



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Ciencias Biológicas

“Influencia de la dieta en indicadores de capacidad  
de defensa de *Apis mellifera* africanizada a la  
nosemosis en condiciones tropicales”

Tesis que presenta

ALEJANDRO PÉREZ MORFI

En opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Recursos Naturales)

Mérida, Yucatán, México

2020

---

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Alejandro Pérez Morfi** titulado “**Influencia de la dieta en indicadores de capacidad de defensa de *Apis mellifera* africanizada a la nosemosis en condiciones tropicales**” fue realizado en el laboratorio de Química y Microbiología Aplicada a la Ecología y en el de Fisiología Ambiental de Plantas de la Unidad de Recursos Naturales, en la línea Servicios Ambientales de la Biodiversidad, del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección de la **Dra. María Azucena Canto Aguilar**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas dentro de la opción de Recursos Naturales de este Centro.

Atentamente



---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 10 de julio de 2020

---

---

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: \_\_\_\_\_

Alejandro Pérez Morfi

---

---

---

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Nutrición y sanidad de las colonias de *Apis mellifera* a través de los aceites esenciales de la flora nativa y de levaduras simbióticas” (Clave CONACYT: 219922), bajo la dirección de la Dra. María Azucena Canto Aguilar y el Dr. Richard Feldman.

---

---

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Conacyt, por la beca otorgada, sin la cual no habría podido realizar mis estudios en México

Al CICY, por sus instalaciones y equipos, los cuales nos posibilitan la realización de los trabajos de investigación

Al proyecto CONACYT “Nutrición y sanidad de las colonias de *Apis mellifera* a través de aceites de la flora nativa y levaduras simbióticas” (Clave 219922) a cargo de la Dra. María Azucena Canto Aguilar

A los doctores María Azucena Canto Aguilar, Richard Feldman, Luis Medina Medina, José Luis Andrade Torres, miembros de mi comité tutorial y de examen de grado, por su tiempo y sus comentarios en cada tutorial, los cuales ayudaron a darle forma a este trabajo de investigación y finalmente a este documento

A los M. Sc. Rosalina Rodríguez Román y César Canché Collí por su apoyo durante los bioensayos y muestreos

A Tania Gil Cortés por su apoyo incondicional

A mis padres porque aún en la distancia están siempre presentes

---



---

---

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vi
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>3</b>
ANTECEDENTES .....	3
1.1. Nutrición de las abejas .....	3
1.1.1. Calidad nutricional de la dieta de las abejas .....	3
1.1.2. Requerimientos nutricionales de <i>Apis mellifera</i> .....	7
1.1.3. Efecto del consumo del polen en las abejas .....	9
1.1.4. Medio ambiente, diversidad floral y polen .....	10
1.1.5. Suplementos nutricionales .....	12
1.2. Mecanismos fisiológicos e inmunitarios involucrados en la defensa a las enfermedades.....	13
1.3. Nosemosis.....	17
1.3.1. Morfología y patología asociada.....	18
1.3.2. Nosemosis, inmunidad y tratamientos .....	21
1.4. Apicultura en la península de Yucatán.....	23
1.4.1. Historia breve .....	23
1.4.2. Vegetación, clima y apicultura.....	24
JUSTIFICACIÓN .....	26
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>29</b>
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
2.1. Área de estudio.....	29
2.2. Evaluación del efecto de la dieta en la defensa ante la nosemosis .....	29
2.2.1. Colecta del pan de abeja .....	30
2.2.2. Cría y alimentación de las abejas.....	31
2.2.3. Obtención e inoculación de esporas de <i>Nosema spp.</i> .....	32
2.3. Evaluación de las variables de respuesta .....	33
2.3.1. Cuerpo graso.....	34
2.3.2. Cuantificación por PCR en tiempo real de los genes de la inmunidad y especies de <i>Nosema</i> .....	34
2.4. Análisis de datos.....	36
2.4.1. Consumo de alimento y peso del cuerpo graso .....	36
2.4.2. Nivel de infección por nosemosis y expresión de genes del sistema inmune .....	37

---

---

2.4.3. Análisis de supervivencia.....	37
2.4.4. Composición palinológica del pan de abeja .....	39
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>40</b>
RESULTADOS .....	40
3.1. Consumo de alimento .....	40
3.2. Cuerpo graso .....	42
3.3. Expresión génica .....	43
3.4. Nivel de infección.....	45
3.5. Supervivencia .....	46
3.6. Composición polínica del pan de abeja.....	48
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>50</b>
DISCUSIÓN .....	50
4.1. Consumo de alimento .....	51
4.2. Efecto del tipo de dieta en los mecanismos de defensa .....	52
4.3. Nivel de infección.....	54
4.4. Supervivencia .....	56
4.5. Composición polínica del pan de abeja.....	58
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>61</b>
5.1. CONCLUSIONES .....	61
5.2. PERSPECTIVAS .....	62
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>92</b>
ANEXO I. Tipos de granos de polen identificados en el pan de abejas de tres colmenas del apiario “Los africanos” de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, colectado el mes de febrero (temporada de sequía de la región) 92	
ANEXO II. Tipos de granos de polen identificados en el pan de abejas de tres colmenas del apiario “Los africanos” de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, colectado el mes de agosto (temporada de lluvias de la región) 96	



---

---

## LISTA DE ACRÓNIMOS

UER	Unidad de expresión relativa
qtPCR	PCR en tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
DB	Dieta base
JS	Jarabe de sacarosa al 50 %
P-S	Pan de abeja de la temporada de sequía
P-LL	Pan de abeja de la temporada de lluvias
PO	Fenoloxidasa
PPO	Profenoloxidasa
GOX	Glucosa Oxidasa
Vg	Vitelogenina

---

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** Diseño de bioensayo para evaluar el efecto de la calidad nutricional del pan de abeja de las temporadas de lluvia y seca de Yucatán en la resistencia de *Apis mellifera* a la nosemosis. DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y lluvias respectivamente, de Yucatán. .... 30
- Figura 3.1** Predicciones e intervalos de confianza del modelo de regresión logística para el porcentaje de consumo de *Apis mellifera* de cuatro dietas teniendo en cuenta el efecto del tiempo y la presencia de infección con nosemosis. DB: dieta base, J: jarabe de sacarosa, P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias del estado de Yucatán, México..... 41
- Figura 3.2** Predicciones e intervalos de confianza del modelo de regresión logística para el peso del cuerpo graso en relación con la biomasa seca del abdomen de *Apis mellifera* en abejas recién emergidas (R) y abejas alimentadas por siete días con cuatro dietas, a las cuales a su vez, se les evaluó el efecto de la infección con nosemosis. DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias del estado de Yucatán, México..... 43
- Figura 3.3** A: Expresión relativa de los genes de inmunidad, A: Vitelogenina, B: Profenoloxidasa y C: Glucosa oxidasa, en *Apis mellifera* alimentada con DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias del estado de Yucatán, México. Las barras muestran los intervalos inferior y superior de la expresión relativa normalizada. Los asteriscos señalan los tratamientos con efecto significativo en la expresión de los genes, resultante de modelos de regresión lineal para los cuales se tomó como valor de referencia la expresión de los genes correspondientes en abejas libres de nosemosis alimentadas con jarabe de sacarosa..... 45
- Figura 3.4** Cuantificación relativa por PCR en tiempo real del nivel de parasitismo de A: *Nosema apis* y B: *Nosema ceranae* en *Apis mellifera* alimentada con DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias del estado de Yucatán, México. Los asteriscos marcan tratamientos con un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) resultante de una regresión lineal teniendo como referencia las abejas saludables alimentadas con jarabe de sacarosa. .... 46
- Figura 3.5** Análisis estratificado para la evaluación del riesgo de muerte de *Apis mellifera* infestadas por nosemosis al consumir cuatro dietas: DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias, respectivamente, del estado de Yucatán, México. La línea vertical señala el valor de referencia del riesgo de muerte para cada dieta teniendo en cuenta la ausencia de nosemosis..... 48

---

---

**Figura 3.6** Efecto de cuatro dietas y la infección por nosemosis en la supervivencia de *Apis mellifera* del estado de Yucatán, México. Los datos muestran la probabilidad de supervivencia y sus intervalos de confianza al 95 % en un periodo de 7 días para abejas con y sin nosemosis. Valores de  $p$  para la prueba de Mentel-Cox. .... 48

---

---

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Vegetación apícola típica de las cuatro temporadas de cosecha de miel en la península de Yucatán; tomado de Conabio, 2008.....	25
<b>Tabla 2.1</b> Composición de dieta sustituta de polen de van der Steen (2007). .....	32
<b>Tabla 2.2</b> Cebadores de los genes utilizados para evaluar el efecto de la dieta en la capacidad de resistencia de <i>Apis mellifera</i> a la infección por nosemosis, en el estado de Yucatán.....	35
<b>Tabla 2.3</b> Valores de $p$ resultantes de la prueba de residuales de Schoefeld para un modelo de regresión proporcional de Cox en el que se evalúa el efecto de cuatro y dietas y la infección por nosemosis en el riesgo de muerte de <i>Apis mellifera</i> . .....	38
<b>Tabla 3.1</b> Valores del Criterio informativo de Akaike y el Criterio de información bayesiano (AIC y BIC por sus siglas en inglés) y los pesos de Akaike y BIC para cuatro modelos predictores del consumo de <i>Apis mellifera</i> libre y enferma con nosemosis de cuatro dietas durante siete días.....	40
<b>Tabla 4.1</b> Aporte proteico de los ingredientes de la dieta base .....	53

## RESUMEN

La alta biodiversidad y conservación de los ecosistemas naturales en Latinoamérica se considera como una de las fortalezas de la apicultura de la región. La disponibilidad de variados recursos florales posibilita que las abejas puedan cubrir sus requerimientos nutricionales y así poder enfrentar agentes estresantes y enfermedades. Sin embargo, los parásitos *Nosema apis* y *Nosema ceranae* destruyen el epitelio digestivo de *Apis mellifera* dificultando su capacidad de absorción de los nutrientes lo que puede llevar a la muerte de la colmena. A pesar de esto, no existen reportes de muertes de colmenas atribuibles a estos parásitos en América Latina, incluso en Península de Yucatán donde la nosemosis es el segundo problema de salud apícola.

Debido a que la fenología floral está influida por las precipitaciones y que por tanto cambian las combinaciones de polen que colectan las abejas según la estación del año, en este trabajo se comparó el efecto del pan de abeja proveniente de las temporadas de lluvia y sequía del estado de Yucatán respecto a un sustituto proteico del polen y al jarabe de sacarosa, en la infección mixta por *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en obreras de *Apis mellifera* (africanizada). Para ello, se llevaron a cabo bioensayos en los cuales abejas sanas y artificialmente inoculadas con esporas de ambas especies de *Nosema*, fueron alimentadas con las dietas mencionadas.

Se encontró mayor diversidad de granos de polen en el pan de abeja de la temporada de sequía mientras que, hubo mayor dominancia de un tipo de polen en el pan de abeja de la temporada de lluvias. Por otro lado, la infección por nosemosis no influyó en el consumo de alimento, pero si el tipo de dieta y el tiempo, siendo menor el consumo del sustituto proteico. Este último alimento, disminuyó significativamente la probabilidad de supervivencia de abejas sanas e infectadas. Efecto similar tuvo el pan de abejas de la temporada de sequía en abejas enfermas, el cual, contrastantemente, provocó los menores niveles de infección. El efecto de los panes de abeja no difirió en el peso del cuerpo graso, la expresión de la profenoloxidasa y la glucosa oxidasa, pero sí en la vitelogenina y en la supervivencia de abejas infestadas. Nuestros resultados muestran el marcado efecto de la dieta en la supervivencia de *A. mellifera* a la nosemosis en condiciones tropicales.

---



**ABSTRACT**

The high biodiversity and conservation of natural ecosystems in Latin America is considered one of the strengths of beekeeping in the region. The availability of a wide range of floral resources enables bees to meet their nutritional requirements and at the same time to cope better with stressors and diseases. However, the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* destroy the digestive epithelium of *Apis mellifera*, hindering its ability to absorb nutrients, which can lead to the death of the colony. Despite this, there are no reports of colonies deaths attributable to these parasites in Latin America, even in the Yucatan Peninsula where nosemosis is the second bee health problem.

Because floral phenology is influenced by rainfall and therefore the pollen combinations collected by bees change according to the season. This work the effect of two bee bread diets from the rainy and drought seasons of the State of Yucatan was compared to a protein substitute for pollen and sucrose syrup, in the mixed infection with *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in Africanized *Apis mellifera* workers. For this, bioassays were carried out in which the bees were fed with bee bread from the two seasons in question, as well as with sucrose syrup and a protein substitute of bee bread.

When comparing the pollen composition, a greater diversity of pollen grains was found in the bee bread of the dry season, while there was a greater dominance of a type of pollen in the bee bread of the rainy season. On the other hand, the infection by nosemosis did not influence the consumption of food, but the type of diet and the time did, being lower the consumption of the bee bread substitute. This last food significantly decreased the probability of survival of healthy and infected bees. Similar effect had the bee bread from the dry season in infected bees, which, in contrast, caused the lowest levels of infection. The effect of bee breads did not differ in the weight of the fatty body, in profenoloxidase and glucose oxidase expression, but with of vitelogenin. Our results show the marked effect of the diet in *A. mellifera* survival to nosemosis in tropical conditions.

---





## INTRODUCCIÓN

Uno de los servicios ecosistémicos más importantes es la polinización por animales. Entre estos destacan las abejas (Hymenoptera: Apidae) las cuales son consideradas especies claves en los ecosistemas ya que la reducción de sus poblaciones puede llevar a un trastorno en las relaciones planta-polinizador, provocando así, cascadas de extinción (Steffan-Dewenter y Tscharntke 1999). La polinización ocurre como parte del proceso de pecoreo a través del cual las abejas colectan polen y néctar. Estos últimos constituyen las materias primas de la dieta de las abejas, las cuales son transformadas y almacenadas en la colmena como pan de abeja y miel respectivamente. Estos dos productos constituyen el único alimento de las abejas y de su calidad depende que se cubran todos sus requerimientos nutricionales (Wright *et al.*, 2018).

Entre las abejas, *Apis mellifera* destaca como la especie más usada en el mundo para producir miel y polinizar cultivos (Johnson, 2007). El ser una especie generalista la convierte en ideal para llevar a cabo los servicios de polinización de cultivos y en un factor indispensable en una buena cosecha (Waser y Ollerton, 2006). Pero aquello que es beneficioso para nosotros es negativo para la salud de las abejas, al ser expuestas a una amplia gama de condiciones ambientales, (p. ej.: monocultivos), donde no pueden alimentarse correctamente. A lo que se le añade la diseminación y aparición de enfermedades emergentes (principalmente parásitos) fomentado por la apicultura migratoria (Fries *et al.*, 1997).

Entre los parásitos que afectan actualmente a *A. mellifera* destacan *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). Ambos microsporidios, pero en mayor medida *N. ceranae*, ocasionan pérdidas en la apicultura de países de clima templado (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008) donde se ha estudiado que destruyen el epitelio digestivo ventricular de las abejas europeas (Higes *et al.*, 2007) lo que les provoca estrés nutricional (Mayack y Naug, 2009). Lo anterior causa reducción del tiempo de vida de las abejas (Paxton *et al.*, 2007), las induce a salir antes de tiempo

---

---

a pecorear (Goblirsch, Huang y Spivak, 2013) y afecta su capacidad de orientación (Kralj y Fuchs, 2010; Wolf *et al.*, 2014).

