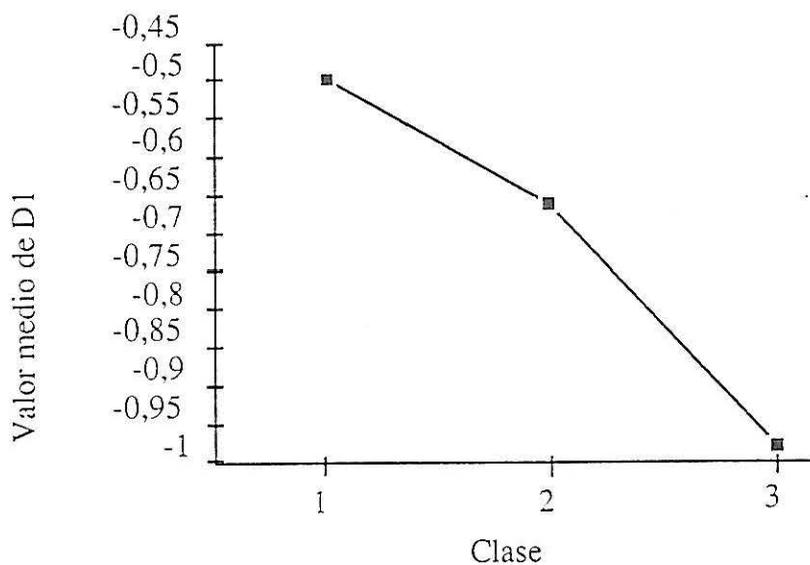
Tabla nº 18- Las medias de los valores de la diferencia D1 (afección octubre/ septiembre) en relación a las clases

Clase	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	10	-0,500	0,780	0,247
2	18	-0,661	1,071	0,252
3	14	-0, 979	1,296	0,346

En la tabla nº 17, observamos que existen diferencias significativas ($P \leq 0,01$) entre las medias de los valores para el nivel 4 del factor lote, que presentó la reducción más elevada en el grado de contaminación (-1,975), respecto a los otros niveles. Lo que también puede ser comprobado por el análisis de la figura 24. Sin embargo, las medias de los valores de la diferencia D1 (afección octubre/ septiembre) por clases (tabla nº 18) no han sido significativos ($P > 0,05$), aunque se pueda observar una reducción del grado de contaminación (-0,979) en la clase 3, relativamente a las otras dos. Del mismo modo, la figura 25 sugiere una tendencia aún no significativa, para una evolución en el sentido positivo del nivel de afección entre clases y aún más en las colonias con reinas inseminadas instrumentalmente y las fecundadas naturalmente en relación a las reinas de testigo.



Figuras 24 - Valor medio de D1 (afección octubre/ septiembre) en relación a los lotes



Figuras 25 - Valor medio de D1 (afección octubre/ septiembre) en relación a las clases

Del mismo modo, para la variable D7 existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre lotes, lo que indica una variabilidad significativa del recuento final e inicial, respecto al efecto de la localización de los distintos grupos de colonias en el colmenar (tabla nº 16).

Tabla 19 - Las medias de los valores de la diferencia, entre el recuento inicial y final (D7) del grado de afección de la Ascosteriosis, en relación a los lotes

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	11	-1,127 _b	1,440	0,434
2	12	-0,517 _b	1,269	0,366
3	11	-1,545 _b	2,768	0,835
4	8	-3,688 _a	1,904	0,673

a≠b, para $P \leq 0,05$

Tabla nº 20 - Las medias de los valores de la diferencia entre, el recuento inicial y final (D7) del grado de afección de la Ascosteriosis, en relación a las clases

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	10	-0,860	1,234	0,390
2	18	-1,617	1,774	0,418
3	14	-1,957	3,005	0,803

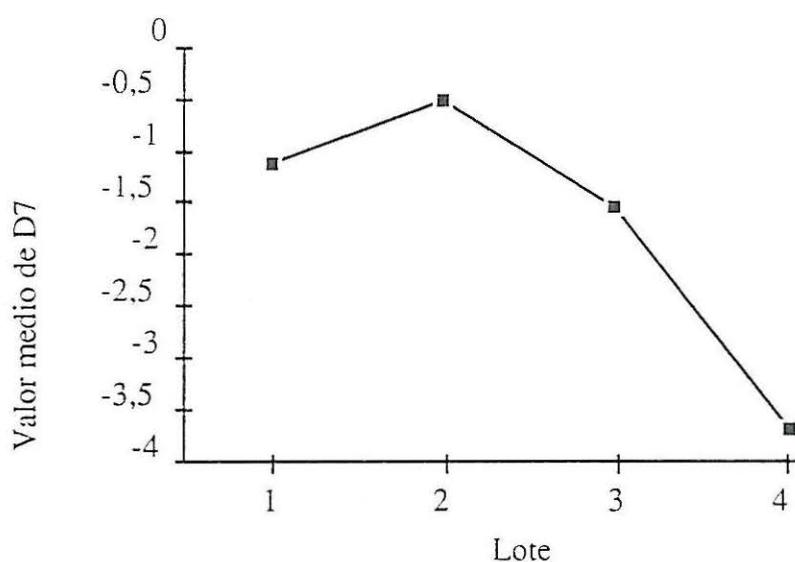


Figura 26 - Valor medio de D7 en relación a los lotes

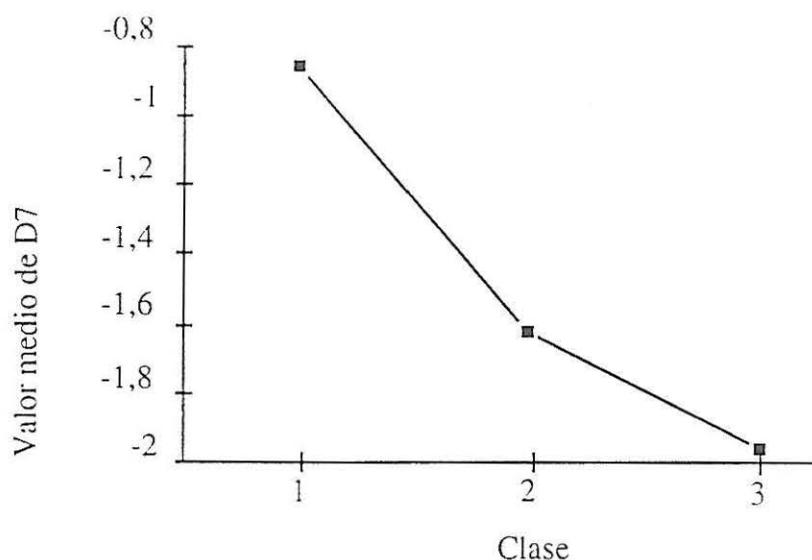


Figura 27 - Valor medio de D7 en relación a las clases

En la tabla nº 19 observamos diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre la media del lote 4, respecto al lote 1, 2 y 3, y también en la figura 26 se verifica que el lote 4 presentó el valor medio más reducido (-3,688) para el grado de la afección. Mientras que, por clases no fueron observadas diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las medias del recuento final e inicial (tabla nº 20), pero se puede deducir una tendencia en el sentido de la disminución de la enfermedad entre clases, la cual es más evidente para la clase 3 (figura 27) que representa las reinas inseminadas instrumentalmente.

En relación a las otras variables, los valores de F obtenidos no han sido significativos para ninguna de ellas, por lo que concluimos que las diferencias entre lotes y entre clases no tienen por qué determinar reducciones en el nivel de afección entre las variables restantes.

Del mismo modo, la interacción lote clase no afectó significativamente ($P > 0,05$), en ninguno de los recuentos, el grado de resistencia de las estirpes seleccionadas.

Sin embargo, de estos análisis hemos extraído las pruebas de comparación entre medias y de dichas pruebas deducimos que aunque no existan diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las medias de las variables D2, D3, D4, D5 y D6 hay de una forma general una ligera tendencia para que el grado de cuantificación de la enfermedad disminuya, entre lotes y entre clases. Entre lotes, esto es más evidente en el cuarto y, también, entre clases se evidencia la 2 y 3, comparativamente con la 1, o sea, cuando utilizamos la inseminación instrumental y los apareamientos naturales de las reinas seleccionadas frente a las reinas testigo, que son las reinas originales de las colonias enfermas.

Nuestros resultados de una forma general coinciden, en parte, con los que hemos descrito en este trabajo y las diferencias más evidentes son debidas a que, muchos de los test diseñados para estudiar la resistencia a la enfermedad tenían como principio básico la

maceración en una solución acuosa de las momias y posteriormente la pulverización de las abejas y de los cuadros para introducir la afección en las colmenas (GILLIAM y col., 1983 y GILLIAM, 1986), otros test se basaban también en la maceración de las momias, pero después éstas son añadidas a una mezcla de polen y azúcar y son utilizadas como alimento, por lo que inducen la enfermedad (TABER, 1987; TABER y GILLIAM, 1988 y GILLIAM y col., 1988) de una forma más uniforme. No obstante, nosotros ya teníamos la enfermedad en el colmenar, pero el nivel de afección no era uniforme, por lo que tuvimos que hacer lotes homogéneos con porcentajes de infestación alto, medio y bajo en todos los grupos. Este hecho puede explicar en parte, nuestros resultados relativos a las diferencias significativas que hemos obtenido entre lotes, aunque no para todas las variables, ya que hemos querido uniformizar el nivel de afección en el colmenar para cuantificar la variabilidad que se introducía al incluir el factor lote y posiblemente los lotes no fueron tan homogéneos como creíamos al ser la reducción más visible solamente en el lote 4.

Por otra parte, a las diferencias que anteriormente referimos podemos añadir el hecho de que hemos trabajado simultáneamente con reinas fecundadas naturalmente e inseminadas instrumentalmente, pero inseminadas con el semen de varios zánganos (8-10) aunque éstos eran seleccionados a partir de colonias higiénicas, lo que es semejante a nuestros resultados y a nuestra técnica a lo que hicieron RATH y DRESCHER (1987), quienes observaron una mayor eficiencia en el comportamiento higiénico y consecuentemente a la resistencia de la enfermedad para las reinas vírgenes de colonias resistentes a la Ascosferiosis, inseminadas con el semen de los zánganos de las mismas colonias. Mientras que TABER (1987), TABER y GILLIAM (1988), GILLIAM y col. (1988), HARBO (1995) y HARBO y HOOPINGARNER (1995) utilizaron la inseminación instrumental, de las reinas apareadas individualmente con un zángano, sugiriendo que con este método, se eliminan las variaciones resultantes de varios machos con quien la reina se aparee, o sea, las variaciones de las reinas naturalmente apareadas.