Pero los efectos negativos de la nosemosis no se limitan a las abejas europeas. Fleites-Ayil *et al.*, (2018) observaron que las abejas africanizadas de la península de Yucatán, México, también son susceptibles a *N. ceranae*, con efectos similares a los que provoca en abejas europeas al adelantar el inicio del pecoreo y disminuir su tiempo de vida. Sin embargo, a pesar de que en esta región *N. ceranae* constituye la segunda enfermedad más frecuente de *A. mellifera* (UNAM-SENASICA, 2017), hasta la fecha no existen reportes de muertes de colmenas atribuibles a dicho patógeno; situación similar a lo reportado en el resto de Latinoamérica (Vandame y Palacio, 2010).

En este contexto se plantea que la dieta es uno de los elementos claves en la resistencia de *A. mellifera* a la nosemosis (Di Pasquale *et al.*, 2013; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2016). Por tanto, se considera que la preservación de los bosques originales de las cuencas hidrográficas y una menor extensión de tierra dedicada a la agricultura, constituyen algunas de las ventajas de la apicultura latinoamericana con respecto a la de Estados Unidos y Europa (Vandame y Palacio, 2010). Sin embargo, actualmente es práctica común que los apicultores alimenten sus colmenas con dietas suplementarias o sustitutos proteicos del polen (SAGARPA, 2004).

México se encuentra entre los cinco países megadiversos del planeta por su gran riqueza de plantas, de la cual entre el 50 y el 60 % es endémica (CONABIO, 2006). Todo ello hace que sea un escenario ideal para evaluar el efecto de la dieta de las abejas de Latinoamérica en su capacidad de defensa a la nosemosis. De ahí que, en este trabajo, se evaluó el efecto de dos dietas de pan de abeja acopiadas en la península de Yucatán, en abejas africanizadas infectadas por nosemosis. Esta información será el punto de partida para comenzar a comprender el papel de la diversidad de recursos florales tropicales en la nutrición, fisiología e inmunidad de *A. mellifera* y determinar su contribución en el control de los niveles de *Nosema spp.* de la región.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1. Nutrición de las abejas

##### 1.1.1. Calidad nutricional de la dieta de las abejas

Las abejas obtienen sus recursos nutricionales de la miel y el pan de abeja los cuales son el resultado del procesamiento y almacenamiento en la colmena, del néctar y el polen respectivamente. El néctar es transformado en miel a partir de un complejo proceso físico-químico de maduración que involucra los buches de muchas abejas y la eliminación del agua contenida en este por evaporación. El inicio del proceso de maduración del néctar comienza en la abeja pecoreadora (mayor de 20 días de edad) la cual inicia el proceso de concentración del néctar antes de llegar a la colmena. Nicolson y Human (2008) encontraron un aumento en la concentración de azúcar del néctar al comparar el contenido del buche de abejas libando en las flores con aquellas que regresaban a la colmena. Fenómeno solo explicable por la evaporación del exceso de agua del néctar en las estructuras de la boca. Este proceso, que contribuye con la maduración del néctar (Park, 1925), también ha sido descrito como un mecanismo de termo-regulación de la cabeza de la abeja (Heinrich, 1980). Se basa en la regurgitación de una gota de néctar la cual va acompañada de la extensión y contracción de las estructuras de la lengua y contracciones pulsátiles de la aorta. Al hacer esto, la abeja genera una película de néctar la que se enfría al evaporarse el agua contenida en esta que al ser reintroducida en la cabeza la enfría.

Una vez que la abeja pecoreadora llega a la colmena regurgita el néctar contenido en el buche y se lo entrega a través de la trofalaxis (lengua-lengua) a otras abejas del interior del nido. Este proceso se repite varias veces entre abejas nodrizas (con aproximadamente de 1 a 15 días de edad), y cada abeja que está en contacto con el néctar le añade un poco de su saliva la cual contiene la enzima invertasa que participa en la hidrólisis de la sacarosa convirtiéndola en azúcares más simples (Oertel

*et al.*, 1951; Nicolson y Human, 2008). El proceso de maduración finaliza en las celdas de los panales donde se termina de evaporar el exceso de agua por calentamiento de la colmena y el batir de las alas de las abejas.

Durante la visita a las flores para acopiar néctar, el cuerpo de las abejas se cubre del polen de las anteras el cual es atraído por la carga electrostática que rodea a la abeja y queda atrapado en los pelos del exoesqueleto. Con la ayuda de sus patas las abejas se peinan el cuerpo y recogen los granos de polen los cuales son amasados (a partir de la incorporación de saliva y néctar) y almacenados temporalmente en las corbículas del tercer par de patas. Una vez en la colmena, las abejas pecoreadoras depositan el polen corbicular en los panales donde las abejas nodrizas lo ensilan al compactarlo con la cabeza en el fondo de la celda.

La composición microbiológica y bioquímica del polen comienza a cambiar desde el momento en que la abeja pecoreadora lo humedece con néctar para amasarlo y transportarlo en las corbículas (Gilliam, 1979b, 1979a; Gilliam *et al.*, 1989). En este proceso las abejas inoculan el polen con levaduras, bacterias del género *Bacillus* y mohos que en conjunto comienzan el proceso fermentativo que convertirá el polen en pan de abejas (Loper *et al.*, 1980; Vásquez y Olofsson, 2009). Esta transformación ocurre en cuatro fases descritas por Chevtchik (1950, citado por Gilliam, 1979b) y tarda aproximadamente siete días. La primera fase, que dura 12 horas, se caracteriza por el desarrollo de varios grupos de microorganismos entre ellos levaduras. Seguidamente bacterias ácido-lácticas del género *Streptococcus* utilizan factores de crecimiento secretados por las levaduras y los restos de otras bacterias y disminuyen el pH del polen. En la tercera fase desaparecen las bacterias *Streptococcus* que son sustituidas por *Lactobacillus* las cuales son mucho más ácido-resistentes. La última fase se caracteriza por la desaparición de bacterias ácido-lácticas y levaduras por la elevada acidez debido al ácido láctico.

Además de la disminución del pH por la adición de ácido láctico durante la fermentación del polen, se plantea que los microorganismos que participan en este proceso también lo enriquecen con enzimas y sustancias antibióticas (Gilliam *et al.*, 1988; Gilliam *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2014). A ello se le añade la teoría de un posible proceso de predigestión del polen lo que lo hace más nutritivo una vez convertido en

pan de abeja. Esto último concuerda con lo reportado por DeGrandi-Hoffman *et al.* (2016) quienes señalan una mayor cantidad de aminoácidos en el pan de abeja que en el polen de *Rapini broccoli*. Pero a la vez contrasta con los resultados de Human y Nicolson (2006) quienes no encuentran diferencias en la disponibilidad de aminoácidos del polen y el pan de abeja de *Aloe greatheadii*.

La ausencia de diferencias en la composición nutricional entre el polen y el pan de abejas apoya otra línea de pensamiento sobre el pan de abeja. Anderson *et al.*, (2014) plantean que el polen almacenado en la colmena no evolucionó hacia una conversión de nutrientes mediada por microorganismos si no, que es más bien un ambiente generado para la conservación del alimento a partir de entre otros aspectos, la adición de miel, néctar y secreciones salivales de las abejas. Como evidencia estos autores encontraron que i) las abejas prefieren consumir polen fresco (24-72 horas), ii) los granos del polen almacenado mantienen su integridad estructural y conservan el protoplasma a la vez que iii) la comunidad bacteriana de estos es muy similar a la encontrada en el polen recién colectado. Los autores plantean que este último aspecto demuestra la ausencia de una comunidad bacteriana emergente que haya co-evolucionado para predigerir el polen. A pesar de todo lo anterior, los microorganismos en el polen juegan un rol importante en la vida de la colmena a tal punto que, recientemente Steffan *et al.* (2019) propusieron cambiar la clasificación de las abejas de animales herbívoros a omnívoros, basándose específicamente en el aporte proteico que representan para las abejas los microorganismos presentes en el pan de abeja.

Más allá de las diferencias de criterios en cuanto al origen del pan de abejas, este y el polen son fuente de proteínas, lípidos, aminoácidos y vitaminas que las abejas consumen para satisfacer sus requerimientos nutricionales (Roulston y Cane, 2000; Brodschneider y Crailsheim, 2010). Aunque son las abejas pecoreadoras las que acarrear el polen a la colmena, las únicas que lo consumen para su propio desarrollo son las abejas nodrizas. Al hacer un análisis del contenido de polen del sistema digestivo de las abejas Crailsheim *et al.*, (1992) encontraron que su consumo aumenta de forma constante desde que la abeja emerge de la celda alcanzando el máximo entre los 4 y 9 días de edad, posterior a lo cual disminuye hasta aproximadamente los 20 días

de vida, momento a partir del cual es extremadamente baja la presencia de polen en el intestino de las abejas.

Del consumo de polen depende el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas de las nodrizas y con ellas la producción de jalea real (Corby-Harris *et al.*, 2018). Las glándulas hipofaríngeas se encuentran en la cabeza de las abejas y con la jalea real las nodrizas alimentan principalmente a las larvas y a la reina (Wright *et al.*, 2018). Esta última depende exclusivamente de la jalea real para su alimentación, lo que le permitirá poner los huevos necesarios para garantizar el recambio generacional de abejas obreras en la colmena. De ahí que la supervivencia de una colmena depende de que el polen cubra los requerimientos nutricionales de las abejas nodrizas para que el resto de los individuos de la colmena lleven a cabo sus funciones biológicas.

Según la especie de planta de la cual provenga el polen será su aporte nutricional en cuanto a proteínas, lípidos y vitaminas (Andrada y Tellería, 2005; Oliveira *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013) aunque mayormente el criterio sobre su calidad como alimento para las abejas se basa en su aporte proteico (Liolios *et al.*, 2015). Un ejemplo de la variación interespecífica en el contenido de proteínas lo aportan Colwell *et al.*, (2017) quienes encontraron que el polen del arándano azul y de las flores de los sitios de barbecho tiene menor cantidad de aminoácidos y proteínas que el de manzana y arándano rojo, todos evaluados en las provincias marítimas de Canadá. De igual forma se ha encontrado que el polen del maíz (Höcherl *et al.*, 2012), girasol y *Typha spp* (Schmidt *et al.*, 1987) son de pobre calidad nutricional. Mientras que algunas plantas que producen polen de mayor calidad son el trébol (*Trifolium spp.*), la colza (*Brassica napus*), la pera (*Pyrus communis*), almendra (*Prunus dulcis*), *Populus spp.* o lupina (*Lupinus angustifolius*; Pernal y Currie, 2001; Somerville y Nicol, 2006) los cuales tienen mayor disponibilidad de proteínas. Por lo tanto, existen cultivos que las abejas polinizan cuyo polen no es lo suficientemente bueno como para mantenerlas bien alimentadas.

A diferencia de los abejorros (Leonhardt y Blüthgen, 2012; Ruedenauer *et al.*, 2015, 2016) las nodrizas de *A. mellifera* no pueden o no evalúan la calidad nutricional del polen ni la presencia de sustancias tóxicas (Roulston y Cane, 2000; Pernal y Currie, 2001; Corby-Harris *et al.*, 2018) por lo tanto no son capaces de escoger entre un alimento y otro en base a su valor nutricional. No obstante, Pernal y Currie (2001)

---

encontraron que cuando disminuye la cantidad o la calidad de las reservas de polen en la colmena, esta responde aumentando el reclutamiento de nuevas pecoreadoras con lo cual aumenta la entrada de polen. Pero ello no implica que, en las condiciones impuestas por la apicultura migratoria, las abejas van a tener acceso a polen de la calidad adecuada o proveniente de diversas especies de plantas. Por lo tanto, para un mejor manejo de la colmena y lograr tener una amplia población de abejas ha sido necesario conocer las necesidades nutricionales de *A. mellifera* para poder suplirlas cuando la dieta natural no cumpla con las características requeridas.

### **1.1.2. Requerimientos nutricionales de *Apis mellifera***

*Apis mellifera* se encuentra entre las pocas especies de insectos eusociales que se conocen, lo que conlleva a que sus requerimientos nutricionales tienen tres niveles de atención: la colmena, las abejas adultas y la cría (Brodschneider y Crailsheim, 2010). No obstante, dado que la alimentación de las larvas y la reina dependen de las abejas obreras, el estudio de los requerimientos nutricionales y el desarrollo de suplementos alimenticios o sustitutos proteicos del polen, se enfoca en estas últimas.

A pesar de que el criterio en cuanto a la calidad del alimento de las abejas se basa en el contenido proteico, todavía hay incertidumbre respecto a cuanta proteína necesita consumir una abeja al día. En este sentido destacan los trabajos de Loper y Berdel (1980b, 1980a) quienes plantearon que una abeja adulta necesita entre de 0.12 – 1.24 mg de proteína al día, mientras que Brodschneider *et al.*, (2009) reportan una cifra más exacta de 0.87 mg. El contenido proteico de la dieta de las abejas se resalta como un factor importante debido al aporte de nitrógeno. Schmidt y Buchmann (1985) evaluaron la ingesta de nitrógeno de una colmena en una jaula de vuelo, evitando así el sesgo de confinamiento. Estos autores encontraron que durante un periodo de 28 días una abeja adulta consume en promedio 3.07 mg de nitrógeno (obtenido a partir del polen) del cual defeca el 19.5 % en forma de alimento no digerido y ácido úrico.

A pesar de la importancia del contenido proteico en la dieta de las abejas, esta no es la única fuente de nitrógeno ya que el polen también presenta aminoácidos libres (Weiner *et al.*, 2010). De hecho, la cantidad de proteína es menos importante que las cantidades de aminoácidos esenciales presentes en la dieta (De Groot, 1953). Respecto al requerimiento de aminoácidos el trabajo de De Groot, (1952) es de suma importancia.

Este autor encontró que la arginina, histidina, lisina, fenilalanina, triptófano, leucina, isoleucina, treonina y la valina son esenciales para el desarrollo de abejas jóvenes. Mientras que la glicina, alanina, serina, cistina, tirosina, hidroxiprolina, y los ácidos glutámico aspártico no son esenciales. La presencia de estos aminoácidos en la dieta de las abejas jóvenes es indispensable ya de que de ello depende el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas que secretan jalea real.

En contraste, los requerimientos y niveles óptimos de lípidos, vitaminas y minerales en la alimentación de las abejas adultas permanecen relativamente inexplorados. En el caso de los lípidos se ha observado que las abejas colectan polen que presenta una proporción 1:10 de proteínas-lípidos (Avni *et al* 2014). Entre estos, los esteroides son imprescindibles en la dieta de las abejas ya que en sentido general los insectos no pueden biosintetizarlos (Svoboda *et al.*, 1978). Por consiguiente, las abejas transforman los fitoesteroides que obtienen del polen en 24-metilenocolesterol, sitosterol e isofucosterol (Svoboda *et al.*, 1982) los cuales son imprescindibles en el desarrollo larval. Dicha importancia se ve reflejada en que las abejas nodrizas son capaces de alimentar a las larvas con los esteroides que contienen en su cuerpo (Svoboda *et al.*, 1986).

Por otro lado, las vitaminas hidrosolubles son comunes en el polen (Roulston y Cane, 2000). Sin embargo se plantea que algunas, como la vitamina C y otras del complejo B, pueden estar ausentes en el polen ya que pueden ser sintetizadas por los microorganismos simbiotes del sistema digestivo de las abejas (Herbert *et al.*, 1985; Kwong y Moran, 2016). No obstante, la piridoxina (vitamina B6) es esencial para el desarrollo larval (Anderson y Dietz, 1976). Sobre las vitaminas liposolubles en la dieta de las abejas existe poca literatura, pero, aunque no son consideradas esenciales se ha reportado que mejoran la cantidad de cría producida en la colmena (Herbert y Shimanuki, 1978). Por otra parte, aunque el contenido de carbohidratos que presenta el polen puede variar en calidad y cantidad (Franchi *et al.*, 1996), la principal fuente de azúcares de las abejas es la miel. No obstante, se conoce que una abeja adulta necesita aproximadamente 4 mg de azúcar por día para vivir (Barker y Lehner 1974).



### 1.1.3. Efecto del consumo del polen en las abejas

La salud de las colmenas no se define solamente por la ausencia de enfermedades sino también por la presencia de abejas bien nutridas capaces de producir progenie y resistir agentes estresantes como parásitos, infecciones, pesticidas y periodos de escasez. El consumo de polen se ha comprobado influye en el metabolismo potenciando la expresión de peptidasas y de genes vinculados con el metabolismo lipídico y la proteólisis (Alaux *et al.*, 2011, Ament *et al.*, 2011). Además, regula positivamente la expresión de genes que participan en los mecanismos moleculares que contribuyen a aumentar el tiempo de vida de las abejas melíferas. Por otro lado, Alaux *et al.*, (2010) reportan modificaciones de la inmunidad individual y social a partir de dietas poliflorales y monoflorales (de acuerdo a la diversidad de pólenes que las componen), lo que indica que la abundancia y la diversidad de los recursos ambientales puede tener un impacto directo en la salud del polinizador.

Esto último se ve reflejado en trabajos como los de Rinderer *et al.*, (1974) quienes reportaron que el consumo de polen polifloral disminuye la mortalidad de las larvas infestadas con *Bacillus larvae*. Además, se reporta una disminución de la presencia del virus de las alas deformes en la hemolinfa de abejas alimentadas con polen, en comparación con las abejas que consumieron jarabe de sacarosa (JS) o un sustituto comercial del polen (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010). En cuanto a los microsporidios, Rinderer y Elliott, (1977) y Di Pasquale *et al.*, (2013) encontraron que la alimentación con polen aumenta la longevidad de las abejas infectadas por *N. apis* y *N. ceranae* respectivamente. En ambos trabajos los autores destacan la importancia de la composición nutricional del alimento que consumen las abejas. En este sentido enfatizan en el contenido proteico como el principal factor que contribuye a aumentar el tiempo de vida de las abejas frente a esta enfermedad. Efecto similar también fue encontrado por Di Pasquale *et al* (2013) con polen de alto contenido lipídico, así como con la combinación artificial de polen de diferentes orígenes florales.

Por otro lado, ante una agricultura cada vez más tecnificada y dependiente de los pesticidas, pero también de las abejas para la polinización de cultivos, el polen y su calidad también son factores importantes. En este sentido se ha demostrado por ejemplo, que el polen contribuye a reducir la sensibilidad de las abejas a los pesticidas

(Wahl y Ulm, 1983). Además, DeGrandi-Hoffman *et al.*, (2016) plantean que la dieta natural de las abejas en comparación con sustitutos proteicos suministrados por el hombre, puede mejorar la supervivencia a la invernada en países de clima templado, donde este proceso puede provocar la pérdida de entre el 22 y el 36 % de las colmenas (Steinhauer *et al.*, 2014).

En sentido contrario, la poca calidad y diversidad del polen también pueden afectar el tamaño de las glándulas hipofaríngeas y la longevidad de las abejas obreras (Schmidt *et al.*, 1987; Tasei y Aupinel, 2008; Di Pasquale *et al.*, 2013) lo cual a largo plazo puede provocar la muerte de la colmena. Esto se debe a que una afectación en el funcionamiento de las glándulas hipofaríngeas repercute negativamente en la capacidad de la colmena de producir crías, ya que tanto estas como la reina estarían mal alimentadas. Esto, aunado a un menor tiempo de vida de las abejas obreras, llevaría a la reducción del tamaño poblacional de la colmena y eventualmente a su muerte.

#### **1.1.4. Medio ambiente, diversidad floral y polen**

Es posible que la evolución de conductas de almacenamiento y preservación de los alimentos de *A. mellifera* (Anderson *et al.*, 2014) así como sus hábitos de pecoreo generalistas reflejen la presión de selección a las que estuvieron sometidas, frente a condiciones ambientales cambiantes en las que la disponibilidad y diversidad de polen variaban temporalmente llegando incluso a ser nula (p. ej.: los inviernos). Se conoce que una colmena de abejas europeas en ambientes templados colecta entre 15 y 30 kg de polen anualmente, pero mantiene una reserva constante de 1 kg de pan de abeja (Winston, 1991). Por tanto, una colmena necesita un abastecimiento continuo de polen para satisfacer esta demanda y con ella sus necesidades de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. De ahí que los comportamientos de almacenamiento y preservación de los alimentos representan entonces, una ventaja adaptativa que le permite a las abejas melíferas disponer de varias fuentes de alimento en un momento dado, teniendo en cuenta que la diversidad y disponibilidad de polen están condicionadas por el paisaje alrededor de la colmena y la estacionalidad (Avni *et al.*, 2009; Di Pasquale *et al.*, 2016).

Las abejas melíferas pecorean en un área promedio de 10 km<sup>2</sup> alrededor de la colmena, superficie en la que colectan entre 156 y 248 g de polen por día (Dimou y

Thrasylvoulou, 2007a). En dicho volumen pueden aparecer varias especies pero se ha encontrado que de ellas solo de 5 a 20 representan más del 1 % de la muestra (Dimou y Thrasylvoulou, 2007b; Avni, Dag y Shafir, 2009). A pesar de que puede parecer poca variedad ya que una colmena puede llegar a tener 60 mil individuos, las abejas invierten mucha energía en mantenerla. Se ha observado que ante paisajes estructuralmente simples, las abejas incrementan significativamente el esfuerzo de pecoreo al aumentar la distancia a la que viajan para coleccionar polen (Steffan-Dewenter y Kuhn, 2003; Danner *et al.*, 2014). Lo anterior ocurre como respuesta compensatoria a la poca diversidad del paisaje y demuestra la preferencia de las abejas por dietas de polen más diversas (Schmidt, 1984; Schmidt *et al.*, 1987). Una dieta resultante de la mezcla de polen de diferentes orígenes florales constituye, por tanto, un menor riesgo en la nutrición de la colmena ya que un tipo de polen puede suplir las carencias nutricionales de otro.

El aporte nutricional del polen depende del tipo de planta del que provenga y varía, con rangos reportados de 16.8 a 25.9% de agua, 0.17 a 13.4% de grasa, 12.6 a 29.6% de carbohidratos y 2.9 a 35,5% de proteína (Day *et al.*, 1990; Schmidt y Buchmann, 1999). Por lo que es posible encontrar ambos extremos: polen con poco aporte nutricional como el de maíz o de las asteráceas debido a su bajo aporte proteico (Roulston *et al.*, 2000; Höcherl *et al.*, 2012) o deficiencia en aminoácidos esenciales (Nicolson y Human, 2013), y polen con alto aporte de proteínas como el de la familias Polygonaceae o Scrophulariaceae (Liolios *et al.*, 2015). De ahí que la predominancia en un momento dado de una o varias floraciones de poca calidad, puede representar un problema para la nutrición de las abejas. Sin embargo, este efecto es de por sí temporal e implica que la disponibilidad de polen depende no solo de la diversidad del paisaje sino que también está sujeta a fluctuaciones estacionales (Danner *et al.*, 2017).

El efecto de la estacionalidad sobre la disponibilidad, calidad y diversidad del polen ha sido ampliamente estudiado (Coffey y Breen, 1997; Danner *et al.*, 2016; Di Pasquale *et al.*, 2016). Al respecto se ha reportado la influencia de cultivos como la colza (*Brassica napus*) en Alemania en los hábitos de pecoreo de las abejas durante la primavera en climas templados (Danner *et al.*, 2016). Ello sin disminuir la frecuencia de visita de las abejas durante dicha temporada, a otros tipos de paisajes para mantener la variabilidad del polen. A pesar de esto, se plantea que en climas templados es el verano

el período en el que las abejas acopian mayor diversidad de polen (Bilisik *et al.*, 2008) aunque según Avni *et al.*, (2009) el momento pico de recolección de polen difiere según el sitio de muestreo. El efecto de la temporalidad en climas templados también fue evaluado por Di Pasquale *et al.*, (2016), quienes encuentran en verano una mezcla de polen de menor calidad influida por la floración de maíz (*Zea mays* L.). Esta última mezcla, de un total de seis evaluadas pertenecientes a otras temporadas del año, provocó la menor supervivencia de las abejas que la consumieron.

En cambio, abejas alimentadas con ocho mezclas de polen de las temporadas lluviosa y seca de Brasil, respondieron de manera similar a la calidad y tipo de polen independiente de la temporada, aunque su supervivencia se relacionó positivamente con la cantidad media de proteína consumida (Frias *et al.*, 2016). Ello indica que, aunque las abejas responden de forma similar a la calidad del polen tanto en clima templado y tropical, es probable que existan diferencias en el efecto de la estacionalidad entre dichas condiciones climáticas, sobre la diversidad del polen y su impacto en la salud de las abejas.

### **1.1.5. Suplementos nutricionales**

A pesar de la importancia del polen como dieta proteica de las abejas, este no siempre está presente o en suficiente calidad y cantidad en todas las condiciones ambientales. Por ejemplo, durante las invernadas en los países de clima templado o la producción de miel en los manglares las abejas carecen de polen, mientras que, en la polinización de monocultivos, la calidad de este recurso puede ser pobre. Esto ha llevado al desarrollo de dietas que sustituyan o complementen el polen del que dispone la colmena (Nabors, 2000; Mattila y Otis, 2006; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2008).

Existe una amplia gama de dietas artificiales disponibles actualmente en el mercado, aunque en algunos casos los apicultores prefieren prepararlas ellos mismos a partir de materias primas. Las dietas se pueden clasificar de acuerdo a su objetivo en de sostén, estímulo, suplementaria o sustituta. Generalmente para su conformación se usan la glucosa o la fructosa como fuente de carbohidratos, mientras que, como fuente de proteínas se utilizan levadura (SAGARPA, 2004) o harina de soja (van der Steen, 2007), incluso algunos utilizan leche en polvo; ingredientes a partir de los cuales se producen las conocidas “tortas” proteicas.

Los estudios que comparan los sustitutos proteicos con el polen indican que son equivalentes en palatabilidad (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2008), en el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas en abejas nodrizas (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2012), en los niveles de proteína de la hemolinfa (De Jong *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2013), en la producción de cría y el crecimiento de colmenas (Saffari *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha encontrado que las cargas virales son más bajas en las abejas alimentadas con polen que con sustitutos del polen (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010), probablemente debido a que la alimentación de polen afecta la expresión de genes asociados con la función metabólica e inmune (Alaux *et al.*, 2010, 2011). De ahí que, se hace necesario comparar el efecto del polen y las dietas suplementarias en la respuesta inmune de *A. mellifera*.

## **1.2. Mecanismos fisiológicos e inmunitarios involucrados en la defensa a las enfermedades**

La presencia en la dieta de todos los recursos nutricionales que las abejas necesitan como individuos, constituye la base para el funcionamiento de los elementos fisiológicos e inmunitarios que les confieren la capacidad de enfrentar agentes estresantes y enfermedades. *A. mellifera* en su evolución como insecto social perdió genes relacionados con la inmunidad individual, pero ganó otros involucrados en la resistencia social (Barribeau *et al.*, 2015). Algunas de las formas de resistencia social a enfermedades son conductas como los hábitos higiénicos y el acicalamiento (Ruiz *et al.*, 1998; Arathi *et al.*, 2000). Los primeros consisten en la capacidad que tienen las abejas nodrizas de detectar la cría enferma, parasitada o muerta en el interior de la celda y como respuesta expulsarla de la colmena, interrumpiendo así el ciclo infeccioso de las enfermedades de la cría. Mientras que, a través del acicalamiento una abeja es capaz de removerse a sí misma o a otras abejas, ectoparásitos al morderlos o simplemente quitárselos con las patas.

Además, existen mecanismos de resistencia social con base molecular como la glucosa oxidasa (GOX), enzima cuyos productos participan en el mantenimiento de la asepsia de la colmena. La GOX se encuentra principalmente en las glándulas hipofaríngeas donde cataliza la oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico y

peróxido de hidrógeno (Ohashi, *et al.*, 1999). El ácido glucónico mantiene la miel ácida y, junto con el peróxido de hidrógeno son secretados en el alimento larval (White Jr., *et al.*, 1963) lo cual contribuye a la esterilización de la comida a nivel de colmena.

Pero cuando los parásitos y enfermedades logran traspasar las barreras de defensa social las abejas tienen que enfrentarlos a nivel individual como cualquier otro insecto, proceso integrado por mecanismos de defensa celular y humoral. La primera está mediada por hemocitos (entre cuyas funciones está la fagocitosis; Alaux *et al.*, 2010b), la formación de agregados multicelulares de hemocitos, la encapsulación de parásitos y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Strand, 2008). Mientras que, las defensas humorales incluyen la activación transcripcional de genes que conducen a la producción de péptidos y moléculas efectoras con reconocimiento y propiedades antimicrobianas (Brennan y Anderson, 2004).

Entre los componentes de la inmunidad humoral destacan cascadas enzimáticas como la del sistema fenoloxidasa (PO) la cual tiene un rol importante en los procesos de esclerotización de la cutícula, cicatrización de heridas y como mecanismo de defensa a partir de la síntesis de melanina (Sugumaran, 1988; Brookman *et al.*, 1989). La profenoloxidasa (PPO) es el zimógeno (forma inactiva) de la PO y su proceso de activación inicia cuando los melanocitos reconocen lipopolisacáridos microbianos, glucanos o peptidoglicanos lo cual provoca la activación de serinas proteasas presentes en la hemolinfa de los insectos. Estas serinas proteasas activas cortan la PPO para generar la PO activa.

La PO es una enzima oxidorreductasa que oxida fenoles produciendo quinonas, que luego se polimerizan de forma no enzimática formando el pigmento melanina. Es importante señalar que tanto la melanina como los productos intermediarios de su formación son tóxicos para los microbios. Cuando ocurre la infección por un patógeno o se genera una herida, se produce un proceso inflamatorio. Una vez encontrado el agente externo, los hemocitos se adhieren a este y secretan sustancias quimiotácticas atrayentes a tipos específicos de hemocitos (Wood *et al.*, 2006). En este caso la PO de la hemolinfa se encuentra en oenocitos o células cristal las cuales no son adhesivas (Lavine y Strand, 2002). No obstante, González-Santoyo y Córdoba-Aguilar (2012) plantean que las proteínas quimiotácticas secretadas atraen plasmocitos formándose

una pared multicelular. La melanina entonces se dispone sobre las capas internas del agregado celular y finalmente sobre la parte externa de la pared, proceso este conocido como melanización (Mak y Saunders, 2005). De esta forma, el parásito es neutralizado y se muere por inanición sin poder reproducirse (Gillespie *et al.*, 1997).