Este hecho puede ayudar a explicar nuestros resultados, por no haber obtenido diferencias significativas entre clases, lo que indica, que el nivel de infección se mantiene homogéneo en todas las clases y a lo largo de la secuencia de recuentos efectuados, aunque en simultáneamente hayamos observado una tendencia positiva en el descenso del nivel de infección. Éstos probablemente fueron debidos a que las colonias originadas por múltiples líneas paternas están compuestas por grupos de subfamilias de abejas, de las cuales algunas subfamilias pueden ser resistentes a esta enfermedad, mientras que otras pueden ser susceptibles, lo que puede originar en las colonias en estudio un efecto de mosaico, generalmente demostrando una resistencia y/o susceptibilidad parcial. Además, este efecto puede cambiar en cualquier período del estudio, porque el semen de los zánganos que transporta los genes que fertilizan los ovulos para la resistencia o susceptibilidad se puede quedar más o menos concentrado a lo largo del período de postura de los huevos fértiles, como

afirmó TABER (1987). Esto podría ratificar el hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre las clases a lo largo de los recuentos mensuales.

La razón por la cual no hemos realizado las inseminaciones con el apareo individual de las reinas, fue debido a que, habíamos consultado algunos trabajos cuyos resultados con la misma técnica eran satisfactorios, como son los de MILNE (1982, 1983, 1985a,b) quien usó reinas fecundadas naturalmente para predecir la heredabilidad de los dos componentes del comportamiento higiénico (desoperculación y extracción) y su correlación genética o el estudio sobre la expresión del comportamiento higiénico en las abejas melíferas en lo que concierne a la resistencia a esta enfermedad. SPIVAK y GILLIAM (1993) inseminaron las reinas vírgenes con una mezcla de 3-4 μ l de semen de zánganos de 3 diferentes colonias, según las características que deseaban estudiar.

No obstante, nuestra opinión al respecto después de nuestra experiencia es que la inseminación con el apareo individual de la reina con un zángano debe de ser la metodología adoptada, siendo propuesta para las próximas investigaciones sobre el tema, puesto que así, disminuimos los factores que ya de sí son muchos al estudiar esta enfermedad.

Por otra parte, otra de las razones que pueden explicar nuestros resultados es que, individualmente, cada colonia tiene sus propias características y aún que teníamos las colmenas distribuidas por lotes homogéneos respecto a la enfermedad, no quiere decir que, todas ellas estuviesen en las mismas circunstancias, pues unas estaban más fuertes que otras; unas tenían una mayor proporción de abejas nodrizas en su interior; otras tenían un mayor número de celdillas vacías para la postura y almacenamiento de alimentos o al revés, o sea, estamos hablando de la variabilidad natural entre colonias, lo que posiblemente podrá haber influido en la expresión del comportamiento higiénico y consecuentemente en la resistencia a la enfermedad. SPIVAK y GILLIAM (1993) sugirieron que, aunque el comportamiento higiénico sea genéticamente determinado ni siempre se expresa, una vez que su expresión parece ser facultativa y dependiente de la fuerza de la colonia, de la cantidad de obreras en el interior de la misma, del espacio necesario en las celdillas para la postura y almacenamiento de la miel y del polen, de las condiciones de pecoreo y también de factores todavía desconocidos.

Otro punto de nuestra discusión, es el referente a que existe una relación muy íntima entre las condiciones ambientales y la dinámica de esta enfermedad. No hay que olvidar que el presente año está siendo muy inestable respecto a las condiciones climáticas. En nuestra región particularmente, con temperaturas muy bajas al inicio del año, una primavera muy temprana con temperaturas muy altas, lo que permitió floraciones muy tempranas y posteriormente períodos de floración muy pequeños, oscilaciones térmicas muy elevadas, mucha lluvia acompañada con bajas temperaturas, lo que condiciona la producción de la miel y también el ciclo biológico de las colonias. Por tanto, cabe suponer que estos datos puedan haber influido en nuestros resultados en lo referente a la secuencia de las cuantificaciones efectuadas a lo largo de la

primavera y potencializando la falta de diferencias en las frecuencias del nivel de infección entre los distintos períodos.

Una vez que, nuestros resultados están conformes con la variación en la susceptibilidad de las colonias de abejas a la Ascosferiosis que ha sido tan evidente en la mayoría de los estudios sobre la enfermedad y que puede ser comprobado al constatar que en nuestro colmenar algunas colonias están profundamente infectadas, mientras que las adyacentes no lo están o su nivel es muy bajo. Esto refleja que una colonia puede tener la infección sin manifestarla aparentemente (GILLIAM, 1990) y sugiere que las larvas pueden no quedarse infectadas hasta que alguno factor de estrés se desarrolle en la colmena. Sin embargo, hay que reseñar también, que esta variación puede ocurrir porque algunas colmenas son genéticamente más resistentes o tolerantes a la infección o porque esta resistencia/tolerancia puede también ocurrir debido a la propia resistencia fisiológica o física de las abejas (TABER, 1987).

Otra posible explicación de nuestros resultados y siguiendo la reflexión anterior, (basada en los factores de estrés) está relacionada con las muchas prácticas de manejo que hemos realizado a lo largo del trabajo, la manipulación de los cuadros, por cambios de los mismos en la colmena o el hecho de tener los cuadros de cría alguno tiempo en el exterior pueden haber provocado algún estrés y aumentado la enfermedad en algunas de ellas. Lo que está en concordancia con BEFUS-NOGEL y col. (1992), quien sugirió que el manejo de las colonias, especialmente si es un manejo muy (violento) agresivo del nido de cría puede aumentar la incidencia de la Ascosferiosis en las colonias enfermas, lo que posiblemente es causado por la interrupción en la comunicación y alimentación en el nido de cría.

Es interesante resaltar que estamos trabajando con características que posiblemente tienen una baja heredabilidad genética (MILNE 1985a,b) y luego, refozando la idea anterior del papel importantísimo del entorno, estas razones, juntamente al hecho de que cuando hacemos selección e intentamos introducir una característica deseable en un programa de mejora a menudo, ponen de manifiesto la dificultad de obtener los resultados más deseables en las primeras generaciones. Por consiguiente, parece razonable postular que probablemente esta tendencia general que demuestran nuestros resultados, para un descenso en el nivel de infección y aún más cuando usamos la inseminación frente a los apareamientos naturales, puedan ser más concluyentes a lo largo de las próximas generaciones. Además, hay que reseñar que para ello es necesario dar continuidad a lo largo del año a varios test de limpieza para volver a seleccionar y hacer la crianza de reinas de las colonias que demuestren el mejor comportamiento higiénico.

IV - CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta las condiciones en que se desarrolló el presente trabajo, las metodologías utilizadas y los resultados obtenidos, pensamos que es posible sacar el siguiente conjunto de conclusiones:

Test diseñados para el estudio del comportamiento higiénico

1º - Existen diferencias significativas en la respuesta de las abejas a la cría muerta y operculada.

Las abejas locales presentan un buen comportamiento higiénico, o sea, una respuesta rápida a los test de limpieza diseñados.

Cría de reinas

2º - El porcentaje de aceptación en las colmenas incubadoras presentó la cifra máxima de 83,3%, existiendo diferencias significativas entre las cuatro series en relación a su tasa de nacimiento.

Inseminación instrumental

3º - Mediante la inseminación instrumental las abejas locales presentaron una fertilidad del orden del 80%.

Introducción de las reinas en las colonias después de la inseminación

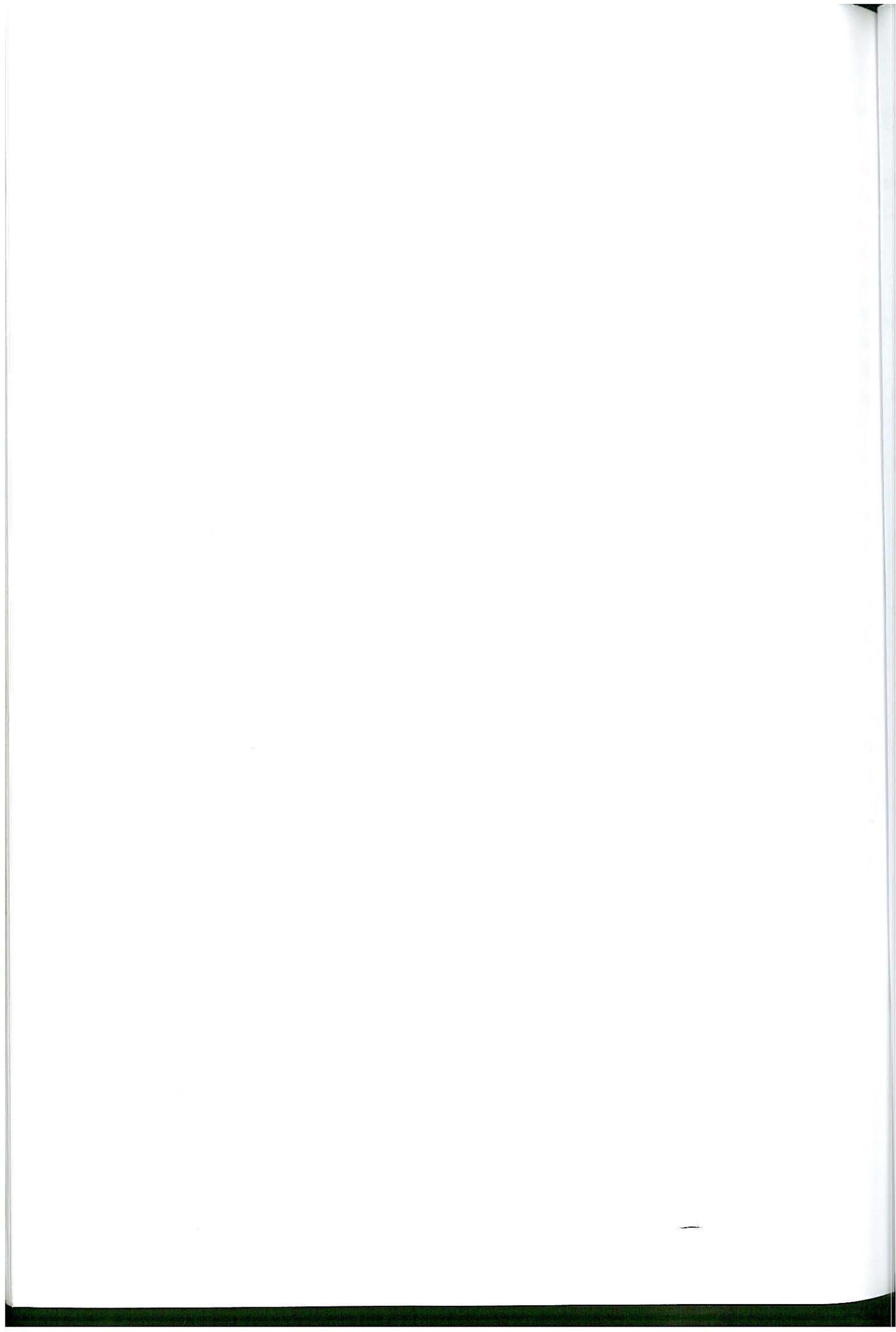
4º - El porcentaje de aceptación de las reinas en las colonias varía significativamente con el tipo de fecundación a que fueron sometidas.

Cuantificación del nivel de daño en las estirpes limpiadoras resistentes a la Ascospferiosis

5º - Ni los lotes, ni las clases, afectan significativamente la diferencia mensual del nivel medio de afección.