Es bien sabido en otros insectos, que el nivel de actividad de la PO puede verse afectado por la calidad de la dieta (Lee *et al.*, 2006; 2008). Sin embargo, en abejas no hay datos concluyentes al respecto, ya que Schmid-Hempel y Schmid-Hempel, (1998) no encontraron un efecto negativo de una nutrición limitada en la capacidad de melanización en abejorros. Mientras que, Alaux *et al.*, (2010b) encontraron cierto efecto de la dieta al aumentar la actividad de la PO en los alimentos con mayor contenido proteico.

Una estructura altamente relacionada con la inmunocompetencia humoral y a la vez influida por la alimentación, es el cuerpo graso. Este es un órgano relativamente grande distribuido por todo el cuerpo de los insectos, preferentemente debajo del tegumento y rodeando el intestino y el órgano reproductor (Brooks, 1985). A diferencia de la estructura sólida del hígado, el cuerpo graso del insecto es un tejido suelto, conformado principalmente por células especializadas llamadas adipocitos y organizado en lóbulos delgados que están bañados por la hemolinfa, lo que le da acceso directo a esta, indispensable para llevar a cabo sus funciones (Arrese y Soulages, 2010). En el caso de las abejas parte del cuerpo graso se encuentra en la zona ventral del abdomen, en el envés de los segmentos 4 al 7, donde forma parte de las glándulas de la cera (Collision, 2015).

El cuerpo graso es un órgano multifuncional donde se almacena el exceso de nutrientes principalmente de lípidos y azúcares (Gilby, 1965; Anand y Lorenz, 2008). Además de su función relacionada con el almacenamiento y la utilización de nutrientes, es un órgano endocrino (Hoshizaki, 2005) y participa en la desintoxicación del metabolismo del nitrógeno (Brooks, 1985). Adicionalmente, es el principal sitio de síntesis de péptidos antimicrobianos (Alaux *et al.*, 2010) de ahí que su estado está relacionado con la salud de las abejas (Brown *et al.* 2003; Doums *et al.* 2002) y es influido por la dieta.

Uno de los productos biosintéticos más importantes del cuerpo graso es la vitelogenina (Vg). La síntesis de esta glucolipoproteína está regulada nutricionalmente, siendo mayor en dietas ricas en proteínas (Alaux *et al.*, 2011) o lípidos (Di Pasquale *et al.*, 2013). A pesar de esto, su expresión disminuye con el envejecimiento de la abeja al estar regulada negativamente por la hormona juvenil (Amdam *et al.*, 2003). Por tanto, cuando una abeja envejece aumenta la cantidad de hormona juvenil y disminuye la cantidad de Vg en la hemolinfa. De ahí que la Vg está relacionada con la determinación de las castas de abejas e influye en su tiempo de vida (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2018), estando en grandes cantidades en abejas nodrizas (jóvenes) y lo opuesto ocurre en las abejas pecoreadoras (viejas). Los resultados de Amdam *et al.*, (2003) sugieren que la Vg, entre otras funciones, participa en la formación de jalea real en las glándulas hipofaríngeas de las abejas nodrizas lo que las convierte en un reservorio de alimento cuando hay escasez. Estos autores también documentan que la regulación negativa hormona juvenil – Vg provoca la apoptosis de hemocitos. A partir de lo cual hipotetizan que, debido al costo energético de mantener el sistema inmune, la disminución de la Vg en abejas viejas puede estar relacionado una mayor privación de nutrientes, así como una menor demanda de nutrientes.

Lo anterior está en concordancia con otros trabajos en los que se encuentran más evidencias de la influencia de la Vg en la inmunidad de las abejas. Salmela *et al.*, (2015) documentaron como la Vg actúa como portadora de señales de cebado inmune, dígase fragmentos de bacterias, de la abeja reina a los huevos. Demostrando así, cómo ocurre la de transferencia inmunitaria transgeneracional en insectos. Sin embargo, las abejas obreras son estériles y no producen huevos en condiciones normales, lo que indicaría que en estos insectos la transferencia inmunitaria transgeneracional dependería sólo de que la reina logre sobrevivir a las enfermedades. De ahí que Harwood *et al.*, (2019) investigaron si las abejas obreras podrían participar en dicho proceso. Estos autores encontraron de manera inicial que fragmentos de bacterias ingeridos por las nodrizas son transportados a sus glándulas hipofaríngeas proporcionando evidencia inicial de que el cebado inmunitario transgeneracional puede funcionar a nivel de colonia en las abejas melíferas.



### 1.3. Nosemosis

La patología de insectos tuvo sus inicios en el desarrollo temprano de la apicultura y la sericultura cuando aquellos que cultivaban abejas y gusanos de la seda encontraron anomalías en estos animales (Gilliam, 1997). En el caso de *A. mellifera* se ha descrito una amplia gama de parásitos y enfermedades de la colmena provocadas, entre otros, por virus, hongos, bacterias, ácaros y polillas (Fries *et al.*, 1997). Pero la apicultura migratoria (Rosenkranz *et al.*, 2010), el traslado de individuos sin un debido control cuarentenario y el mal manejo de las abejas relacionados con la apicultura moderna (Fries *et al.*, 1997), han provocado la intensificación del daño que provocan estas enfermedades y la aparición de otras nuevas. Un ejemplo de la incidencia en la colmena de parásitos ya conocidos y otros nuevos lo constituyen los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*.

Los microsporidios se caracterizan por ser hongos, parásitos celulares obligados y formadores de esporas (Wittner y Weiss, 1999). Se conoce que *N. apis* infecta a *A. mellifera* desde hace más de cien años siendo uno de los primeros microsporidios descritos (Neveu-Lemaire 1938), de ahí que se considera el parásito con el cual la especie coevolucionó. Por otro lado, *N. ceranae* fue reportada por primera vez en 2005 en abejas europeas (Higes *et al* 2006). Originalmente descrita en *Apis cerana* (abeja melífera asiática; Fries *et al.*, 1996), se especula que *N. ceranae* aparece en Europa entre finales de los años '90s y la primera década del actual siglo (Klee *et al* 2007). Sin embargo, Teixeira *et al* (2013) encontraron en antiguas muestras de abejas africanizadas de Brasil, que este parásito aparentemente emergente, está presente en ese país desde al menos 1979, lo que pone en tela de juicio todo lo que se conocía hasta 2005 acerca de la nosemosis. Mientras que, en México *N. ceranae* se encuentra presente desde al menos 1995 (Guerrero-Molina *et al* 2016).

Actualmente, ambas especies tienen distribución global (Paxton *et al.*, 2007) y pueden provocar coinfección en abejas melíferas (Burgher-MacLellan *et al.*, 2010; Forsgren y Fries, 2010). Sin embargo, algunos autores plantean la teoría de que las coinfecciones provocan procesos de selección hacia los individuos más virulentos debido a la competencia por los recursos (Choisy y de Roode, 2010; Bashey *et al.*, 2011). A partir del perfeccionamiento de los métodos de detección y diferenciación en

las dos especies de microsporidios que parasitan a *A. mellifera*, se ha encontrado que *N. ceranae* es la especie predominante en muchas regiones (Williams *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2014), lo que sugiere que puede ser un mejor competidor que *N. apis* (Natsopoulou *et al.*, 2015) y por tanto más virulento.

### 1.3.1. Morfología y patología asociada

Las esporas de ambas especies de *Nosema* se caracterizan por una forma ovo-cilíndrica muy similar, aunque *N. ceranae* es ligeramente más pequeño (4.4 x 2.2  $\mu\text{m}$ ) que *N. apis* (4.4 x 2.2  $\mu\text{m}$ ; Fries *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009). Este género de microsporidios se distingue por presentar núcleos diplocarióticos presentes en todas etapas de desarrollo y un filamento polar característico de las esporas maduras, a lo que se le añade que en el microscopio electrónico las esporas maduras están delimitadas por una exospora densa y una endospora transparente (Larsson, 1986). El extremo anterior de la espora se caracteriza por presentar un disco de anclaje en forma de hongo y el inicio del tubo polar (Higes *et al.*, 2010). Este último se enrolla en la zona anterior y media de la espora siguiendo la periferia de la pared de la misma llegando a rodear el diplocarion. La cantidad de vueltas de enrollamiento es diferente entre especies, siendo de 18 a 21 en *N. ceranae* y 30 en *N. apis* (Fries, 1989; Chen *et al.*, 2009) lo que evidencia la diferencia estructural entre ambas especies. En el extremo posterior se encuentra una vacuola que contiene material floculante o un cuerpo denso compuesto de material tubular que puede aparecer glomerular (Higes *et al.*, 2010).

Al entrar en el intestino medio a partir de la ingestión de alimento o agua contaminada, las esporas se activan por cambios en el pH y la concentración de cationes/aniones, o por aproximación a una posible célula anfitriona (Keohane y Weiss, 1998). El proceso de activación o germinación consiste en la eversión del tubo polar el cual perfora una célula epitelial de la pared intestinal y se inyecta el esporoplasma para comenzar su diseminación. Una vez dentro, el citoplasma que rodea los núcleos del parásito se alarga en una estructura en forma de cinta, la cual se divide formando hendiduras en el plasmalema entre los diplocariontes (Higes *et al.*, 2010). En esta fase, el núcleo de la célula del epitelio digestivo parasitada es desplazado a una posición apical e incluso cambia morfológicamente.

---

Una vez terminada la fase replicativa, de la cual no se conoce la cantidad de ciclos, se comienzan a formar los esporoblastos dentro de los que se forman las estructuras de la espora madura. Tres días después de la infección en el caso de *N. ceranae*, es posible observar esporas maduras dentro de las células infectadas (Higes *et al.*, 2007), las cuales germinarán dentro de la célula parasitada provocando transmisión horizontal a través del epitelio digestivo, proceso descrito tanto para *N. apis* como para *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2010).

A pesar de que ambas especies atacan el sistema digestivo, existen diferencias en cuanto a los signos clínicos observados en las abejas. La infección por *N. apis* se caracteriza principalmente por la presencia de disentería evidente a través de manchas fecales en las estructuras de la colmena (Higes *et al.*, 2008) y abejas arrastrándose. Sin embargo, estos síntomas no aparecen en la parasitosis causada por *N. ceranae*, de hecho se le ha llamado la “nosemosis seca” (Faucon, 2005 en Fries *et al.*, 2006). Otra posible diferencia importante entre estos parásitos es que *N. apis* parece restringir su ciclo de vida a la pared intestinal, mientras que es posible que *N. ceranae* invada otros órganos como las glándulas hipofaríngeas, las glándulas salivares, los túbulos de Malpighi y el cuerpo graso (Chen *et al.*, 2009). Sin embargo, estos resultados deben ser analizados histológicamente ya que no se han detectado esporas de *N. ceranae* en estos tejidos (Higes *et al.*, 2010)

Una de las características más llamativas de los microsporidios es que no presentan mitocondrias, en su lugar tienen un remanente de este organelo llamado mitosoma, el cual no tiene genoma ni capacidad para producir ATP (Katinka *et al.*, 2001; Cornman *et al.*, 2009). A pesar de esta reducción metabólica, Tsaousis *et al.*, (2008) reportaron que otro microsporidio *Encephalitozoon cuniculi*, expresa cuatro transportadores de ATP/ADP en la membrana celular cuando está parasitando las células del hospedero. Lo que indica que estos parásitos utilizan el ATP producido por las mitocondrias del organismo hospedero. Adaptación esta que es posible que también presente *N. ceranae*, ya que se encontró que aumenta la tasa de respiración de la célula parasitada y que presenta gran similitud en los genes de transporte con aquellos encontrados en *E. cuniculi* (Cornman *et al.*, 2009). Además, tiene en su genoma un homólogo a Puf3, familia de proteínas implicadas en la biogénesis y movimiento de las

mitocondrias dentro de la célula (García-Rodríguez *et al.*, 2007; Saint-Georges *et al.*, 2008). Esto último puede ser la causa de observar muchas mitocondrias alrededor del plasmalema del parásito (Higes *et al.*, 2010)

Se ha descrito que junto con el estrés mitocondrial se incrementa el estrés oxidativo de la célula generado por especies reactivas del oxígeno (ROS; Cortassa *et al.*, 2014). En el intestino de las abejas parasitadas por *N. ceranae* ocurre un aumento de la expresión de los genes de “oxidación reducción” lo que indica un incremento de ROS debido a la infección (Dussaubat *et al.*, 2012). En este último trabajo los autores encontraron, además, que la infección provoca desregulación de la expresión de genes vinculados a la fosforilación. Ambos efectos se han encontrado en células del epitelio digestivo de humanos parasitados por *Helicobacter pylori*, donde se plantea que están vinculados al aumento de las mutaciones del ADN mitocondrial (ADN mit; Machado *et al.*, 2009). A lo que se le añade que la infección por *N. ceranae* inhibe la expresión de enzimas de protección al estrés oxidativo (Dussaubat *et al.*, 2012).

El estudio de la nosemosis y particularmente la causada por *N. ceranae* ha cobrado gran fuerza en los últimos años en Europa y América del Norte (Chen y Huang, 2010) debido a la detección de la muerte de miles de colmenas por este parásito principalmente en España (Higes *et al.*, 2008). A partir de estos estudios se ha podido encontrar que al *N. ceranae* destruir el epitelio digestivo de las abejas europeas (Higes *et al.*, 2007), genera estrés nutricional a nivel de organismo (Mayack y Naug, 2009). Todo ello trae como consecuencia la reducción del tiempo de vida de las abejas (Paxton *et al.*, 2007), las induce a salir antes de tiempo a pecorear (Goblirsch *et al.*, 2013) y afecta su capacidad de orientación (Kralj y Fuchs, 2010; Wolf *et al.*, 2014). Sin embargo, existe un gran contraste con la información disponible sobre el efecto que provoca esta enfermedad en los trópicos, donde la mayoría de los trabajos se han limitado a reportar la presencia de una u otra especie, siendo poco documentado su efecto y relación con factores ecológicos internos y externos de la colmena.

Posiblemente la poca disponibilidad de literatura sobre el efecto de la nosemosis en climas tropicales se debe al criterio generalizado de que esta enfermedad no representa un problema para la apicultura de esta región (Wilson y Nunamaker, 1983). Sin embargo, Fleites-Ayil *et al.*, (2018) encontraron que las abejas africanizadas de la

---

península de Yucatán, México, también son susceptibles a *N. ceranae*, con efectos similares a los que provoca en abejas europeas al adelantar el inicio del pecoreo en ocho días y disminuir el tiempo de vida. A lo que se le añade que, en esta región geográfica, *N. ceranae* constituye la segunda enfermedad más frecuente de *A. mellifera* ya que infecta el 64.3% de las colmenas (UNAM-SENASICA, 2017). A pesar de esto, hasta la fecha no existen reportes de mortalidad masiva de colmenas atribuibles a la nosemosis en la península de Yucatán, ni en otras regiones de América Latina (Vandame y Palacio 2010). Todo esto por tanto conduce a cuestionarse qué factores establecen que exista, al parecer, un bajo impacto de la nosemosis en esta región.