6º - Aunque conjuntamente los factores analizados no afectan significativamente la reducción del nivel de afección de la Ascospferiosis, individualmente el único factor que parece haber sido significativo fue la ubicación de los distintos grupos de colmenas.

7º - Teniendo en cuenta los resultados alcanzados y el corto periodo en que se desarrolló este programa de selección y recría creemos que las estirpes locales poseen un bajo grado de resistencia a esta enfermedad.



V - BIBLIOGRAFIA

- AGROCONSULTORES y COBA (1988) - Carta de Solos, Carta da Utilidade Actual da Terra e Carta de Aptidão da Terra do Nordeste de Portugal (versões preliminares). UTAD, Vila Real, Portugal, 98.
- AGROCONSULTORES y COBA (1991) - Projecto de Desenvolvimento Rural Integrado de Trás-os-Montes, Carta de Solos, Carta de Uso Actual da Terra e Carta de Aptidão da Terra do Nordeste de Portugal, UTAD, Vila Real, Portugal, 111.
- ALONSO RODRÍGUEZ, J.M.; PUERTA PUERTA, F.; HERMOZO DE MENDOZA SALCEDO, J.; REY PÉREZ, J.; CARDENAL GALVÁN, J.A. y HERMOZO DE MENDOZA SALCEDO, M. (1992) - Etiología de la Ascosferiosis. *Vida Apícola*, **55**: 18-24.
- ALONSO RODRÍGUEZ, J.M.; PUERTA PUERTA, F.; HERMOZO DE MENDOZA SALCEDO, J.; REY PÉREZ, J.; GIL ANAYA, M.C. y HERMOZO DE MENDOZA SALCEDO, M. (1993b) - La Ascosferiosis de la Abeja Melífera en España. Estudio micológico de 47 brotes de la enfermedad. *Revista Iberoamericana de Micología*, **10**: 39-46.
- ALONSO RODRÍGUEZ, J.M.; PUERTA PUERTA, F.; HERMOZO DE MENDOZA SALCEDO, J.; REY PÉREZ, J.; GIL ANAYA, M.C. y HERMOZO DE MENDOZA SALCEDO, M. (1994) - Perfil Enzimático y Variabilidad Subespecífica de *Ascosphaera apis*. *Revista Iberoamericana de Micología*, **11**: 32-36.
- ALONSO RODRÍGUEZ, J.M.; PUERTA PUERTA, F.; REY PÉREZ, J.M.; HERMOZO DE MENDOZA, J.; CARDENAL GALVÁN, J.A.; ANAYA, M.C. y HERMOZO DE MENDOZA, M. (1993a) - Quimioterápicos Contra *Ascosphaera*. *Vida Apícola*, **62**: 41-44.
- ALONSO, J.M.; REY, J.; PUERTA, F.; MENDOZA, J.H.; MENDOZA, M.H. y FLORES, J.M. (1993) - Enzymatic Equipment of *Ascosphaera apis* and the Development of Infection by this Fungus in *Apis mellifera*. *Apidologie*, **24**: 383-390.
- BAILEY, L. y BALL, B.V. (1991) - *Honey Bee Patology*. 2ª Edición. Academic Press, Londres, Reino Unido, 193.
- BAMFORD, S. (1987) - *Studies on the Infection of Honey Bee Larvae with Ascosphaera apis*. Bdo. PhD Thesis, Plymouth Polytechnic, Reino Unido.
- BAMFORD, S. y HEATH, L. A. F. (1989a) - The Effects of Temperature and pH on the Germination of Spores of the Chalkbrood Fungus, *Ascosphaera apis*. *J. Apic. Res.*, **28**(1): 36-40.

- BAMFORD, S. y HEATH, L. A. F. (1989b) - The Infection of *Apis mellifera* Larvae by *Ascosphaera apis*. J. Apic. Res., 28(1): 30-35.
- BEFUS-NOGEL, J.; NELSON, D. L.; LEFKOVITCH, L. P. (1992) - Observations on the Effect of Management Procedures on Chalkbrood Levels in Honey Bee (*Apis mellifera* L.; Hymenoptera: Apidae) Colonies. Bee Science, 2(1): 20-24.
- BENEDETTI, L. y PIERALLI, L. (1990) - Apicultura. Editorial Omega, Barcelona, España.
- BIENEFELD, D y KUHNERT, M. (1992) - Insemination of Virgin Queens after Induction of Oviposition. Apidologie, 23(4): 351-353.
- BIRI, M. y PRATS, C. (1988) - El Gran Libro de las Abejas. De Vecchi S.A., Barcelona, España.
- BISSETT, J. (1988) - Contribution Toward a Monograph of the Genus *Ascosphaera*. Can. J. Bot., 66: 2541-2560.
- BUYS, B. (1992) - Effect of Humidity on Artificial Insemination of Queen Honey Bees. Am. Bee. J., 132(12): 801-802.
- BUYS, B. (1993) - Effect of Worker Absence on the Results of Artificial Insemination and Survival of Queen Honey Bees. Am. Bee. J., 133(2): 133-135.
- CALVET, C. C.; SOLSONA, O. G.; PAJUELO, A. G.; BERMEJO, X. G. y MONRÁS, C. V. (1992) - Claves de Identificación y Tratamientos. Vida Apícola, 53: 36-43.
- CARDENAL GALVÁN, J.A.; LÓPEZ-SEPÚLVEDA GARCIA, E. C.; GÓMEZ PAJUELO, A.; ALONSO RODRÍGUEZ, J. M.; HERMOSO MENDOZA, J. y HERMOSO MENDOZA, M. (1988) - Ensayos de Control de la Ascoferiosis (<<Pollo Escayolado>>) de la Abeja Melífera (*Apis mellifera* L.): Estudios de Comportamiento Higiénico I. In.: II. Biología y Patología. IVº Congreso Nacional de Apicultura. Diputación General de Aragón. Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes. Zaragoza, España, 163-165.
- CARDENAL GALVÁN, J.A.; RODRÍGUEZ, J.M.A.; BELVIS, J.M.A.; MENDOZA, J.H.; MENDOZA, M.H.; CERRILLO, G.N. y PÉREZ, J.M.R. (1990) - Ascosferiosis. Vida Apícola, 40: 54-58.
- CARDENAL, J. A.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, J.; HEY, J. y HERMOSO, M. (1990) - Eficacia de Fungicidas Frente a la Micosis. Vida Apícola, 43: 49-53.
- CARRERA, P.; SOMMARUGA, A. y VAILATI, G. (1987) - The Development of *Ascosphaera apis* within Larvae of *Apis mellifera ligustica*. J. Apic. Res., 26(1): 59-63.

- CARRERA, P.; SOMMARUGA, A.; VAILATI, G. y SCARI, G. (1989) - Ascosteriosi: Determinazione Microscopica della Specie Fungina Responsabile della Malattia nel Nord Italia. *Apicolt. mod.*, **80**: 155-162.
- CARTER, J. B. (1973) - The mode of Transmission of Tipula Iridescent Virus II. Route of Infection. *J. Invert. Pathol.*, **21**: 136.
- CASTRO, L. P.; TAVARES, J. P.; ABREU, M. P.; MOREIRA, L. M. y PETRUCCI-FONSECA, F. (1989) - Inventário da Comunidade de Vertebrados Terrestres do Parque Natural de Montesinho. *In.*: II Congresso de Áreas Protegidas. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal.
- CHANG, Y.D; YIM, Y.H y LEE, MY. (1989) - The Rate of Infection by *Ascospaera apis* Olive y Spiltoir in Different Races, Population Levels and Developmental Stages of Honeybee. *Korean Journal of Apiculture*, **4**(2): 81-84.
- CHMIELEWSKI, M. y GLINSKI, Z. (1987) - Effects of *Varroa jacobsoni* on the Incidence and Course of Chalkbrood Disease in *Apis mellifera* L. *In.*: XXXIst International Apicultural Congress Warsaw, Poland. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 209.
- CLARKE, R. (1992) - Starting Queen Cells: a variation of the queenright free-flight hive. *New Zealand Beekeeper*, **213**: 13-15.
- COLIN, M.E.; DUCOS-de-LAHITTE, J.; LARRIBAU, E. y BOUE, T. (1989) - Activite des Huiles Essentielles de Labiees sur *Ascospaera apis* et Traitement d'un Rucher. *Apidologie*, **20**(3): 221-228.
- CRANE, E. (1990) - Bees and Beekeeping: science, practice and world resources. 1ª Edición. Heinemann Newnes. Oxford, Reino Unido, 612.
- DANKA, R. G. y VILLA, J. D. (1994) - Preliminary Observations of the Susceptibility of Africanized Honey Bees to American Foulbrood. *J. Apic. Res.*, **33**(4): 243-245.
- DE JONG, D. (1976) - Experimental Enhancement of Chalk Brood Infections. *Bee World*, **57**(3): 114-115.
- DEDEJ, S. (1994) - Effetti del Doppio Translarvo nell'Allevamento delle Api Regine. *Ape Nostra Amica*, **16**(2): 11-14.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G; LUSBY, D. A.; ERICKSON, E. H., JR.; LUSBY, E. W. (1989) - Managing Colony Genetics by Grafting and Selecting for Queens with Shorter Development Times. *Am. Bee. J.*, **129**(11): 717-719.

- DELAPLANE, K. S. y HARBO, J. R. (1988) - A Re-Examination of Double Grafting. *Am. Bee. J.*, **128**(6): 439-440.
- DEL CACHO, E; MARTÍ, J. L.; JOSA, A.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. (1996) - Effect of *Varroa jacobsoni* parasitization in the glycoprotein expression on *Apis mellifera* spermatozoa. *Apidologie*, **27**: 87-92.
- DINIS, A. C. y RIBEIRO, J. A. (1988) - A Vegetação de Trás-os-Montes e Alto Douro. *In.*: Simpósio Sobre a Floresta e o Ordenamento do Espaço de Montanha. Sociedade Portuguesa de Ciências Protegidas. Vila Real, Portugal.
- DRESCHER, W. (1976) - Cría y mantenimiento de las Reinas y de los Zánganos. *In.*: Inseminación Artificial de las Reinas de Abejas. FRIEDRICH RUTTNER. 2ª Edición. Apimondia. Instituto Internacional de Tecnología y Economía Apícolas. Bucarest, Rumania, **3**: 25-38.
- DUCOS de LAHITTE, J. (1988) - Les Mycoses. *Bul. Tech. Apic.*, **15**(1): 37-44.
- DUNN, O.J. (1961) - Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, **56**: 52-64.
- DUSTMANN, J.H.; KUHNERT, M.; SCHLEY, P. y TIESLER, K. (1991) - Instrumental Insemination of Queen Bees. *Institut für den Wissenschaftlichen Film*. Göttingen, 23.
- FELDLAUFER, M. F.; KNOX, D. A.; LUSBY, W. R. y SHIMANUKI, H. (1993b) - Antimicrobial Activity of Fatty Acids Againsts *Bacillus larvae*, the Causative Agent of American Foulbrood Disease. *Apidologie*, **24**: 95-99.
- FELDLAUFER, M. F.; LUSBY, W. R.; KNOX, D. A. y SHIMANUKI, H. (1993a) - Isolation and Identification of Linoleic Acid as an Antimicrobial Agent from the Chalkbrood Fungus, *Ascosphaera apis*. *Apidologie*, **24**: 89-94.
- FERT, G. (1996a). Principales Razas de Abejas Criadas en Europa. *Vida Apícola*, **78**: 32-37.
- FERT, G. (1996b). Cría de Reinas. Producción de Paquetes de Abejas. Iniciación a la inseminación artificial. 3ª Edición. O.P.I.D.A. y Montagud Editores, 100.
- FISCHER, F. y MAUL, V. (1991) - Methodik und Ergebnisse der Spermamischtechnik. *Neue Bienen Zeitung*, **2**(3): 152-156.
- FREE, J. B. (1987) - Pheromonas of Social Bees. 1ª Edición. Chapman and Hall Ltd. Londres, Reino Unido, 218.

- GEFEN, D. (1990) - Queens's Guard - a new hi-tech system for requeening from Israel. *Am. Bee. J.*, **130**(12): 788-789.
- GILLIAM, M. (1986) - Infectivity and Survival of the Chalkbrood Pathogen, *Ascosphaera apis*, in colonies of the honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, **17**(2): 93-100.
- GILLIAM, M. (1989) - Chalkbrood: a survey of current scientific knowledge. *In.*: XXXIInd International Congress of Apiculture, Rio de Janeiro, Brasil. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 277-280.
- GILLIAM, M. (1990) - Chalkbrood Disease of Honey Bees, *Apis mellifera*, Caused by the Fungus, *Ascosphaera apis*: A Review of Past and Current Research. *In.*: VTH International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, The XXIIIrd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Proceedings and Abstracts, Adelaide, Australia, 398-402.
- GILLIAM, M. (1991) - Microorganismos Antagónicos de las Colmenas, una Vía de Futuro para el Control de *Ascosphaera*. *Vida Apícola*, **45**: 8-10.
- GILLIAM, M. y LORENZ, B.J. (1991) - Enzymology of Mycelial and Sporulated Strains of *Ascosphaera apis*: Marker Enzymes as Taxonomic Aids. *Am. Bee. J.*, **131**(12): 776.
- GILLIAM, M. y LORENZ, B.J. (1995) - Problemas de la Identificación de *Ascosphaera apis*. *In.* XXXIV Congreso Internacional de Apicultura. Lausana, Suiza. Editorial Apimondia. Bucarest, Rumania, 95-96.
- GILLIAM, M. y VANDENBERG, J.D (1990) - Fungi. *In.*: Honey Bee Pests, and Diseases. ROGER A. MORSE y RICHARD NOWOGRODZKI. 2^a Edición. Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press, Londres, Reino Unido, **5**: 64-78.
- GILLIAM, M.; TABER S. III; LORENZ, B.J. y PREST, B. D. (1988) - Factores Affecting Development of Chalkbrood Disease in Colonies of Honey Bees, *Apis mellifera*, Fed Pollen Contaminated with *Ascosphaera apis*. *J. Invert. Pathol.*, **52**: 314-325.
- GILLIAM, M.; TABER S. y RICHARDSON, G.V. (1983) - Hygienic Behaviour of Honey Bees in Relation to Chalkbrood Disease. *Apidologie*, **14**(1): 29-39.
- GLINSKI, Z. (1988) - The Effect of *Varroa jacobsoni* Oud. on the Incidence and Course of Chalkbrood Disease in *Apis mellifera* L. Colonies. *Annales Universitatis Mariae Curie Sklodowska, DD.* **43**: 23-27.

- GLINSKI, Z. y OSIPOWSKI, T. (1984) - The Effect of Nystatin and Sanitary Measures on the Control of Chalk Brood in Honeybees. *Annales Universitatis Marie Curie Sklodowska, DD.*, **39**: 217-226.
- GLINSKI, Z.; RZEDZICKI, J. y CHMIELEWSKI, M. (1986) - Studies on the Influence of N-methylglucamine Salt of N-glucosylopolifungine upon Larvae and Worker Honey Bees. *Apis mellifera L. Polski Archiwum Weterynaryjne*, **24**(3): 397-403.
- GONÇALVES, L. S. y KERR, W. E. (1970) - Noções sobre Genética e Melhoramento em Abelhas. *In.*: Anais do 1º Congresso Brasileiro de Apicultura. Florianópolis, Brasil, 8-36.
- GONÇALVES, D. A. (1985a) - A Rega de Lima no Interior de Trás-os-Montes. (Alguns aspectos da sua energética). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). Vila Real, Portugal.
- GONÇALVES, D. A. (1985b) - Contribuição para o Estudo do Clima da Bacia Superior do Rio Sabor. Tese de doutoramento. UTAD, Vila Real, Portugal.
- GONÇALVES, D. A. (1980) - O Meio Natural. *In.*: Parque Natural de Montesinho. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Património Paisagístico, 5-12.
- GONÇALVES, D. A. (1991) - O Clima e os Ecosistemas Agro-ecológicos do Parque Natural de Montesinho. Seminário Técnico sobre Conservação da Natureza nos Países do Sul da Europa, Faro, Portugal.
- GUTH, J. (1990a) - Elevage. *In.*: Elevage, Selection et Insemination Instrumental des Reines D'Abeilles. J. GUTH. Syndicat National D'Apiculture. Paris, Francia, **1**: 15-33.
- GUTH, J. (1990b) - La Conservation de Sperme. *In.*: Elevage, Selection et Insemination Instrumentale des Reines D'Abeilles. J. GUTH. Syndicat National D'Apiculture. Paris, Francia, **4**: 108-109.
- HANLIN, R. T. y SAUNDERS, R. A. (1986) - Confirmation of *Ascosphaera apis* in Georgia. *Mycotaxon*, **27**: 551-554.
- HARBO, J. R. (1986) - Propagation and Instrumental Insemination. *In.*: Bee Genetics and Breeding. THOMAS E. RINDERER. Academic Press, Inc., Orlando, Florida, **15**: 361-389.
- HARBO, J. R. (1989) - Sperm Storage. *In.*: The Instrumental Insemination of the Queen Bee. R. F. A. MORITZ (Ed). Apimondia. International Beekeeping Technology And Economy Institute, Bucarest, Rumania, 59-64.

- HARBO, J. R. (1990) - Artificial Mixing of Spermatozoa from Honeybees and Evidence for Sperma Competition. *J. Apic. Res.*, **29**(3): 151-158.
- HARBO, J. R. (1995) - Observations on Hygienic Behavior and Resistance to Chalkbrood. *Am. Bee. J.*, **135**: 828.
- HARBO, J. R. y HOOPINGARNER, R. (1995) - Resistance to Varroa Expressed by Honey Bees in the USA. *Am. Bee. J.*, **135**: 827.
- HARBO, J. R. y MAUL, V. (1989) - Insemination Apparatus. *In.*: The Instrumental Insemination of the Queen Bee. R. F. A. MORITZ (Ed). Apimondia. International Beekeeping Technology And Economy Institute, Bucarest, Rumania. 47-59.
- HARBO, J. R. y SBARZO, T. I. (1989) - A Comparison of Instrumental Inseminated and Naturally Mated Queens. *J. Apic. Res.*, **23**(1): 31-36.
- HARBO, J. R. y WILLIAMS, J. L. (1987) - Effect of Above Freezing Temperature on Temporary Storage of Honey-bee Spermatozoa. *J. Apic. Res.*, **26**: 53-55.
- HEATH, L. A. F. (1985) - Occurence and Distribution of Chalk Brood Disease of Honeybees. *Bee World*, **66**: 9-15.
- HERBERT, E. W., Jr.; SHIMANUKI, H. y KNOX, D. A. (1977) - Transmission of Chalk Brood Disease of Honeybees by Infected Queens, and Worker Brood and Adults. *J. Apic. Res.*, **16**(4): 204-208.
- HOLM, S. N. (1985) - Breeding Honeybees for Resistance to chalkbrood Disease. *In.* : :XXXth International Apicultural Congress of Apimondia Nagoya, Japan. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 100-102.
- ILIESU, N. V. (1973) - Expériences Thérapeutiques pour la Lutte Contre le Couvain Plâtré. *Revue Française d'Apiculture*, **312**: 357-359.
- JEAN-PROST, P. (1989) - Apicultura. Conocimiento de la abeja - Manejo de la colmena. 3ª Edición. Mundi Prensa, Madrid, España, 726.
- JENKO, M.; ZEBA, L.; KOVACEVIC, A. y SULIMANOVIC, C. (1991) - Control of Chalkbrood Disease: *in vitro* and *in vivo* Studies. *In.*: Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology, September 5-7, 1990, Ghent, Belgium, RITTER, W. (Ed)., 132-135.
- JOHANSSON, T. S. K. y JOHANSSON, M. P. (1973) - Methods for Rearing Queens. *Bee Wld.*, **54**(4): 149-175.

- KAFTANOGLU, O. y PENG, Y. (1980) - A Washing Technique for Collection of Honey Bee Semen. *J. Apic. Res.*, **19**(4): 205-211.
- KAKPAKOV, V. T.; KABASOVA, O. V.; HMELEV, A. V.; KARPAKOVA, E. S. y BORODACIOV, A. V. (1995) - Conservación Criobiológica a Largo Plazo del Esperma de Zángano y los Embriones de Abeja Melífera. *In.*: XXXIV Congreso Internacional de Apicultura. Lausana, Suiza. Editorial Apimondia. Bucarest, Rumania, 77.
- KEFUSS, J.; Taber, S.; VAN POUECKE, J. y REY, F. (1996) - A Pratical Method to Test for Disease Resistance in Honey Bees. *Am. Bee J.* **136**: 31-32.
- KLEINSCHMIDT, G. J. (1989) - Banking of Queen Honey Bees. *Australasian Beekeeper*, **90**(9): 407-412.
- KODOMA, K. (1985) - Control of Honeybee Chalkbrood Disease. *In.*: XXXth International Apicultural Congress of Apimondia Nagoya, Japan. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 238-243.
- KOE, T. (1988) - Flora e Vegetação da bacia Superior do Rio Sabor no Parque Natural de Montesinho. Instituto Politécnico de Bragança. Braganza, Portugal, 35.
- KOENIG, J.P. (1987) - Factors Contributing to the Pathogenesis of Chalk Brood Disease in Honeybee Colonies. PhD Thesis, University of Wisconsin, EE.UU., 138.
- KOENIG, J.P.; BOUSH, G.M. y ERICKSON, E.H. (1986) - Effect of Type of Brood Comb on Chalk Brood Disease in Honeybee Colonies. *J. Apic. Res.*, **25**: 58-62.
- KOENIGER, G.; KOENIGER, N.; TINGER, S. y KALITU, A. (1995) - Obtención de Esperma para la Inseminación Instrumental de la Abeja Melífera Indica (*Apis cerana indica* Fabricius 1789). *In.*: XXXIV Congreso Internacional de Apicultura. Lausana, Suiza. Editorial Apimondia. Bucarest, Rumania, 78.
- KONOPACKA, Z. (1987) - Biological Quality of Instrumentally Inseminated Queens. *In.*: XXXIth International Apicultural Congress of Apimondia Varsovia, Rusia. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 163-167.
- KONOPACKA, Z. (1991) - Effect of CO₂ and N₂O Anaesthetics on the Results of Instrumental Insemination of Queen Honey Bees. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, **35**: 3-18.
- KUHNERT, M. E. (1990) - La Technique D'Homogeneisation du Sperme D'Abeille. *In.*: Elevage, Selection et Insemination Instrumental des Reines D'Abeilles. J. GUTH. (Ed). Syndicat National D'Apiculture. Paris, Francia, **4**: 102-111.