### 1.3.2. Nosemosis, inmunidad y tratamientos

A pesar del impacto que tiene la nosemosis en la salud de las abejas, existe poca información sobre su efecto en el sistema inmune de estos insectos (Antúnez *et al.*, 2009). Así como se ha descrito que *N. ceranae*, provoca la desregularización de los mecanismos celulares de resistencia al estrés oxidativo (Dussaubat *et al.*, 2012), se ha descrito que la nosemosis provoca regulación negativa de la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune. En este sentido Chaimanee *et al.*, (2012) encontraron que cuatro genes de la inmunidad humoral, defensina, abaecina, apidaecina e himenoptaecina son regulados negativamente en abejas de menos de seis días de edad inoculadas con *N. ceranae*, pero no así en aquellas de 12 días. Fenómeno que puede estar relacionado con la disminución de la energía invertida en la inmunidad al envejecer la abeja (Amdam *et al.*, 2003).

Sin embargo Chaimanee *et al.*, (2012), no encontraron diferencias en la expresión de los genes eater y Vg entre abejas saludables y enfermas. Resultado que difiere de lo encontrado por Antúnez *et al.*, (2009) quienes detectaron una disminución de los transcritos de Vg en abejas infectadas con *N. ceranae* después de 7 días. De hecho, en este último trabajo los autores plantean que la infección por *N. ceranae* suprime significativamente la respuesta inmune, efecto que no encontraron como resultado de la infección por *N. apis*. A pesar de que *N. ceranae* afecta la respuesta inmune de las abejas infectadas, posiblemente por alteración del metabolismo de aminoácidos (Badaoui *et al.*, 2017), estos insectos no se encuentran totalmente desprotegidos frente a *N. ceranae* ya que existe una correlación positiva entre la

sobrevivencia al parásito y la actividad enzimática de la PO (Di Pasquale *et al.*, 2013). Además, se plantea que es posible que haya variación en la capacidad de las abejas melíferas para defenderse de la nosemosis debido a la variabilidad genética (Chaimanee *et al.*, 2012), fenómeno que ya ha sido descrito en la resistencia a *Paenibacillus larvae* (Oldroyd y Palmer, 2003).

Sin embargo, el período de adaptación de las abejas europeas a *N. ceranae* podría ser muy largo y grandes los costos que implicaría este proceso selectivo debido a la muerte de las colonias sensibles al parásito. Por tanto, no faltan los intentos de encontrar tratamientos a la nosemosis destacando la fumagilina la cual controla los niveles de este parásito pero solo temporalmente (Williams *et al.*, 2011). Sin embargo, las formulaciones de este medicamento disponibles en el mercado contienen la fumagilina como una sal en forma de dicitclohexilamina (DCH por sus siglas en inglés) la cual ha sido reportada como genotóxica en ratones (Kulic *et al.*, 2009) e induce daños en los cromosomas de leucocitos humanos (Stoltz *et al.*, 1970). Por tanto, el uso de fumagilina en la apicultura representa un serio problema para la salud humana ya que el DCH es mucho más estable en la miel que la fumagilina (van den Heever *et al.*, 2015).

Por tanto se mantiene la búsqueda de otras alternativas que permitan el control de la nosemosis (Maistrello *et al.*, 2008). Resultados positivos se han obtenido con el timol aunque se ha encontrado que es tóxico para las abejas (Ellis y Baxendale, 1997). Mientras que, el uso de RNA de interferencia (RNAi) dirigidos específicamente al parásito, parece una propuesta menos agresiva a la salud de las abejas y ha permitido reducir la carga de esporas inoculadas en condiciones de laboratorio, al suprimir la expresión del gen Dicer de *N. ceranae* el cual participa en la síntesis de RNAi del parásito (Huang *et al.*, 2016). Esta técnica también ha sido utilizada para silenciar el gen *cutícula desnuda (nkd)* de las abejas, el cual regula negativamente la actividad del sistema inmune del hospedero (Li *et al.*, 2016). Según los autores, al noquear los transcritos de dicho gen con RNAi aumenta la expresión de varios genes de la inmunidad (Abaecina, Apidaecina, Defensina-1 y PGRP-S2), se reduce el número de esporas y aumenta el tiempo de vida de las abejas enfermas. De igual forma, el uso de las porfirinas PP(Asp)<sub>2</sub> (protoporfirina conjugada con restos de aspartato) y TMePyP, ha demostrado disminuir significativamente el número de esporas en abejas infectadas por

*N. ceranae* sin incrementar la mortalidad de las abejas sanas (Ptaszyńska *et al.*, 2018). De ahí que solo queda esperar por la nueva arma que tendrán los apicultores en el futuro para combatir la nosemosis, deseando que sea inocua tanto para las abejas como para los humanos.

#### **1.4. Apicultura en la península de Yucatán**

##### **1.4.1. Historia breve**

El manejo de las abejas europeas en la región yucateca inició en 1898 cuando estas se importaron por primera vez desde Estados Unidos (Gómez, 1990). No obstante, el proceso adaptativo por parte de los nuevos apicultores no cobró fuerza hasta que en 1911 hacendados del estado de Yucatán traen abejas italianas desde Estados Unidos con la consecuente capacitación de los obreros en el manejo de estas abejas (Labougle y Zozaya, 1986) y la adaptación del manejo a las condiciones de la zona. A pesar de esto, no fue hasta la Segunda Guerra Mundial que la apicultura de la región recibió el impulso necesario para su crecimiento, ello debido a la exportación de miel exclusivamente a Estados Unidos favorecida por la inversión de capital de dicho país que permitió el crecimiento de la producción y la creación de empresas exportadoras (Echazarreta *et al.*, 1997).

Sin embargo, la tenencia de colmenas y el sistema de producción a gran escala e intensivo, controlado por grandes capitales, se desfragmentó y fue evolucionando hasta la estructura actual caracterizada por una apicultura a pequeña escala en la que los campesinos son los propietarios de las colmenas (Echazarreta *et al.*, 1997). A pesar de esto la apicultura yucateca constituye una actividad económica secundaria que se complementa con la agricultura de la milpa maya, el cuidado de animales de traspatio y la forestería (Echazarreta-González, 1999). De ahí que la falta de capacitación de los productores en buenas prácticas de manejo y producción así como la poca organización de los productores (Güemes-Ricalde *et al.*, 2003) acentúan el impacto de las nuevas exigencias del mercado internacional, las enfermedades de las colmenas, la deforestación y fenómenos climáticos todo lo cual disminuye las ganancias económicas, problema este último intensificado por la cadena de intermediarios (Echazarreta-González, 1999; Güemes-Ricalde y Pat-Fernández, 2001; Soto-Muciño *et al.*, 2017).

A pesar de esto la producción de miel de la península de Yucatán representa aproximadamente el 31 % del acopio nacional para un total, por ejemplo, de 22 000 toneladas producidas en la región en 2003 (Sagarpa-CEA, 2003) lo que representa una importante fuente de ingresos de divisas a la economía mexicana. Dicho volumen de producción es en su mayor parte (95%) exportado hacia América del Norte y varios países Europeos (Ricalde *et al.*, 2003) lo que permite la introducción de estas ganancias en la economía familiar de los apicultores mexicanos. Es importante destacar además, que la venta de la miel mexicana en el mercado internacional está respaldada no solo de por grandes volúmenes al representar el 4 % de la miel producida en el mundo (Echazarreta *et al.*, 1997) sino también por su calidad, aromas y sabores frente a mieles de otras regiones del mundo. Queda, por tanto, estimular el consumo nacional lo cual beneficiaría no solo la salud de los mexicanos si no también, la economía de los pequeños productores locales.

### **1.4.2. Vegetación, clima y apicultura**

Debido a amplia gama de condiciones climáticas, de vegetación, suelo y particularidades de la apicultura, México se divide en cinco regiones apícolas: Norte, Centro, Pacífico, Golfo y la península de Yucatán (Labougle y Zozaya, 1986; Labougle, 1991; Cajero Avelar, 1999). Particularmente, la apicultura de la península se sustenta en una diversidad de vegetación natural constituida predominantemente por vegetación secundaria que se desarrolla en las zonas agrícolas dedicadas al cultivo de la milpa, en las selvas medianas caducifolias y bosques tropicales lluviosos con predominancia de las fabáceas (Flores, 1990). De hecho, en la península de Yucatán se ha descrito una amplia diversidad florística con 15 formaciones vegetales entre antropizadas y nativas (Zapata-Bello, 2017).

Dentro de la biodiversidad florística yucateca se han identificado aproximadamente 900 especies útiles para la apicultura (CONABIO, 2018). Además, Villanueva (1999) reportó más de 100 especies de plantas de las que tanto las abejas europeas como africanizadas obtienen polen a lo largo del año. Pero la distribución de esta diversidad de plantas está influida por la topografía, el tipo de suelo y las condiciones climáticas (White y Hood, 2004). La característica climática más notable de la península de Yucatán es un incremento del gradiente de la humedad del noroeste



hacia el sureste (Gunn y Adams, 1981; Folan *et al.*, 1983) llegándose a encontrar ríos lagos, lagunas y zonas pantanosas en los estados de Campeche y Quintana Roo. Lo que a su vez influye en la vegetación, por ejemplo, en el aumento de la altura del dosel de oeste a este (White y Hood, 2004)

Además de la distribución espacial de los recursos florísticos, existe una distribución temporal condicionada por las precipitaciones. En la península de Yucatán la temporada de sequía abarca de noviembre a abril, mientras que la temporada de lluvias ocurre en los meses de mayo a octubre (Batllori-Sampedro *et al.*, 2006). Este régimen de precipitaciones condiciona el calendario apícola de la región al tener en cuenta qué especies de plantas de interés apícola florecen en cada temporada (Tabla 1.1). Información esta, que los apicultores utilizan para para planificar las acciones que deben tomar para un correcto manejo de las colmenas (Echazarreta *et al.*, 1997).

**Tabla 1.1** Vegetación apícola típica de las cuatro temporadas de cosecha de miel en la península de Yucatán; tomado de Conabio, 2008.

	enero-febrero	marzo-julio	agosto-octubre	noviembre-diciembre
Tipo de vegetación apícola característica	Tajonal y otras especies compuestas, las comelinas, verbenáceas, algodones y oréganos silvestres	Cerca de 20 especies de la familia de las Poligonáceas, zapotes, palmas, guayabas y otras especies de arboles	Poca vegetación apícola. Sak katsim ( <i>Mimosa bahamensis</i> ), kanasin ( <i>Lonchocarpus rugosus</i> ) y el sak piixoy ( <i>Trema micrantha</i> )	Enredaderas y bejucos, como xtabentun, calabazas, pasifloras y barbascos

El año apícola en los apicultores yucatecos comienza en noviembre-diciembre meses en los que comienzan a florecer algunos bejucos y plantas trepadoras, principalmente de la familia Convolvulaceae. Este momento es ideal para preparar las colmenas para la cosecha de miel que ocurre entre enero y mayo temporada en la que se extrae el 90 % de la miel producida en la península. Las principales especies que soportan este nivel productivo son *Viguiera dentata* localmente conocida como *taj* y *Gymnopodium floribundum* o Ts'íits'ilché. Posteriormente y ya en la temporada de lluvias florecen principalmente las plantas de la familia Fabaceae cuya miel se considera de menor calidad comparada con las anteriores, por su alta humedad. El calendario

termina en los meses de menor disponibilidad de recursos florales para las abejas (agosto-octubre) en los cuales los apicultores deben procurar el alimento para sus colmenas (Echazarreta *et al.*, 1997).

En los trópicos, la lluvia a través de la liberación del estrés hídrico o la reducción brusca de la temperatura actúa como desencadenante para iniciar las etapas finales del desarrollo de yemas, lo que lleva a una secuencia de antesis sincronizada (Opler *et al.*, 1976), lo cual debe provocar que las abejas tengan mayor disponibilidad de recursos florales en la época de lluvias. Sin embargo, esto contrasta con el hecho de que en la península de Yucatán, cuatro de los cinco meses de la temporada de producción de miel ocurren en la época de sequía (Echazarreta *et al.*, 1997).

### **JUSTIFICACIÓN**

En el estado de Yucatán, la nosemosis está presente en el 64.3% de las colmenas (UNAM-SENASICA, 2017). Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes de muertes de colmenas atribuibles a esta enfermedad en la península, ni ha representado un problema por décadas en otras regiones de América Latina (Invernizzi *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2013).

México, como país megadiverso es el quinto exportador mundial de miel y la península de Yucatán, destaca por sus índices productivos y la calidad de sus mieles. A pesar de que la amplia diversidad florística en la península pone a disposición de las abejas una gran variedad de fuentes de polen, muchos apicultores alimentan sus colmenas con dietas artificiales. Sin embargo, el efecto de ambos tipos de alimentos en la capacidad de resistencia a la nosemosis en la región permanece sin estudiar.

Este trabajo permitirá evaluar la influencia del tipo de dieta en la fisiología y salud de las abejas infectadas por nosemosis en condiciones tropicales. Además, posibilitará entender el papel de la diversidad floral de la región en el enfrentamiento a las enfermedades de *A. mellifera* y determinar su contribución como factor ecológico en los niveles de nosemosis.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del tipo de dieta en indicadores de la capacidad de defensa de *Apis mellifera* africanizada ante la nosemosis en condiciones tropicales?

## HIPÓTESIS

El tipo de dieta influye de forma diferente en los indicadores de la capacidad de defensa de *A. mellifera* infectada por nosemosis en condiciones tropicales. Se espera que las abejas infectadas por nosemosis, pero alimentadas con dietas elaboradas con pan de abeja, tengan mayor:

- i) consumo de alimento,
- ii) peso de los cuerpos grasos,
- iii) expresión de los genes que codifican para la vitelogenina, la profenoloxidasa y la glucosa oxidasa,
- iv) infección por nosemosis,
- v) probabilidad de supervivencia,

que las abejas alimentadas con otro tipo, artificial, de dieta como el jarabe o un sustituto de polen.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dos dietas elaboradas con pan de abeja colectado en el estado de Yucatán en las temporadas de lluvias y seca respectivamente, respecto a un sustituto proteico del polen y al jarabe de sacarosa en la infección mixta por *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en obreras de *Apis mellifera* (africanizada).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar el consumo de alimento por dieta suministrada
2. Evaluar el efecto del tipo de dieta en el peso del cuerpo graso
3. Evaluar el efecto del tipo de dieta sobre la expresión de los genes que codifican para la vitelogenina, la profenoloxidasa y la glucosa oxidasa.
4. Comparar el nivel de infección por *N. ceranae* y *N. apis* según el tipo de dieta suministrada
5. Comparar en condiciones de laboratorio la influencia del tipo de dieta en la supervivencia de *Apis mellifera* infestada por nosemosis
6. Caracterizar la diversidad florística de las dos dietas de pan de abeja provenientes de las temporadas lluviosa y seca de la península de Yucatán

### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo un bioensayo con diseño de bloques al azar con grupos de tratamiento teniendo en cuenta dos niveles anidados: la presencia o no de infección por nosemosis y el tipo de dieta. Botes de 30 abejas conformaron las unidades experimentales, donde las abejas fueron alimentadas durante siete días con JS, un sustituto proteico del polen y pan de abeja de las temporadas de lluvias y sequía del estado de Yucatán. En cada bote se evaluó la supervivencia, el consumo de alimento, y el peso del cuerpo graso. Además, de cada bote se muestrearon abejas para la determinación de los niveles de expresión de los genes que codifican para la profenoloxidasa, la vitelogenina y la glucosa oxidasa, así como los niveles de infección por *N. apis* y *N. ceranae*, todos estos evaluados por PCR en tiempo real.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Área de estudio

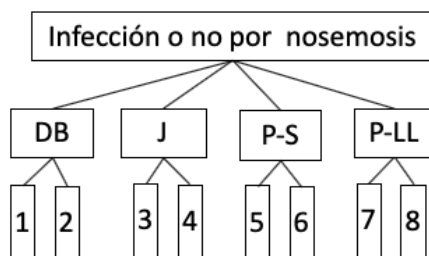
Para este trabajo se utilizó material biológico proveniente del apiario (15 colmenas) experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Yucatán ubicado al sur de la ciudad de Mérida (20°51'51.74"N 89°36'44.41"W). El apiario se caracteriza por ser estático, es decir, está en el mismo lugar durante todo el año por lo que las abejas dependen para su alimentación de la vegetación que crece a su alrededor. Esta vegetación es de tipo selva baja caducifolia (Salvador-Flores y Espejel-Carvajal, 1994) la cual es característica de climas secos y cálidos subhúmedos, y crece sobre suelos planos, calcáreos, poco profundos de color oscuro o rojizo. La altura de los árboles de la selva baja caducifolia varía de 6 a 15 m y casi todos dejan caer sus hojas durante la época más seca del año.