- KUHNERT, M. E. y LAIDLAW, H. H. (1994) - Simplified Apparatus for Instrumental Insemination of Queen Bees with the "Flexible Insemination Technique". *Apidologie*, **25**(2): 144-154.
- KUHNERT, M. E.; CARRICK, M. J.; ALLAN, L. F. (1989) - Use of Homogenized Drone Semen in a Breeding Program in Western Australia. *Apidologie*, **20**(5): 371-381.
- KUHNERT, T. (1988) - The Pros and Cons of Homogenising Drone Semen - a new technique in practical use. *In.*: Beekeeping in the year 2000. Proceedings of the Second Australian and International Beekeeping Congress. Surfers Paradise, Gold Coast, Queensland, Australia, July 21-26, RHODES, J. W. (Ed). Australia; Internacional Colour Productions Pty. Ltd. for the Federal Council of Australian Apiarists' Associations, 59-61.
- LAIDLAW, H. H., JR. (1989a) - Instrumental Insemination of Honey Bee Queens. Pictorial Instructional Manual. 4ª Edición. Dadant y Sons Inc., Hamilton, Illinois, EE.UU., 144.
- LAIDLAW, H. H., JR. (1989b) - Origin and Development of Instrumental Insemination of Queen Bees. *In.*: The Instrumental Insemination of the Queen Bee. R. F. A. MORITZ (Ed). Apimondia. International Beekeeping Technology And Economy Institute, Bucarest, Rumania, 9-18.
- LAIDLAW, H. H., JR. (1979) - Contemporary Queen Rearing. 1ª Edición. Dadant y Sons Inc., Hamilton, Illinois, EE.UU., 199.
- LAIDLAW, H. H., JR. (1988) - One-piece Queen Holder for MACKENSEN- Type Insemination Device. *Am. Bee. J.*, **128**(4): 281.
- LAIDLAW, H. H., JR.; GOSS, J. R. (1990) - LAIDLAW-GOSS Queen Bee Pre-set Artificial Insemination Instrument. *Am. Bee. J.*, **130**(11): 734-737.
- LOCKE, S. J. (1988) - The Africanized Honey Bee and Queen Production in California. *In.*: Africanized Honey Bees and Bee Mites. NEEDHAM, G. R.; PAGE, R. E., JR.; DELFINADO-BAKER, M.; BOWMAN, C. E. (Ed). Chichester, UK, Ellis Horwood, 199-203.
- LODESANI, M.; NANETTI, A. y CARPANA, E. (1991) - Studio Sull'Attività di Colonie di *Apis mellifera Ligustica* con Regine Inseminate Strumentalmente e con Regine ad Accoppiamento Naturale. *Apicoltura*, **7**: 101-112.
- LUGANSKII, S.N. (1988) - Examination of Pollen for the Fungus *Ascosphaera apis*, a Pathogen of Honeybees. *Veterinariya*, Moscow, USSR, **10**: 41-43.

- LUI, T. P. (1995) - A Possible Control of Chalkbrood and Nosema Diseases of the Honey Bee with Neem. *Can. Beek.*, **18**(5): 107-109.
- LUI, T. P. (1996) - Varroa Mites as Carriers of honey-bee Chalkbrood. *Am. Bee. J.*, **136**(9): 655.
- MACKENSEN, O. y RUTTNER, F. (1976) - Técnica de Inseminación. *In.*: Inseminación Artificial de las Reinas de Abejas. FRIEDRICH RUTTNER. 2ª Edición. Apimondia. Instituto Internacional de Tecnología y Economía Apícolas. Bucarest, Rumania, **5**: 69-86.
- MARÍN, J. L. M.; GARCIA, F. P. y PAJUELO, A. G. (1987) - Sobre el Ciclo Biológico de *Ascosphaera apis*. *In.*: Lo Mejor de Vida Apícola (1982-1986). (Ed.), 144-146.
- MARTÍ, J. I.; DEL CACHO, E.; JOSA, A.; ESPINOSA, E. y MUIÑO-BLANCO, T. (1996) - Plasma Membrane Glycoproteins of Mature and Immature Drone Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Spermatozoa: Lectin-Binding as Seen by Light and Electron Microscopy. *Theriogenology*, **46**: 181-190.
- MESSAGE, D. (1979) - Efeito de Condições Ambientais no Comportamento Higiénico em Abelhas Africanizadas *Apis mellifera*. Ribeirão Preto, S.P., Brasil, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), (MS Thesis), 136.
- MESSAGE, D. y GONÇALVES L. R. (1980a) - Efeito das Condições do Favo Teste no Comportamento Higiénico em Abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). *In.*: Anais do 5º Congresso de Apicultura e III Congresso Latino Ibero-Americano de Apicultura. Viçosa, Brasil, 133-139.
- MESSAGE, D. y GONÇALVES L. R. (1980b) - Efeito das Condições Climáticas e da Colônia no Comportamento Higiénico em Abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). *In.*: Anais do 5º Congresso de Apicultura e III Congresso Latino Ibero-Americano de Apicultura. Viçosa, Brasil, 140-147.
- MILNE, C. P. JR. (1985a) - Laboratory Tests of Honey Bee Hygienic Behavior and Resistance to European Foulbrood. *Am. Bee. J.*, **125**: 578-580.
- MILNE, C. P. JR. (1985b) - Estimates of the Heritabilities of and Genetic Correlation Between Two Components of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Hygienic Behavior: Uncapping and Removing. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **78**: 841-844.
- MILNE, C. P. JR. (1982) - Laboratory Measurement of Brood Disease Resistance in the Honeybee. 1. Uncapping and Removing of Freeze-killed Brood by Newly Emerged Workers in Laboratory Test Cages. *J. Apic. Res.*, **21**: 111-114.

- MILNE, C. P. JR. (1983) - Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Hygienic Behavior and Resistance to Chalkbrood. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **76**: 384-387.
- MOOSBECKHOFER, R. (1991) - Possible Causes of the Increased Incidence of Brood Diseases and the Changes of Recovery. *Bienenwelt*, **33** (1): 5-8.
- MORITZ, R. F. A. (1983) - Homogenous Mixing of Honey Bee Semen by Centrifugation. *J. Apic. Res.*, **22**: 249-255.
- MORITZ, R. F. A. (1984) - The Effect of Different Diluents on the Insemination Success in Honey Bee Using Mixed Semen. *J. Apic. Res.*, **23**: 164-167.
- MORITZ, R. F. A. (1988) - A Reevaluation of the Two-Locus Model for Hygienic Behavior in Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Heredity*, **79**(4): 257-262.
- MORITZ, R. F. A. (1989) - The Insemination Procedure. *In.*: The Instrumental Insemination of the Queen Bee. R. F. A. MORITZ (Ed). Apimondia. International Beekeeping Technology And Economy Institute. Bucarest, Rumania, 65-84.
- MORITZ, R. F. A. (1994) - Selection for Varroaosis Resistance in Honeybees. *Parasitology Today*, **10**(6): 236-238.
- MORITZ, R. F. A. y SOUTHWICK. E. E. (1992) - Bees as Superorganisms. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, Alemania, 395.
- MORSE, R. A. (1994) - Rearing Queen Honey Bees. 2ª Edición. Wicwas Press. Cheshire, Connecticut, EE.UU., 128.
- MOSSADEGH, M. S. y ALIZADEH, A. (1995) - Occurrence of Chalkbrood in *Apis mellifera* in Iran. *J. Apic. Res.*, **34**(2): 53-56.
- MURILHAS, A. M. y GRAÇA, M. J. (1992) - Identificação de Sub-espécies de *Apis mellifera* L. (carnica, caucasica, iberica e ligustica), por Morfometria com Recurso a Análise Computorizada de Imagem. Comunicação pessoal. Universidade de Évora. Évora, Portugal, 13.
- MURRAY, R. (1993) - Chalkbrood disease: the N.Z. Experience. *Australasian Beekeeper*, **94**(12): 497-508.
- NAKANE, T. y KAJIKAWA, K. (1985) - Preventive Measures for Chalkbrood; on Selection of the Most Effective Drug and its Application to Disease Colonies. *In.*: XXXth International Apicultural Congress of Apimondia. Nagoya, Japan. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 248-254.

- NELSON, D. L. y GOCHNAUER, T. A. (1982) - Field and Laboratory Studies on Chalkbrood Disease of Honeybees. *Am. Bee J.*, **122**(1): 29-32.
- NELSON, D. L.; BARKER, R. G.; BLAND, S. E.; SOEHNGEN, U. y CORNER, J. (1977) - Western Canadian Chalk Brood Disease Survey of honey Bees, 1976. *Am. Bee J.*, **117**(8): 494-496.
- NEWTON, D.C., CANTEWELL, G.C., y BOURQUIN, E.P. (1975) - Removal of Freeze-killed Brood as an Index of Nest Cleaning Behavior in Honeybee Colonies (*Apis mellifera* L.). *Am. Bee J.*, **115**(10): 388-406.
- NEWTON, D.C. y OSTASIEWSKI, N. J. JR. (1986) - A Simplified Bioassay for Behavioral Resistance to American Foulbrood in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Am. Bee J.*, **126**(4): 278-281.
- PAGE, R.E. y ERICKSON, E.E. (1988) - Reproduction by Worker Honey Bees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **23**: 117-126.
- EW # 77 PAGE, R.E., JR y LAIDLAW, H. H. JR (1992) - Honey Bee Genetics and Breeding. *In*:: The Hive and the Honey Bee. J. M. GRAHAM (Ed). Dandant y Sons, Inc.. Hamilton, Illinois, EE.UU., 235-260.
- PAIXÃO, V. C. (1974) - Manual do Apicultor. PAIXÃO, V. C. (Ed). Companhia Editora do Minho, Barcelos, Portugal, 1256.
- PRABUCKI, J. y GÓRSKI, R. (1987) - Fumagillin DCH as a Stimulator of the Growth of the Bee Chalk Brood. *In*:: XXXIst International Apicultural Congress. Warsaw, Poland. August 19-25. Apimondia. Publishing House. Bucarest, Rumania, 305-310.
- PRABUCKI, J.; JASINSKI, Z. y CHUDA-MICKIEWICZ, B. (1987) - The Results of Mass Insemination of Bee Queens inseminated Onefold and Twofold and Stocked in Different Ways. *In*:: XXXIst International Apicultural Congress. Warsaw, Poland. August 19-25. Apimondia. Publishing House. Bucarest, Rumania, 122-126.
- PUERTA, P.F.; ALVAREZ, P.F.; RUIZ, B.M.; MARTINEZ, P.P.; SERRANO, F.J.M. Y SALCEDO, M.H.M. (1989) - Contribution to the Study of Aetiology of Chalk Brood Disease in *Apis mellifera*. *Revista Iberoamericana de Micología*, **6**: 17-24.
- RAMIREZ, E.A. (1994) - Las Abejas y sus Enfermedades. *Mundo Ganadero*, **4**: 70-73.
- RATH, W. y DRESCHER, W. (1987) - Krankheitsabwehr im Bienenvolk, Untersucht an der Kalkbrutanfalligkeit Genetisch Unterschiedlichen Bienenmaterials. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung*, **21**(5): 149-152.

- RINDERER, T. E. y COLLINS, A. M. (1986) - Behavioral Genetics. *In.*: Bee Genetics and Breeding. THOMAS E. RINDERER (Ed). Academic Press, Inc., Orlando, Florida, 6: 155-176.
- ROCHA, A. M. M. (1996) - Contribuição ao Estudo da Produção de Mel pela Abelha (*Apis mellifera* L.) na Região de Bragança. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências do Porto, Porto, Portugal, 90.
- ROSÁRIO NUNES, G. F. (1980) - Colmeias Móveis: Tipos Principais e Características Fundamentais *In.*: Curso Intensivo de Apicultura. Sociedade dos Apicultores de Portugal, Lisboa, Portugal, 19-24.
- ROSENTHAL, C.; KAMER, I. y EFRAT, H. (1992) - Micosis y Cosecha de Miel. *Vida Apícola*, 52: 52-56.
- RUTTNER, F. (1961) - Insemination mit Sperma von einem einzigen Drohn. *Bee Genetics*, 2: 15.
- RUTTNER, F. (1988a) - Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, Alemania, 284.
- RUTTNER, F. (1988b) - Breeding Techniques and Selection for Breeding of the Honeybee. The British Isles Bee Breeders Association with Ehrenwirth Verlag, Munich, Alemania, 151.
- RUTTNER, F. (1973) - Die Bienenrassen des Mediterraneens Beckens. *Apidologie*, 4: 171-172.
- RUTTNER, F. (1975) - Races of Bees. *In.*: The Hive and the Honey Bee. Dandant y Sons, Inc., Hamilton, Illinois, EE.UU., 19-38.
- RUTTNER, F. (1987) - Cría de reinas. *In.*: Lo Mejor de Vida Apícola (1982-1986). (Ed)., 119-125.
- RUTTNER, F. y TRYASKO, V. V. (1976) - Anatomy and Physiology of Reproduction. *In.*: The Instrumental Insemination of the Queen Bee. F. RUTTNER. 2ª (Ed). Apimondia. International Beekeeping Technology And Economy Institute. Bucarest, Rumania, II: 11-24.
- RUTTNER, F.; SCHNEIDER, H. y FRESNAYE, J. (1976) - Insemination Apparatus. *In.*: The Instrumental Insemination of the Queen Bee. F. RUTTNER. 2ª (Ed). Apimondia. International Beekeeping Technology And Economy Institute. Bucarest, Rumania, IV: 39-68.

- RUTTNER, H. (1983) - Transport and Introduction. *In* : Queen Rearing. Biological Basis and Technical Instruction. F. RUTTNER (Ed), Apimondia Publishing House, Bucarest, Rumania, IX: 279-294.
- RUTTNER, H. y RUTTNER, F. (1983) - Apimondia Monographs. Reliable Rearing Methods. *In* : Queen Rearing. Biological Basis and Technical Instruction. V. HARNAJ and F. RUTTNER (Eds), Apimondia Publishing House, Bucarest, Rumania, VII: 179-231.
- EN #76 SAMMOTARO, D. (1996) - Mechanisms of Bee Resistance/Tolerance to Varroa Mites. *Am. Bee J.*, 136(8): 567-568.
- SANTANA, R. H. y PÉREZ, A. C. (1993) - Cría Artificial de Reinas en Tenerife. *Vida Apícola*, 58: 49-52.
- SANTIAGO, E.; ALBORNOZ, J.; DOMINGUEZ, A. y IZQUIERDO, J. I. (1986) - Etude Biométrique des Populations D'Abeilles (*Apis mellifera*) du Nord-Ouest de L'Espagne. *Apidologie*, 16: 71-92.
- SCHLEY, P. (1988) - An Important Improvement in the Insemination Technique of Queen Honey Bees. *Am. Bee J.*, 128(4): 282-284.
- SCHLEY, P. y GUTH, J. (1990) - Insemination Instrumentale. *In*. Elevage, Selection et Insemination Instrumentale des Reines D'Abeilles. J. GUTH (Ed). Syndicat National D'Apiculture. Paris, Francia, 4: 61-102.
- SCRIVE, J. (1989) - Une Méthode Originale D'Introduction des Reines. *Revue Française D'Apiculture*, 488: 372-374.
- SEGUÍ-CRESPO, D.; PÉREZ-LAGUILLO, O.; BETANCOURT LÓPEZ, C.; PESANTE, D. y BERRIOS, A. (1991) - Catastro de Hongos Presentes en Colmenas de la Abeja Melífera (*Apis mellifera* L.) en el Area Oeste de Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, 27(1-2): 75-79.
- SHIMANUKI, H.; KNOX, D. A. y FELDLAUFER, M. F. (1992) - Honey Bee Disease Interactions: The Impact of Chalkbrood on Other Honey Bee Brood Diseases. *Am. Bee J.*, 132(11): 735-736.
- SIRERA MORENO, A. y CAÑAS LLORIA, S. (1996) - Aparato de Inseminar y Lugar de Trabajo. *Vida Apícola*, 78: 48-52.
- SKOU, J. P. (1983) - Sporecystsvamene <dash> en Svampefamilie med Speciale i Bier. *Naturens Verden*, 9: 324-335.

- SKOU, J. P. (1985) - Notes on Habitats, Morphology and Taxonomy of Spore Cyst Fungi. *In.*: XXXth International Apicultural Congress of Apimondia Nagoya, Japan. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 260-264.
- SNEDECOR, G.W. y COCHRAN, W.G. (1980) - Statistical Methods. 7ª Edición, Iowa State University Press, Ames, IA, 185.
- SPIVAK, M. y GILLIAM, M. (1993) - Facultative Expression of Hygienic Behaviour of Honey Bees in Relation to Disease Resistance. *J. Apic. Res.*, **32**(3/4): 147-157.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. A.; MELTON, R. y BREYFOGLE, J. (1994) - Honey Bee Hygienic Behavior and Tolerance to *Varroa jacobsoni*. *Am. Bee J.*, **134**(12): 836-837.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. y LAMB, M. (1995) - Frequency of Hygienic Behavior in Naturally Mated Daughters of a Hygienic Breeder Queen. *Am. Bee J.*, **135**: 830-831.
- STEEL, R.G.D. y TORRIE, J.H. (1980) - Principles and Procedures of Statistics. 2ª Ed., McGraw-Hill Company, Nova Iorque, EE.UU., 633.
- STEPHEN, W. P. y FICHTER, B. L. (1990) - Chalkbrood (*Ascosphaera aggregata*) Resistance in the Leafcutting Bee (*Megachile rotundata*). I. Challenge of Selected Lines. *Apidologie*, **2**: 209-219.
- SULIMANOVIC, D. (1989) - Spread of Chalkbrood Disease and its Control in Yugoslavia. *In.*: XXXIInd International Congress of Apiculture Rio de Janeiro, Brasil. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 306-308.
- SULIMANOVIC, D.; GRBIC, D. y TOMAC, I. (1985) - Chalkbrood in Yugoslavia. *In.*: XXXth International Apicultural Congress of Apimondia Nagoya, Japan. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 268.
- SULIMANOVIC, D.; PEROUTKA, M. y KR PAN, Z. (1987) - Field Trial of Enilconazol Efficacy Againsts Chalk-Brood and Tolerability to the Brood, Adult Bees and Queens. *In.*: XXXIst International Apicultural Congress. Warsaw, Poland. August 19-25. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 267.
- SZABO, T. J. y TOWNSEND, G. F. (1974) - Behavioural Studies on Queen Introduction in the Honeybee: 1. Effect of the Age of Workers (from a colony with a laying queen) on their Behaviour Towards an Introduced Virgin Queen. *J. Apic. Res.*, **13**(1): 19-25.
- TABER, S. (1986) - Breeding Bees Resistant to Chalkbrood Disease. *Am. Bee J.*, **126**(12): 823-825.

- TABER, S. (1987) - Test for Resistance to Chalkbrood disease, *Ascosphaera apis*, of Honeybees. *In.*: XXXIst. International Apicultural Congress. Warsaw, Poland. August 19-25. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 145-148.
- TABER, S. (1995) - Mejora de la Salud de las Colonias de Abejas Melíferas. *In.*: XXXIV Congreso Internacional de Apicultura. Lausana, Suiza. Editorial Apimondia. Bucarest, Rumania, 109.
- TABER, S. y GILLIAM, M. (1988) - Breeding Honey Bees for Resistance to Diseases. *Apiacta*, **23**: 3-8.
- TAKAKI, E.; TSUJIKAWA, Y. y FUKAE, Y. (1985) - Mode of *Ascosphaera apis* Infection in the Honeybee and Etiological Study of Abnormal Honeybee Wings. *In.*: XXXth International Apicultural Congress of Apimondia. Nagoya, Japan. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 269-273.
- TAWARA, T. (1985) - Neutralization of Chalkbrood Disease in Honeybees. *In.*: XXXth International Apicultural Congress of Apimondia. Nagoya, Japan. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 274-278.
- TOSCANO, H. y HARRIET, J. (1994) - Variaciones Invernales en las Colmenas. *Vida Apícola*, **63**: 48-55.
- VAILATI, G.; SOMMARUGA, A. y FESTO, N. (1986) - Indagine sullo Sviluppo degli Ovari di Api Regine Allevate nell'Italia Settentrionale. *Ape Nostra Amica*, **8**(6): 29-31.
- VANDENBERG, J. D. y SHIMANUKI, H. (1987) - Technique for Rearing Worker Honeybees in the Laboratory. *J. Apic. Res.*, **26**(2): 90-97.
- VEY, A. (1990) - Recent Researches on Ascospheerosis. *In.* Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology. September 5-7, RITTER, W. (Ed).. Ghent, Belgica, 140-143.
- VLAMINCK, K. y VAN DEN BRANDE, M. (1988) - Enilconazol un Tratamiento Eficaz de la Micosis (*Ascosphaera apis*) del Pollo de Abejas. *In.*: II. Biología y Patología. IVº Congreso Nacional de Apicultura. (Ed). Diputación General de Aragón. Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes. Zaragoza, España, 193.
- WEISS, K. (1984) - Regulierung des Proteinhaushaltes im Bienenvolk (*Apis mellifera* L.) durch Brutkannibalismus. *Apidologie*, **15**: 339-354.