#### 2.2. Evaluación del efecto de la dieta en la defensa ante la nosemosis

Con el fin de comparar la influencia de la dieta en la supervivencia de *Apis mellifera* a la nosemosis, se llevó a cabo un bioensayo con diseño de bloques al azar teniendo como factores (y variables independientes) i) estado de salud de las abejas (presencia o ausencia de nosemosis) y ii) tipo de dieta (Fig. 2.1). Mientras que, las variables de respuesta evaluadas fueron: consumo de alimento, peso del cuerpo gordo, expresión de los genes que codifican para la PPO, GOX y Vg, así como el nivel de infección por nosemosis y la probabilidad de supervivencia. Excepto la supervivencia y el consumo de alimento, todas las variables de respuesta fueron evaluadas el séptimo (último) día de los bioensayos.

Los alimentos suministrados fueron: i) jarabe de sacarosa (JS) al 50 % (control), ii) un sustituto proteico del polen llamado de aquí en adelante Dieta base (DB) y los iii)

panes de abeja correspondientes a las temporadas lluviosa y seca (P-LL y P-S) del Estado de Yucatán. Este experimento se llevó a cabo durante siete días y se repitió dos veces, del 27 de septiembre al 4 de octubre y del 19 al 26 de octubre, ambos en 2019, por lo que se tienen cuatro réplicas por tratamiento. Las unidades muestrales estuvieron conformadas por botes con 30 abejas cada uno. Tanto los panales de cría incubados (ver más abajo) como las abejas adultas en los botes fueron mantenidos a 32.9°C ( $\pm$  0.78 °C) y a una humedad relativa de 64.4 % ( $\pm$  2.6 %). En el caso de los tratamientos estas condiciones eliminan el posible efecto “bote” que pudiera existir por mantener a los grupos de tratamientos divididos en subgrupos de abejas confinadas.



**Figura 2.1** Diseño de bioensayo para evaluar el efecto de la calidad nutricional del pan de abeja de las temporadas de lluvia y seca de Yucatán en la resistencia de *Apis mellifera* a la nosemosis. DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y lluvias respectivamente, de Yucatán.

### 2.2.1. Colecta del pan de abeja

De la cámara de cría de 15 colmenas del apiario de experimentación, se colectaron aproximadamente 200 g de pan de abeja en los meses de febrero y agosto de 2019, representando la época de sequía y lluvias respectivamente. Para extraer el pan de abeja los panales fueron congelados con nitrógeno líquido lo que cristaliza la cera y permite separarla fácilmente del pan de abeja. Las muestras fueron almacenadas a -20°C en atmósfera reducida de O<sub>2</sub>, sustituido por N<sub>2</sub>, ya que Pernal y Currie (2000) en condiciones similares encontraron una pérdida menor al 1 % del contenido proteico en polen almacenado durante un año.

### Análisis palinológico

Con el fin de identificar las familias y especies de plantas que componen el pan de abeja muestreado se llevó a cabo un análisis palinológico. Para ello, se tomaron tres

submuestras de 250 mg cada una, de las dos temporadas evaluadas. El pan de abeja de cada submuestra fue posteriormente diluido en 2 ml de agua destilada por agitación mecánica. Una vez obtenida la dilución, esta fue transferida a un nuevo tubo con el objetivo de separarla de restos de cera o remanentes sólidos del pan de abeja. Posteriormente a cada submuestra se le realizaron tres lavados seriados por centrifugación a 3,000 rpm durante 5 minutos. Después de cada paso de centrifugación, teniendo cuidado de no derramar el sedimento (granos de polen), el sobrenadante se decantó y se volvió a añadir 2 ml de agua destilada. Una vez realizados los lavados el polen fue procesado por el método de acetólisis de Erdtman (1969) modificado por Alfaro-Bates *et al.*, (2010).

Debido a la alta concentración de granos de polen obtenida luego de la acetólisis, una alícuota de cada submuestra fue diluida al 50 % con una solución 1:1 de agua destilada y glicerina. Para la identificación de las especies y familias de plantas a las que pertenecen los granos de polen encontrados que se utilizaron las imágenes e información de referencia de Alfaro-Bates *et al.*, (2010) y Quiroz-García y Arreguín-Sánchez (2008). Además, se utilizó la información disponible en el sitio web Flora Digital de la Península de Yucatán (Herbario CICY, 2010) respecto al calendario de floración de las especies de plantas identificadas. Los conteos de granos de polen se llevaron a cabo en 16 cuadrantes de la cámara de Neubauer, cada submuestra fue evaluada tres veces.

### **2.2.2. Cría y alimentación de las abejas**

Para la obtención de abejas de la misma edad, de 24-48 horas previas al inicio de los bioensayos se extrajeron del apiario ocho panales de cría con aproximadamente 21 días de edad. Los panales fueron colocados en cajas individuales e incubados hasta la emersión de las abejas en las condiciones controladas previamente mencionadas. Una vez emergidas, las abejas se distribuyeron de forma aleatoria en las unidades muestrales utilizando individuos de 24 a 48 horas de edad.

El JS se preparó en una proporción 1:1 de agua y azúcar. Según Williams *et al.* (2013) 100 abejas requieren 5 ml de jarabe al 50 % diariamente para obtener el agua y energía necesaria para vivir, por tanto, en este trabajo las abejas fueron alimentadas con 1.5 ml de jarabe/día. La DB se preparó según van der Steen (2007) como sustituto

proteico del polen (Tabla 2.1; revisado en Williams *et al.*, 2013). Mientras que las dietas de pan de abeja fueron suministradas en una cantidad de 4mg/abeja/día (Di Pasquale *et al.*, 2013). Se seleccionó la cantidad absoluta de 4 mg de pan de abeja/abeja/día ya que Crailsheim *et al.* (1992) calcularon que una abeja consume 3.4 - 4.3 mg de polen al día.

Para suministrar el pan de abeja, este se mezcló con JS teniendo en cuenta las proporciones anteriormente mencionadas para el jarabe obteniéndose una consistencia acuosa. Esta forma de administración es una variante más diluida a la utilizada por Cremones *et al.*, (1998) quienes mezclan el pan de abeja con candy de miel (miel + azúcar) en una proporción 1:1. Todas las dietas se reemplazaron cada dos días, la DB fue suministrada *ad libitum* mientras que la cantidad de pan de abeja suministrado fue ajustada según número de abejas sobrevivientes por bote. En todos los casos se suministró agua *ad libitum*.

**Tabla 2.1** Composición de dieta sustituta de polen de van der Steen (2007).

Componente	Proporción de masa total (g)
Harina de soja (desengrasada)	0.143
Harina de levadura de cerveza	0.095
Caseinato de calcio	0.152
Proteína de suero (whey protein)	0.038
Jarabe de Sacarosa (50% peso/volumen) en agua potable	0.476
Aceite de linaza	0.095

### 2.2.3. Obtención e inoculación de esporas de *Nosema spp*

Debido a que la cantidad de esporas de *Nosema spp.* en el sistema digestivo de las abejas en vida libre varía (Copley *et al.* 2012; Traver y Fell 2011), primero se procedió a determinar en el nivel de infección de las colmenas del apiario de experimentación a partir de conteo directo en cámara de Neubauer. Para ello, de cada colmena se colectaron 20 abejas pecoreadoras a las cuales se le extrajeron los respectivos sistemas digestivos. Para la extracción del sistema digestivo se diseccionó el abdomen del resto del cuerpo, posteriormente se cortó el segmento distal del abdomen y el sistema digestivo se extrajo con una pinza a través de la apertura creada (Fries *et al.*, 2013). El conjunto de intestinos de las abejas de las respectivas colmenas fue macerado y posteriormente se le añadió un mililitro de agua para realizar los



conteos de esporas. De las 15 colmenas del apiario de experimentación se escogieron las dos más infectadas con 7.33 y 8.05 millones de esporas por abeja respectivamente.

Una vez identificadas las colmenas más infestadas, se procedió a determinar las especies de *Nosema* presentes, para lo cual se tomaron 10 abejas pecoreadoras por colmena. El ADN fue extraído usando el kit Quick-DNA™ Tissue/Insect Miniprep Kit Mca. Zymo. número de catálogo D6016, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron mediante PCR convencional a partir del gen de la subunidad 16S del ARNr (Chen *et al.*, 2008). En ambas colmenas seleccionadas se encontró la presencia de *N. ceranae* y *N. apis* lo cual coincide con lo encontrado en otros trabajos donde se reporta la coinfección de ambas especies de microsporidios (Copley *et al.*, 2012). Por tanto, el inóculo suministrado contuvo esporas de *N. apis* y *N. ceranae*.

Estudios preliminares sugieren que la alimentación grupal de esporas de *N. ceranae* es tan efectiva para infectar abejas enjauladas como la inoculación individual (Tanner *et al.*, 2012) por tanto, en este trabajo se utilizó inoculación masiva. La dosis dada fue de aproximadamente 100,000 esporas por abeja, la cual se ha encontrado que es suficiente para infectar individuos enjaulados (Forsgren y Fries, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013). Para obtener la concentración de esporas deseada se colectaron 25 abejas pecoreadoras de las colmenas previamente seleccionadas y se mantuvieron vivas en condiciones controladas. El día de inicio del experimento 10 abejas de la colmena más infestada, fueron sacrificadas y a cada una se le extrajo el sistema digestivo. El conjunto de todos los sistemas digestivos extraídos se maceró y posteriormente se le añadió un mililitro de agua potable para la determinación de la concentración de esporas por conteo directo en cámara de Neubauer. El inóculo fue suministrado a través del JS el cual fue el elemento común en todas las dietas.

### **2.3. Evaluación de las variables de respuesta**

Todas las variables de respuesta fueron evaluadas el séptimo (último) día de los bioensayos. Debido a lo cual la cantidad de abejas muestreadas por variable y grupo de tratamiento estuvo sujeta a la disponibilidad de individuos por bote al final de los bioensayos. La excepción de lo anterior fueron la probabilidad de supervivencia y el

consumo de alimento, cuyos datos fueron colectados durante el transcurso del experimento. Para la probabilidad de supervivencia la evaluación se llevó a cabo por conteo directo de las abejas muertas por día por bote. Mientras que, el consumo de alimento fue cuantificado a partir de la diferencia de peso del recipiente con el alimento, antes de suministrar cada dieta a las abejas y 48 horas después al hacer el recambio. El valor de consumo fue transformado posteriormente a una relación porcentual respecto al peso inicial correspondiente. Por otro lado, y de forma particular, el peso del cuerpo graso fue evaluado tanto al inicio del experimento como el último día.

### **2.3.1. Cuerpo graso**

El cuerpo graso de los insectos es el análogo del hígado de los vertebrados y su cuantificación es una medida indirecta de la inmunocompetencia humoral (Brown *et al.*, 2003; Doums *et al.*, 2002). El peso del cuerpo graso de las abejas en este trabajo se calculó usando el método de extracción por éter descrito por Wilson-Rich *et al.*, (2008). De forma general este método consiste en secar en Silica gel el abdomen de cada abeja a temperatura ambiente durante tres días. Posteriormente los abdómenes son pesados (peso seco) y lavados en éter por 24 horas para eliminar la grasa. Por último, los abdómenes se secan por otros tres días y se evalúa nuevamente su peso. La diferencia entre del peso seco del abdomen y su peso después del lavado con éter, permite inferir el peso del cuerpo graso.

### **2.3.2. Cuantificación por PCR en tiempo real de los genes de la inmunidad y especies de *Nosema***

La evaluación de la expresión de los genes que codifican para la Vg y la PPO, así como ambas especies de *Nosema*, se llevó a cabo en los abdómenes de las abejas muestreadas, mientras que la expresión de la GOX fue evaluada en la cabeza (Tabla 2.2). Para ello las abejas fueron diseccionadas separando el abdomen y la cabeza (se desechó el tórax) e inmediatamente se congelaron las muestras en nitrógeno líquido, las cuales fueron almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento.

La cuantificación de la expresión de cada gen por grupo de tratamiento se realizó en tres réplicas las cuales a su vez fueron evaluadas por triplicado. Para extraer el ARN los tejidos fueron macerados previa congelación con nitrógeno líquido. Una vez triturada la muestra, se procedió a la extracción y purificación del ARN siguiendo el

protocolo de Trizol (Invitrogen). En caso de ser necesario la calidad del ARN se mejoró con el kit RNA Clean & Concentrator™-5 (The Epigenetics Company™) y con tratamiento con DNAsa con el kit Turbo DNA-free™ invitrogen por Thermo Fisher Scientific. La síntesis del ADN complementario (cDNA) se realizó con el kit TaqMan® Reverse Transcription Reagenst (applied biosystems) ajustando la concentración de ARN a 500 ng/μl.

**Tabla 2.2** Cebadores de los genes utilizados para evaluar el efecto de la dieta en la capacidad de resistencia de *Apis mellifera* a la infección por nosemosis, en el estado de Yucatán.

Gen	Cebador	Número en Genbank	Referencia
Profenoloxidasa	Forward: ACAGATCCTGTATGGATTGC Reverse: TCTTGGACGAGTAAAACGAT	-	Desarrollado en el CICY
Vitelogenina	Forward: GTTGGAGAGCAACATGCAGA Reverse: TCGATCCATTCTTGATGGT	-	Tsuruda <i>et al.</i> , (2008)
Glucosa oxidasa	Forward: GAGCGAGGTTTTCGAATTGGA Reverse: GTCGTTCCCCGAGATTCTT	-	Yang <i>et al.</i> , (2005)
<i>Nosema apis</i>	Forward: TGAGGGAGGTCAGGCATGAT Reverse: AGGCCTTGCTTGTAGGAGAAAA	-	Desarrollado en el CICY
<i>Nosema ceranae</i>	Forward: CGGATAAAAGAGTCCGTTACC Reverse: TGAGCAGGGTTCTAGGGA	DQ486027	Chen <i>et al.</i> , (2008)
Rps5	Forward: AATTATTTGGTCGCTGGAATTG Reverse: TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	GB11132	Evans (2006)

El volumen de reacción para el PCR en tiempo real (qtPCR) fue de 20 μL mientras que la concentración de cDNA fue de 500 ng/μl. Cada reacción contuvo 2 μL de cDNA, 1 μL de los segmentos forward y reverse del cebador del gen en cuestión, 6 μL de agua ultra-pura y 10 μL de SYBR GREEN I. Las reacciones de PCR para la Vg, la GOX y la PPO se programaron para correr un ciclo a 95°C durante un minuto y posteriormente 40 ciclos a 95°C por 10 segundos, alternando con un minuto a 62°C para las etapas de desnaturalización y elongación respectivamente. Para los cebadores utilizados para la cuantificación de *N. apis* y *N. ceranae*, la temperatura de elongación fue de 60 y 61°C respectivamente, manteniéndose constante el resto de los parámetros. Los valores de umbral de ciclo (Ct) de los genes se normalizaron a partir del gen de

expresión basal de la subunidad RPS5 ribosomal de *A. mellifera* (Evans *et al.*, 2006), a partir de lo cual se utilizó el método de cuantificación comparativa (método Delta-Delta Ct). Todas las reacciones de qtPCR realizaron en el equipo StepOne (Applied Biosystems).