- WILDE, J. (1987) - Development and Productivity of Honeybee Colonies with Naturally and Artificially Inseminated Queens. *In.*: XXXIth International Apicultural Congress of Apimondia. Varsovia, Rusia. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 442-444.
- WINSTON, M.; OTIS, G. M. y TAYLOR, O. R. (1979) - Absconding Behavior of the Africanized Honeybee in South America. *J. Apic. Res.*, **18**(2): 85-94.
- WOYKE, J. (1976a) - Aspectos Genéticos de la Inseminación Instrumental. *In.* Inseminación Artificial de las Reinas de Abejas. F. RUTTNER (Ed.). 2ª. Edición. Apimondia. Instituto Internacional de Tecnología y Economía Apícolas. España, **6**: 93-106.
- WOYKE, J. (1976b) - Historia de la Inseminación Instrumental de la Abeja Melífera. *In.*: Inseminación Artificial de las Reinas de Abejas. F. RUTTNER. (Ed). Apimondia. 2ª Edición. Instituto Internacional de Tecnología y Economía Apícolas. España, **1**: 7-11.
- WOYKE, J. (1988) - Problems with Queen Banks. *Am. Bee J.*, **128** (4): 276-278.
- WOYKE, J. (1989) - Correct Queen Maintenance Before and After Instrumental Insemination. Tested in Egypt. *J. Apic. Res.*, **28**(4): 187-190.
- WOYKE, J. (1991) - Syringe Guide for Instrumental Insemination Apparatus of Queen Bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, **22**(1): 81-85.
- WOYKE, J. y RUTTNER, F. (1976) - Resultados. *In.*: Inseminación Artificial de las Reinas de Abejas. F. RUTTNER. 2ª Edición. Apimondia. Instituto Internacional de Tecnología y Economía Apícolas. España, **6**: 87-92.
- YOSHIDA, K. (1985) - Prevention of Chalkbrood Disease and *Varroa jacobsoni* by Products of Organic Acid Fermentation. *In.*: XXXth International Apicultural Congress of Apimondia. Nagoya, Japan. Apimondia Publishing House. Bucarest, Rumania, 287-289.

VI - ANEXOS

1 - FIGURAS

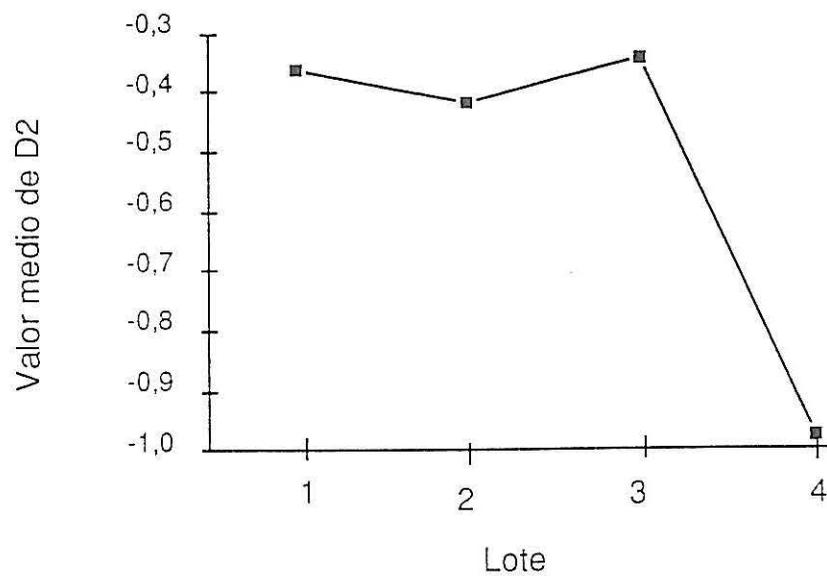


FIGURA 1 - Valor medio de D2 (afcción noviembre/octubre) en relación a los lotes

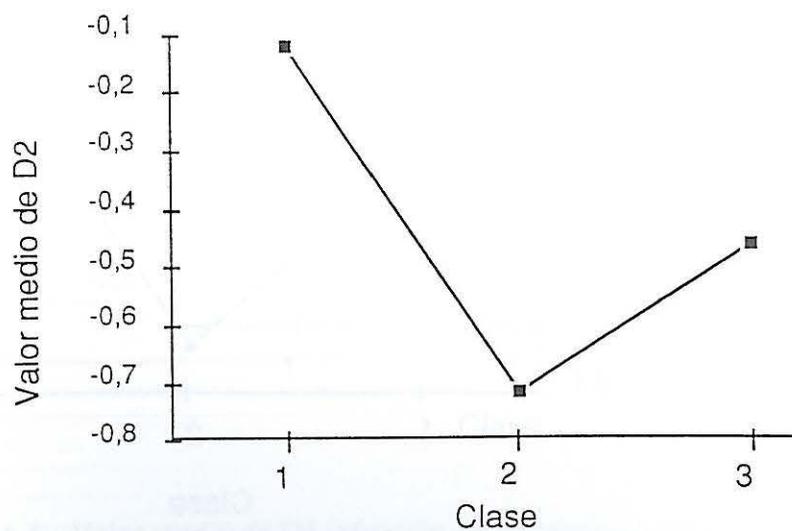


FIGURA 2 - Valor medio de D2 (afcción noviembre/octubre) en relación a las clases