### 2.4. Análisis de datos

#### 2.4.1. Consumo de alimento y peso del cuerpo graso

Los datos analizados para ambas variables se caracterizaron por estar dados en relaciones porcentuales. El valor de consumo de alimento se evaluó en relación al peso inicial del alimento mientras que el cuerpo graso fue transformado a una relación porcentual respecto a la biomasa seca del abdomen. A partir de esta característica, los análisis del efecto del tipo de dieta y la nosemosis en el consumo de alimento y en el peso del cuerpo graso, se llevaron a cabo con modelos lineares mixtos generalizados con el paquete “lme4” (Bates *et al.*, 2015) de R (R Core Team, 2019) siguiendo una distribución binomial. La función de enlace entre la distribución binomial y la normal es conocida como *logit* ( $E(y) = \log(p/(1-p))$ ) y transforma un valor continuo de probabilidad en un valor en el intervalo de 0 a 1, como son los datos de proporciones modelados en este trabajo (Zuur *et al.*, 2009). Ello permite modelar los valores que tomarán las variables de respuesta (de tipo binomial) a partir del efecto de las variables predictoras.

Tanto para el consumo de alimento y como para el peso del cuerpo graso se generaron identificadores teniendo en cuenta el número de bote y la réplica del experimento los cuales, de forma respectiva, constituyeron los efectos aleatorios de los modelos generados. Estos identificadores permiten distinguir las réplicas de cada tratamiento y evitan la pseudo-replicación dentro del modelo. Por otro lado, en el caso del consumo de alimento se incorporó al análisis el efecto del tiempo, variable que fue incluida tanto en los efectos fijos como en los aleatorios (pendiente aleatoria) ya que se ha demostrado que el consumo de polen en las abejas cambia por día (Crailsheim *et al.*, 1992). Lo anterior implica que para el caso del consumo de alimento el modelo se construye con interceptos y pendientes aleatorias mientras que en el caso del peso del cuerpo graso solo los interceptos son aleatorios.

Seis modelos fueron evaluados a partir de las posibles combinaciones entre las tres variables predictoras (tipo de dieta, infección por nosemosis y tiempo) para analizar su efecto en el consumo de alimento. Para seleccionar el modelo que mejor se ajustó a los datos se utilizaron los Criterios informativos de Akaike y Bayesiano (AIC y BIC, por sus siglas en inglés; Akaike, 1973; Schwarz, 1978) y los pesos correspondientes a estos criterios. El modelo con el menor valor de AIC y BIC es más parsimonioso y por tanto se ajusta mejor a los datos (Burnham y Anderson, 2004; Zuur *et al.*, 2009)

Los pesos pueden interpretarse como la probabilidad de que un modelo sea el mejor, dados los datos y el conjunto de modelos candidatos (Burnham y Anderson, 2001; Wagenmakers y Farrell, 2004). Estos valores para AIC fueron calculados con la función “*akaike.weights*” del paquete “*qpcR*” de R (Ritz y Spiess, 2008). Mientras que los pesos de BIC se calcularon con la función “*bictab*” del paquete “*AICcmodavg*” de R (Mazerolle, 2013). Los pesos son útiles porque pueden usarse para identificar un conjunto de modelos que se ajusten con un 95 % de confianza a los datos obtenidos (Burnham y Anderson, 2002). Dicho conjunto se puede construir sumando, por ejemplo, los valores de peso de Akaike, partiendo del modelo con mayor peso, y agregando el modelo con el siguiente valor más alto hasta que el peso acumulativo exceda 0.95 (Zuur *et al.*, 2009).

#### **2.4.2. Nivel de infección por nosemosis y expresión de genes del sistema inmune**

El análisis de la expresión de los genes del sistema inmune de *A. mellifera* evaluados en este trabajo y el nivel de infección de *Nosema spp.* se llevó a cabo a partir de los valores de Ct (ciclo umbral de amplificación, por sus siglas en inglés) del qtPCR. Dicho análisis se realizó con el paquete estadístico “*pcr*” de R (Ahmed y Kim, 2018) y se tuvo como grupo de referencia las abejas sin nosemosis que consumieron JS. A partir de este paquete se evaluó el efecto de las dietas y estados de salud con un modelo de regresión lineal proporcionado por el propio paquete “*pcr*”.

#### **2.4.3. Análisis de supervivencia**

Con el fin de realizar el análisis de supervivencia se generó una base de datos censurados, teniendo en cuenta las abejas muertas por día y por bote. Los datos censurados toman valores de 1 y 0 lo que describe la ocurrencia o no de un fenómeno,

en este caso la muerte de las abejas durante el periodo de evaluación. A partir de la base de datos generada se utilizó el modelo de regresión proporcional de Cox (Cox, 1972), disponible en el paquete “survival” de R (Therneau, 2015), para analizar el efecto de la nosemosis, el tipo de dieta y la interacción entre estas dos variables en el riesgo de muerte de las abejas. Lo anterior se complementó con el análisis de Kaplan-Meier para evaluar la probabilidad de supervivencia de las abejas por día.

Es importante destacar que el modelo de Cox asume que el riesgo de muerte de un individuo es proporcional al de otro. Esto implica que el riesgo de muerte es independiente del tiempo y en él solo influyen las variables predictoras. Una de las formas de evaluar el cumplimiento de esta asunción es a través de la distribución de los residuales de Schoefeld, los cuales se generan a partir del modelo de Cox y son independientes del tiempo (Schoenfeld, 1982). Por tanto, los residuales de Schoefeld permiten determinar cuál de las variables en el modelo de Cox está influida por el tiempo. Al someter el modelo inicial obtenido con los datos de los experimentos a la prueba de Schoefeld, se observó que la asunción de riesgos proporcionales no se cumplía para las variables evaluadas ya que la hipótesis nula de dicha prueba es el cumplimiento de la asunción de los riesgos proporcionales o lo que es lo mismo, la independencia de las covariables del tiempo (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3** Valores de  $p$  resultantes de la prueba de residuales de Schoefeld para un modelo de regresión proporcional de Cox en el que se evalúa el efecto de cuatro y dietas y la infección por nosemosis en el riesgo de muerte de *Apis mellifera*.

Variable	Valor de $p$
Infección	0.034
Dieta	<0.001
Infección: dieta	<0.001
Global	<0.001

A partir de lo anterior se decidió mejorar el modelo con un análisis estratificado por tipo de dieta (Borges Peña, 2005). Dicho análisis evalúa el efecto que tiene la infección en cada dieta (pero no entre ellas) teniendo como referencia las abejas libres de parasitismo respectivas a cada dieta. La desventaja de este tipo de análisis es que no permite obtener un estimador del efecto de la variable estratificada.

#### **2.4.4. Composición palinológica del pan de abeja**

Con el fin de comparar la diversidad de recursos florares disponibles para las abejas a partir de la identificación y cuantificación de los morfotipos de granos de polen, se emplearon el Coeficiente de Similitud de Jaccard y los Índices de Shannon-Weaver y de diversidad de Simpson. El Coeficiente de Similitud de Jaccard expresa el grado en el que las dos muestras de pan de abeja son semejantes por las especies presentes en ellas, por lo que es una medida inversa de la diversidad, que se refiere al cambio de especies entre las dos temporadas (Peet, 1975; Magurran, 1989). El intervalo de valores para el índice de Jaccard va de 0, cuando no hay especies compartidas entre ambas muestras, hasta 1, cuando tienen la misma composición de especies.

El índice de Shannon-Weaver como medida de heterogeneidad, tiene en cuenta el grado de uniformidad en la abundancia de especies (Magurran, 2004). Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de S, cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Magurran 1988). Por otro lado, el índice de Simpson mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados aleatoriamente de una muestra pertenezcan a la misma especie (o a la misma categoría). Este, toma valores de 0 a 1 de la forma en que mientras más se acerca el valor de 1, menor es la diversidad del hábitat. El índice de Jaccard fue calculado con el paquete “fossil” de R (Vavrek, 2011) mientras que los índices de Shannon-Weaver y Simpson con el paquete “vegan” (Dixon, 2003) del mismo programa.

## CAPÍTULO III

## RESULTADOS

## 3.1. Consumo de alimento

Entre los cinco modelos evaluados para analizar el efecto del tipo de dieta, la infección por nosemosis y el tiempo en el consumo de alimento, el que mejor se ajustó a los datos obtenidos fue el más sencillo (infección + tiempo + dieta) el cual tuvo los menores valores de AIC y BIC (Tabla 3.1) y un peso de AIC 1.42 veces mejor que el segundo, pero 7.4, 7.8 y 665.1 veces mejor que los tres restantes respectivamente. Así mismo los dos primeros modelos tienen pesos de BIC mayores de cero. En conjunto, los resultados de AIC y BIC indican que la interacción entre infección y tiempo apenas afecta el resultado del modelo, y que las otras posibilidades de interacción entre variables disminuyen la capacidad predictora del modelo.

**Tabla 3.1** Valores del Criterio informativo de Akaike y el Criterio de información bayesiano (AIC y BIC por sus siglas en inglés) y los pesos de Akaike y BIC para cuatro modelos predictores del consumo de *Apis mellifera* libre y enferma con nosemosis de cuatro dietas durante siete días.

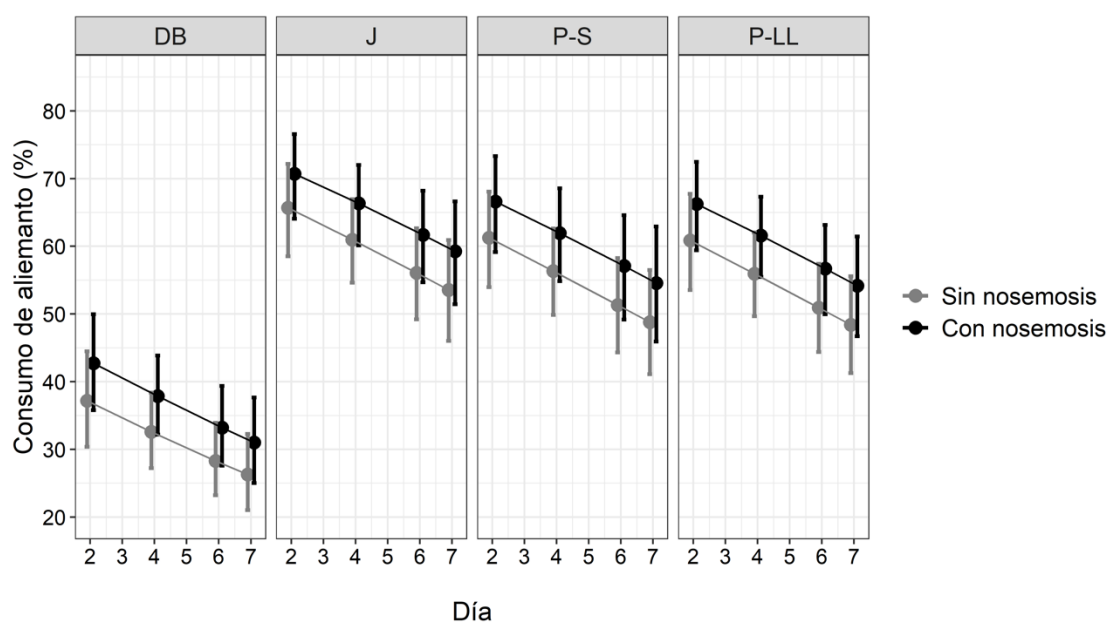
Modelo	Interacción entre covariables	AIC	Pesos de Akaike	BIC	Pesos de BIC
1	infección + tiempo + dieta	1460.5	0.5075	1485.32	0.85
2	infección * tiempo + dieta	1461.2	0.3577	1488.79	0.15
3	Infección + tiempo * dieta	1464.5	0.0687	1497.60	0
4	Infección * dieta + tiempo	1464.6	0.0653	1497.76	0
5	infección * tiempo * dieta	1473.5	0.0008	1525.98	0

A partir del modelo de regresión con distribución binomial que mejor se ajustó a los datos, se obtuvo una clara diferenciación en el consumo de la DB y los otros tres alimentos. Según el modelo, la DB es el único alimento que las abejas, independientemente de su estado de salud, no consumirán más del 50 % del total suministrado (Fig. 3.1). Mientras que, las abejas consumirán más de la mitad de las otras dietas hasta el cuarto día de experimento. De hecho, se observa que el modelo



genera un patrón muy similar en el consumo de estas tres, aunque ligeramente mayor para el JS que para los panes de abeja.

Entre los resultados obtenidos resalta además que, en nuestras condiciones experimentales, las abejas enfermas consumen en promedio 5.46 % más alimento, que aquellas abejas libres de la enfermedad. Además, se constata en una clara tendencia a la disminución del consumo en el tiempo, con una reducción diaria del 52 % respecto a lo consumido en el día anterior, independientemente de la presencia de infección (Fig. 3.1).

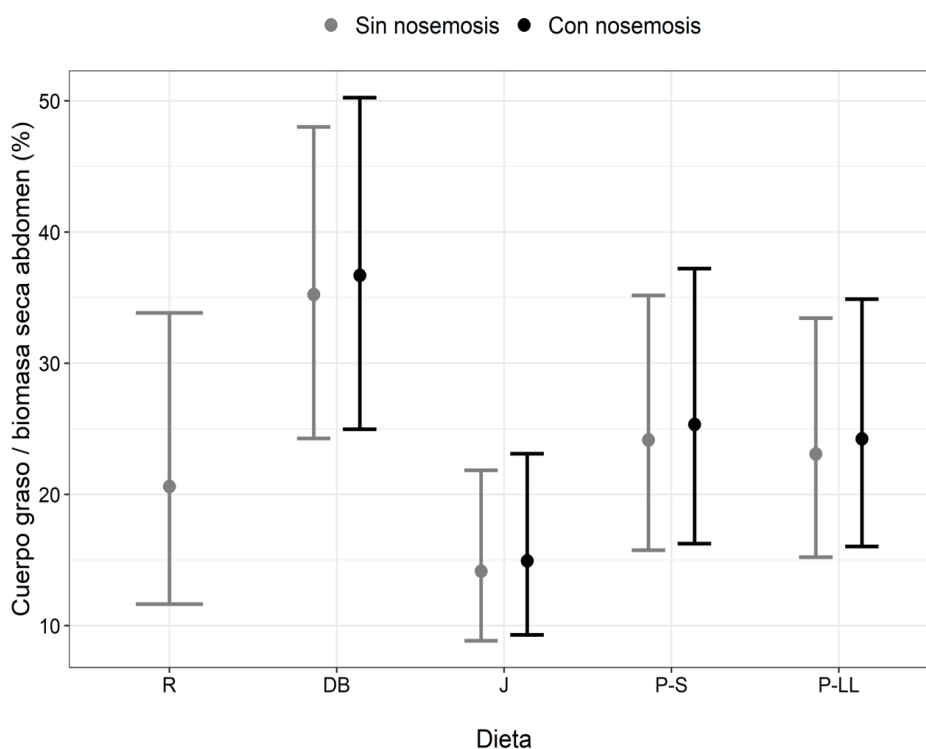


**Figura 3.1** Predicciones e intervalos de confianza del modelo de regresión logística para el porcentaje de consumo de *Apis mellifera* de cuatro dietas teniendo en cuenta el efecto del tiempo y la presencia de infección con nosemosis. DB: dieta base, J: jarabe de sacarosa, P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias del estado de Yucatán, México.