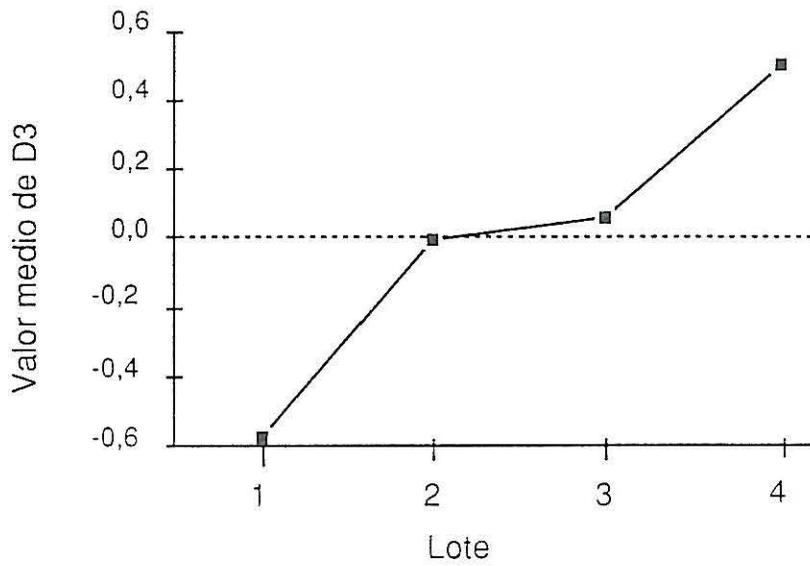


FIGURA 3 - Valor medio de D3 (afección marzo/noviembre) en relación a los lotes

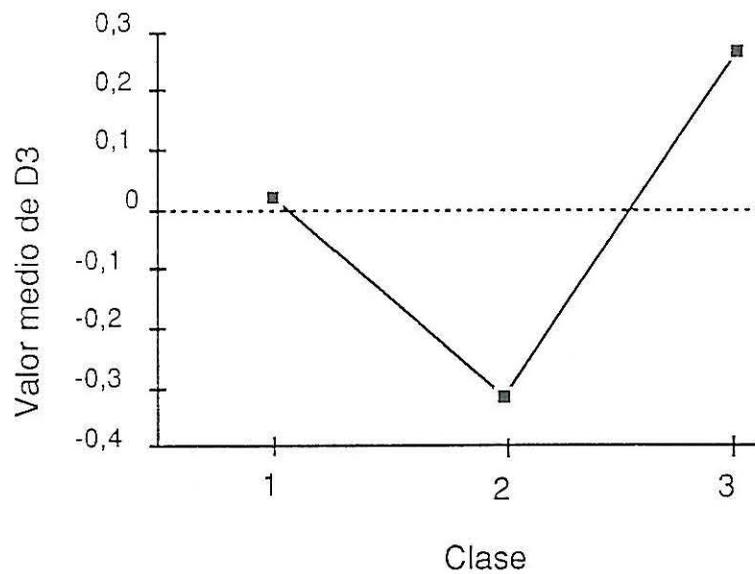


FIGURA 4 - Valor medio de D3 (afección marzo/noviembre) en relación a las clases

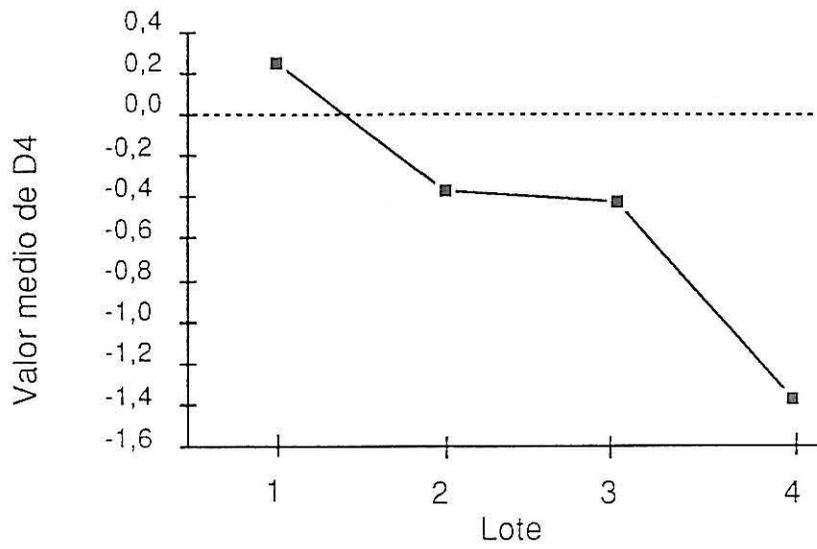


FIGURA 5 - Valor medio de D4 (afección abril/marzo) en relación a los lotes

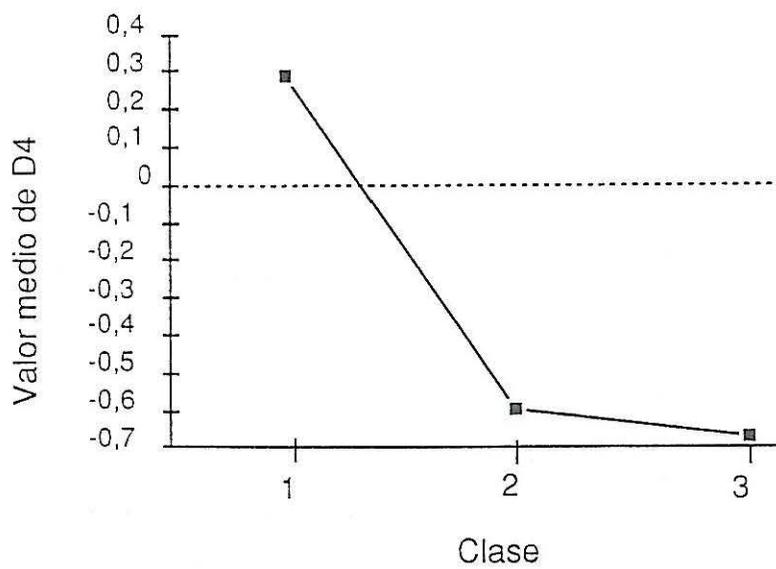


FIGURA 6 - Valor medio de D4 (afección abril/marzo) en relación a las clases

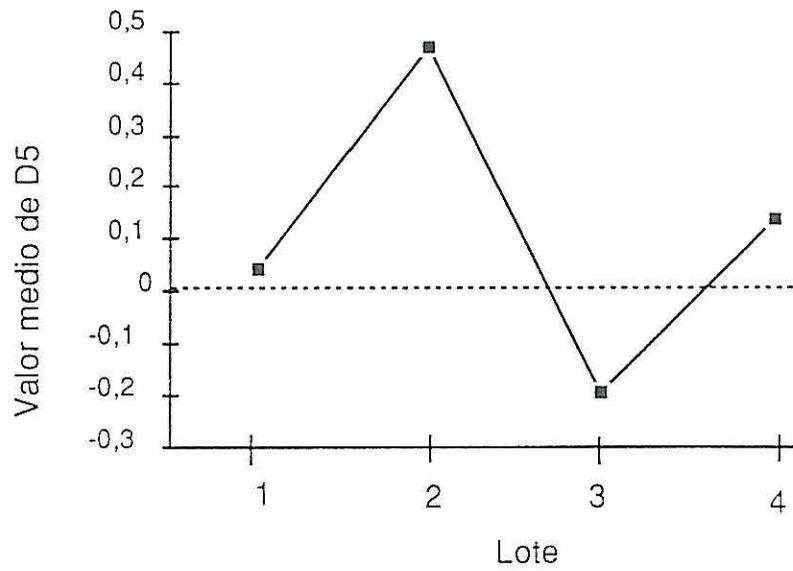


FIGURA 7 - Valor medio de D5 (afección mayo /abril) en relación a los lotes

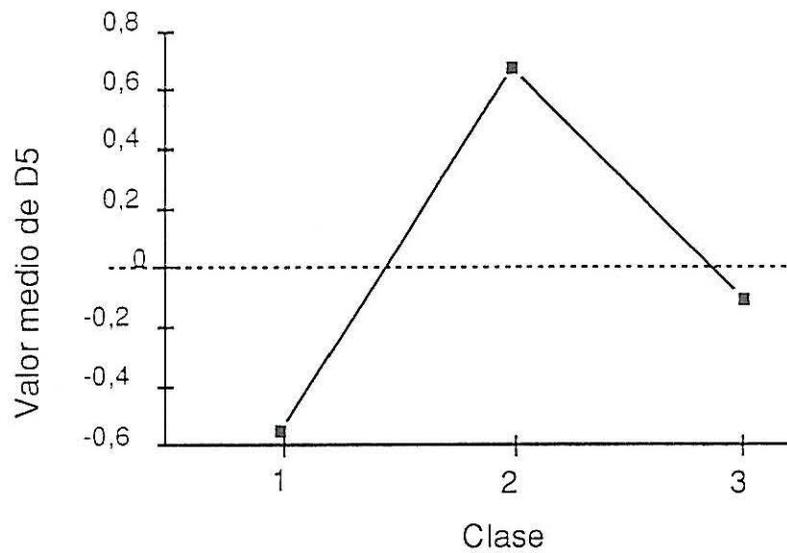


FIGURA 8 - Valor medio de D5 (afección mayo /abril) en relación a las clases

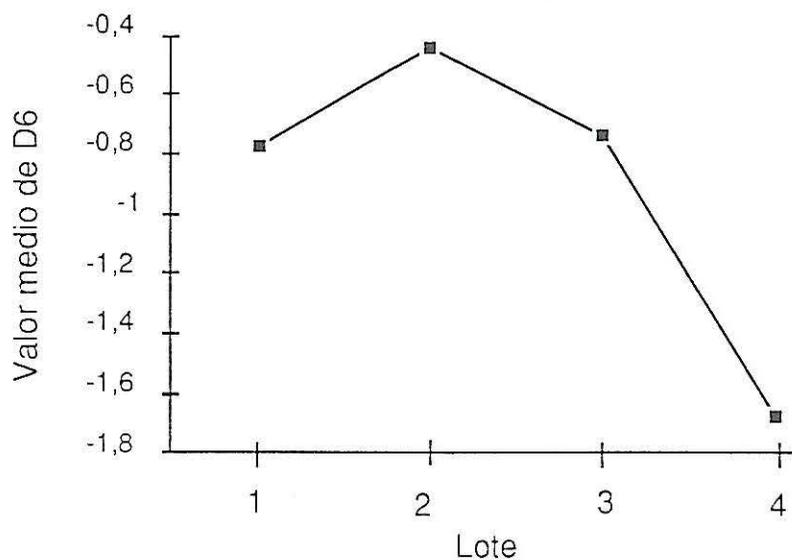


FIGURA 9 - Valor medio de D6 (afección primavera/otoño) en relación a los lotes

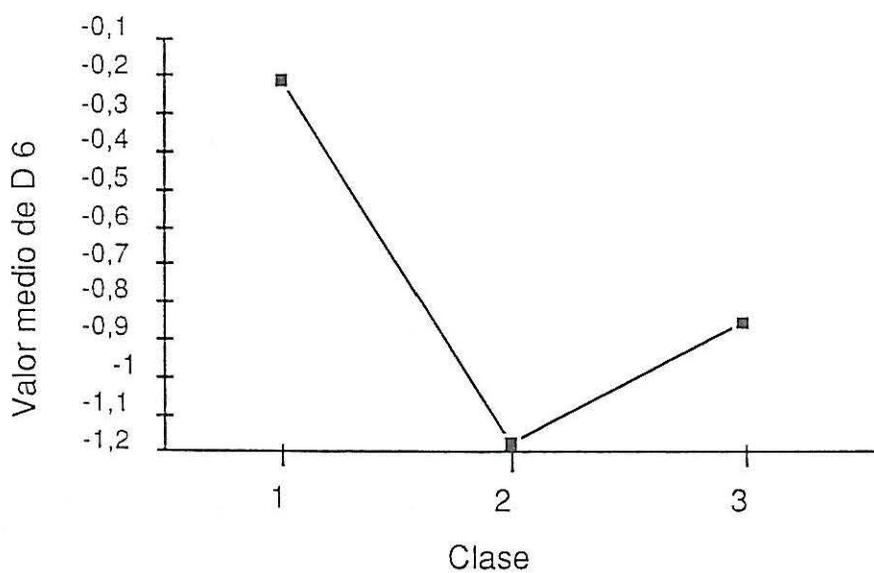


FIGURA 10 - Valor medio de D6 (afección primavera/otoño) en relación a las clases

2 - TABLAS

TABLA nº 1 - Análisis de varianza de la diferencia mensual del grado de afección de la Ascosferiosis

Variable dependiente: D2 (afección noviembre/octubre)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Lote	3	1,045	0,348	0,223	0,8795
Clase	2	1,431	0,715	0,458	0,6365
Lote-Clase	5	1,130	0,226	0,145	0,9801
Error	31	48,362	1,560		

TABLA nº 2 - Las medias de los valores de la diferencia D2 (afección noviembre/octubre) en relación a los lotes

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	11	-0,364	0,627	0,189
2	12	-0,417	1,837	0,530
3	11	-0,345	0,670	0,202
4	8	-0,975	0,908	0,321

TABLA nº 3 - Las medias de los valores de la diferencia D2 (afección noviembre/octubre) en relación a las clases

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	10	-0,120	0,473	0,150
2	18	-0,717	1,583	0,373
3	14	-0,464	0,720	0,192

TABLA nº 4 - Análisis de varianza de la diferencia mensual del grado de afección de la Ascosteriosis

Variable dependiente: D3 (afección marzo/noviembre)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Lote	3	2,473	0,824	0,395	0,7574
Clase	2	0,286	0,143	0,068	0,9339
Lote-Clase	5	6,715	1,343	0,644	0,6681
Error	31	64,668	2,086		

TABLA nº 5 - Las medias de los valores de la diferencia D3 (afección marzo/noviembre) en relación a los lotes

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	11	-0,573	1,305	0,394
2	12	-0,008	1,557	0,449
3	11	0,055	0,809	0,244
4	8	0,500	1,819	0,643

TABLA nº 6 - Las medias de los valores de la diferencia D3 (afección marzo/noviembre) en relación a las clases

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	10	0,020	0,352	0,111
2	18	-0,317	1,845	0,435
3	14	0,264	1,153	0,308

TABLA nº 7 - Análisis de varianza de la diferencia mensual del grado de afección de la Ascosferiosis

Variable dependiente: D4 (afección abril/marzo)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Lote	3	7,894	2,631	1,551	0,2212
Clase	2	0,680	0,340	0,200	0,8196
Lote-Clase	5	2,963	0,593	0,349	0,8788
Error	31	52,609	1,697		

TABLA nº 8 - Las medias de los valores de la diferencia D4 (afección abril/marzo) en relación a los lotes

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	11	0,255	1,925	0,580
2	12	-0,367	0,582	0,168
3	11	-0,418	0,822	0,248
4	8	-1,375	1,271	0,450

TABLA nº 9 - Las medias de los valores de la diferencia D4 (afección abril/marzo) en relación a las clases

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	10	0,290	2,049	0,648
2	18	-0,594	1,000	0,236
3	14	-0,671	0,874	0,234

TABLA nº 10 - Análisis de varianza de la diferencia mensual del grado de afección de la Ascosferiosis

Variable dependiente: D5 (afección mayo/abril)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Lote	3	1,033	0,344	0,080	0,9701
Clase	2	3,618	1,809	0,423	0,6588
Lote-Clase	5	6,228	1,246	0,291	0,9142
Error	31	132,572	4,277		

TABLA nº 11 - Las medias de los valores de la diferencia D5 (afección mayo/abril) en relación a los lotes

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	11	0,045	3,154	0,951
2	12	0,467	2,044	0,590
3	11	-0,191	0,378	0,114
4	8	0,137	0,366	0,129

TABLA nº 12 - Las medias de los valores de la diferencia D5 (afección mayo/abril) en relación a las clases

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	10	-0,550	2,158	0,683
2	18	0,672	2,373	0,559
3	14	-0,107	0,393	0,105

TABLA nº 13 - Análisis de varianza de la diferencia entre estaciones del grado de afección de la Ascosteriosis

Variable dependiente: D6 (afección primavera/otoño)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Lote	3	6,039	2,013	0,897	0,4538
Clase	2	0,645	0,322	0,144	0,8668
Lote-Clase	5	10,845	2,169	0,966	0,4534
Error	31	69,578	2,244		

TABLA nº 14 - Las medias de los valores de la diferencia entre estaciones (D6) (afección primavera/otoño) en relación a los lotes

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	11	-0,774	1,460	0,440
2	12	-0,438	1,268	0,366
3	11	-0,733	1,734	0,523
4	8	-1,680	1,572	0,556

TABLA nº 15 - Las medias de los valores de la diferencia entre estaciones (D6) (afección primavera/otoño) en relación a las clases

Lote	n	Media	Desviación típica	Error de la media
1	10	-0,215	0,845	0,267
2	18	-1,175	1,443	0,340
3	14	-0,854	1,888	0,505