### 3.2. Cuerpo graso

El cuerpo graso fue evaluado como la relación porcentual entre su peso y el de la biomasa seca del abdomen de la abeja a través de un modelo de regresión binomial. Al igual que lo ocurrido con el consumo de alimento, el modelo más sencillo (infección + tipo de alimento; AIC = 6717.7) se ajustó mejor a los datos que aquel que partió de la interacción entre las variables predictoras (AIC = 6723.0). A partir del mejor modelo se obtuvo que, en abejas recién emergidas el cuerpo graso representa como promedio el 20.6 % de la masa seca del abdomen, aunque puede variar entre el 11.6 y el 33.8 % como valores mínimo y máximo respectivamente (Fig. 3.2). El modelo predice también que, solo en las abejas que consumen JS los valores mínimos pueden llegar a ser menores a los de las abejas recién emergidas, alcanzando 8.8 y 9.3 % en abejas con y sin nosemosis respectivamente. Esto se refleja en que en abejas alimentadas con JS durante siete días, el cuerpo graso tiende a disminuir su peso en un 14.2 % en abejas libres de nosemosis y en 14.9 % en las parasitadas.

Una tendencia radicalmente opuesta a la anterior se presentó en abejas que consumieron DB. El modelo muestra que después de siete días de consumo de DB, el cuerpo graso de las abejas puede llegar a representar hasta el 50.24 % y 48.0 % del peso seco de abdomen, en abejas con y sin infección por nosemosis respectivamente. De hecho, estos son los únicos dos casos en los que la tendencia al aumento de la relación peso del cuerpo graso / masa seca del abdomen en siete días, fue mayor a 35 %. En cambio, el efecto predicho para los panes de abeja fue menos intenso que el de la DB, y muy similar para los dos tipos suministrados. En este caso el modelo predice que la diferencia entre las abejas recién emergidas y las alimentadas con pan de abeja es en promedio 3 % para las saludables y 4 % para las infestadas por nosemosis.

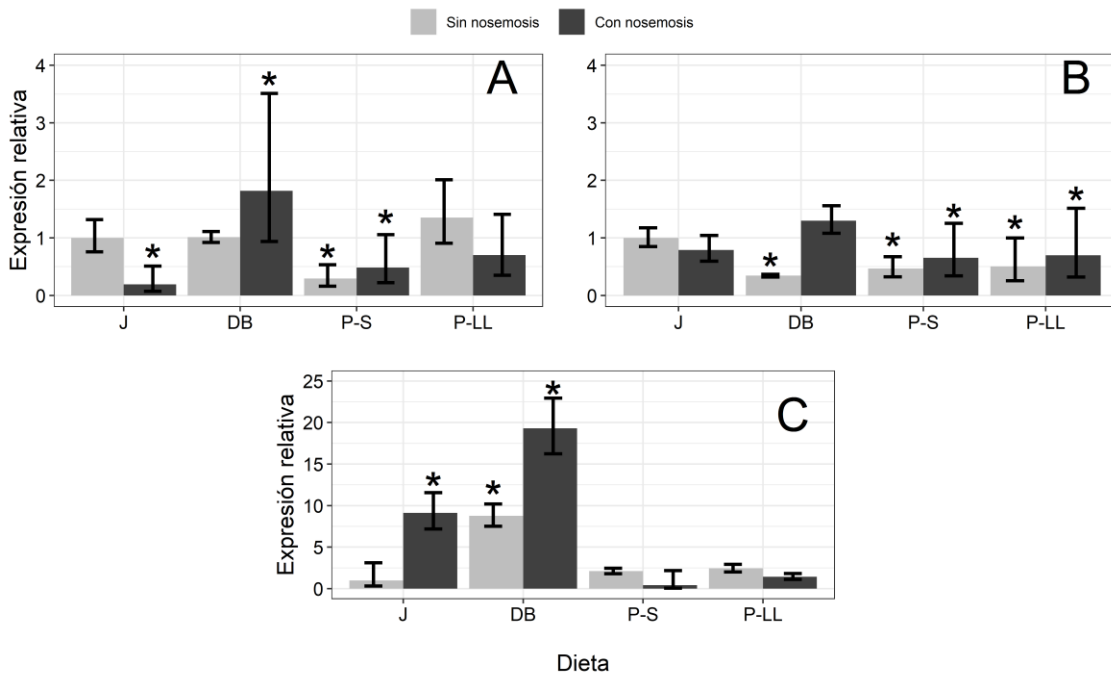


**Figura 3.2** Predicciones e intervalos de confianza del modelo de regresión logística para el peso del cuerpo graso en relación con la biomasa seca del abdomen de *Apis mellifera* en abejas recién emergidas (R) y abejas alimentadas por siete días con cuatro dietas, a las cuales a su vez, se les evaluó el efecto de la infección con nosemosis. DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias del estado de Yucatán, México.

### 3.3. Expresión génica

El análisis del nivel de expresión del gen que codifica para la *Vg*, a través de un modelo de regresión lineal permitió identificar el efecto de la dieta y la infección. En este sentido aparecen tres situaciones, la infección: i) disminuye, ii) aumenta o iii) no afecta la expresión del gen en cuestión (Fig. 3.3A). En el primer caso están el JS y el P-S con un marcado efecto negativo de la infección la que provoca una notable reducción de la expresión de la *Vg*. Mientras que, en sentido contrario está la DB la cual fue la única que provocó un incremento sustancial de la expresión del gen en cuestión en abejas parasitadas, ya en aquellas abejas que consumieron el P-LL, la nosemosis no afecta la expresión de dicho gen.

Por otro lado, la expresión de la PPO, zimógeno de la enzima PO, fue menor al grupo control en ambas dietas de pan de abejas independientemente de la presencia o no de la infección (Fig. 3.3B). No obstante, en estas dietas las abejas infestadas expresaron 0.19 unidades de expresión relativa (UER) más que las saludables. De forma contrastante, ni en el JS ni en la DB la infección afecta la expresión de la PPO. En cambio, para la GOX la mayor expresión en abejas infestadas se obtuvo solo en el JS (9.12 UER) y la DB (19.3 UER; Fig. 3.3C). De hecho, la expresión de la GOX fue menor a las 2.4 UER en ambas dietas de pan de abeja y estados de salud, comparable con aquellas abejas saludables que consumieron JS (1.0 UER). A pesar de las variaciones encontradas, sobresalta que, para dos de los tres genes de respuesta inmune, las abejas infestadas alimentadas con DB presentaron los mayores niveles de expresión.



**Figura 3.3** A: Expresión relativa de los genes de inmunidad, A: Vitelogenina, B: Profenoloxidasa y C: Glucosa oxidasa, en *Apis mellifera* alimentada con DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias del estado de Yucatán, México. Las barras muestran los intervalos inferior y superior de la expresión relativa normalizada. Los asteriscos señalan los tratamientos con efecto significativo en la expresión de los genes, resultante de modelos de regresión lineal para los cuales se tomó como valor de referencia la expresión de los genes correspondientes en abejas libres de nosemosis alimentadas con jarabe de sacarosa

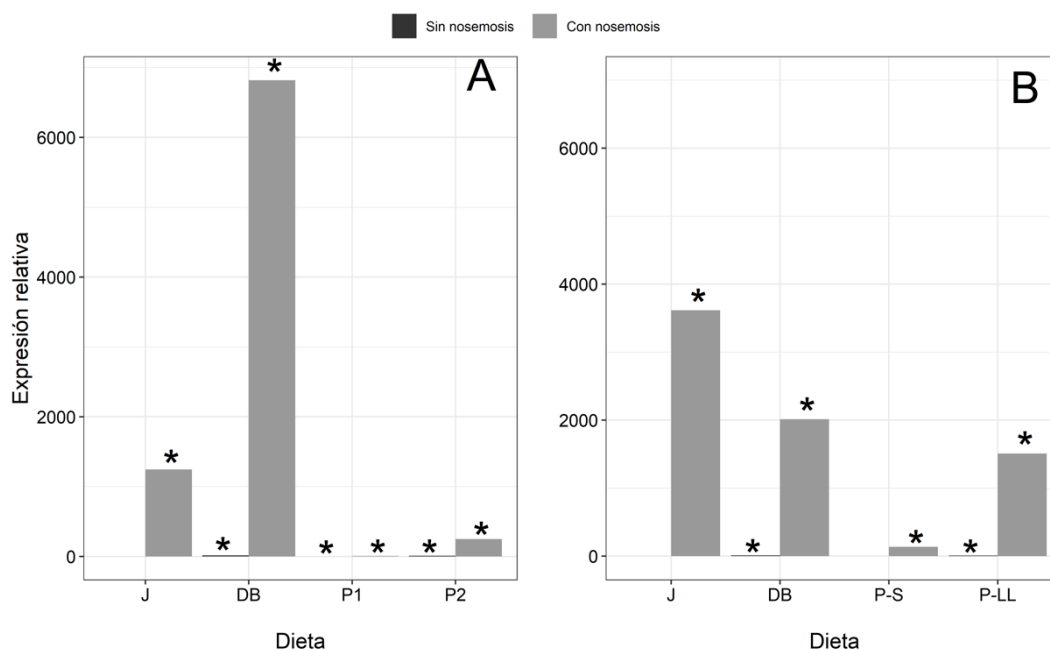
### 3.4. Nivel de infección

La presencia de una abundante amplificación de los cebadores para *N. apis* y *N. ceranae* en los grupos abejas inoculadas con esporas de estos hongos, confirma que el proceso se llevó a cabo con éxito y reafirma que la inoculación masiva es viable para bioensayos en abejas confinadas (Fig. 3.4). Aunque hubo determinada expresión de los cebadores en las abejas que no fueron inoculadas con esporas, esta fue extremadamente baja. Entre los cuatro casos de abejas no infestadas en los que la expresión fue mayor a una UER, el valor máximo obtenido fue de 16.7 UER para *N. apis* en abejas que consumieron DB. Dicho nivel de expresión fue 408 veces menor que el correspondiente para las abejas inoculadas que consumieron la misma dieta. Este fenómeno puede deberse a que se trabajó con abejas de 24 a 48 horas de nacidas, tiempo durante el cual estas pudieron haber consumido remanentes de alimento contaminados del panal y/o haberse lamido entre ellas lo que puede haber provocado la ingestión de pequeñas cantidades de esporas. Por lo que se descarta que sea de importancia la presencia de esporas en las abejas no inoculadas para nuestros objetivos, pero es posible que así ocurra de forma natural la inoculación.

A pesar de que ambas especies de microsporidios fueron detectadas en las abejas de los bioensayos, el nivel de infección por *N. ceranae* fue mayor en tres de las cuatro dietas suministradas (Fig. 3.4). La excepción de lo anterior, fue la DB en la cual el nivel de parasitismo por *N. apis* es de 6819.2 UER el cual es 3.4 veces mayor al de *N. ceranae* para la misma dieta. De hecho, este es el mayor valor de infección registrado para ambas especies de microsporidios en las cuatro dietas suministradas. Después de la DB el otro alimento que genera mayor infección de *N. apis* es el JS con

1245.9 UER. Alimento este último que provocó en cambio, los mayores niveles de infección de *N. ceranae*, (3614.5 UER).

Por otro lado, los panes de abejas mantienen un patrón de infección similar siendo mayor en las abejas que consumieron el de la temporada de lluvias para ambas especies de microsporidios (Fig. 3.4). Resalta, además, la baja infección que se detectó en las abejas que consumieron P-S respecto a las otras dietas. En este sentido el nivel de infección en el P-S fue 11 y 28 veces menor respecto al P-LL, para *N. ceranae* y *N. apis* respectivamente.



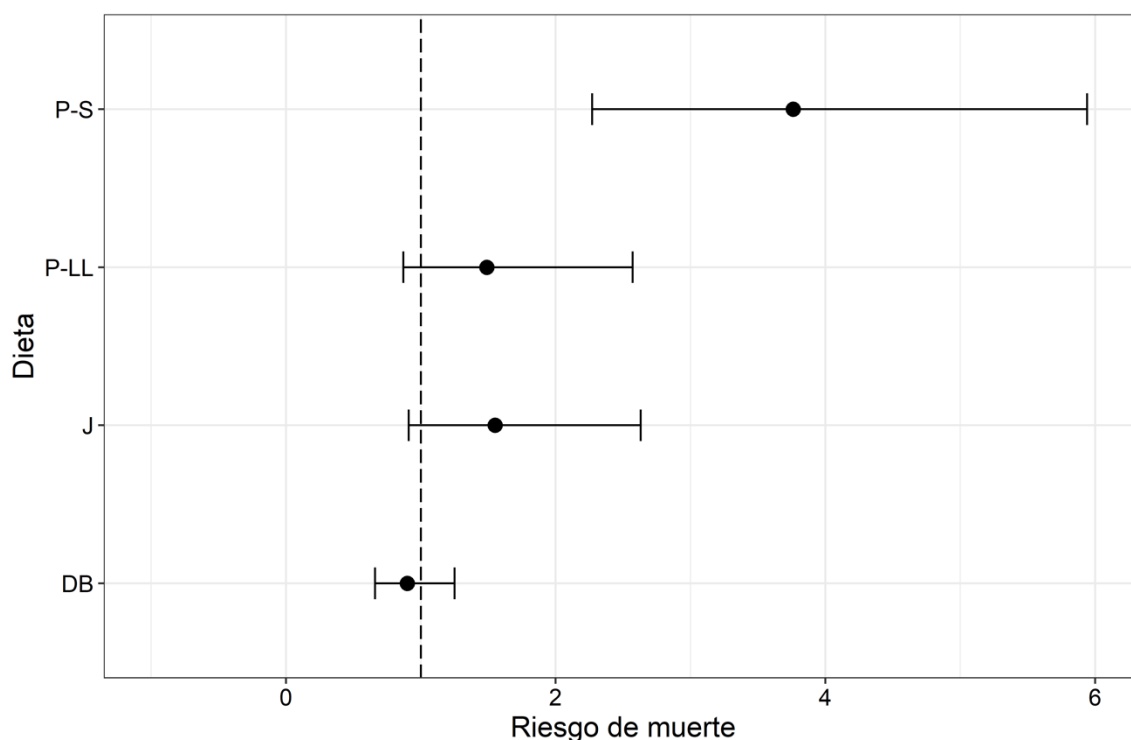
**Figura 3.4** Cuantificación relativa por PCR en tiempo real del nivel de parasitismo de A: *Nosema apis* y B: *Nosema ceranae* en *Apis mellifera* alimentada con DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias del estado de Yucatán, México. Los asteriscos marcan tratamientos con un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) resultante de una regresión lineal teniendo como referencia las abejas saludables alimentadas con jarabe de sacarosa.

### 3.5. Supervivencia

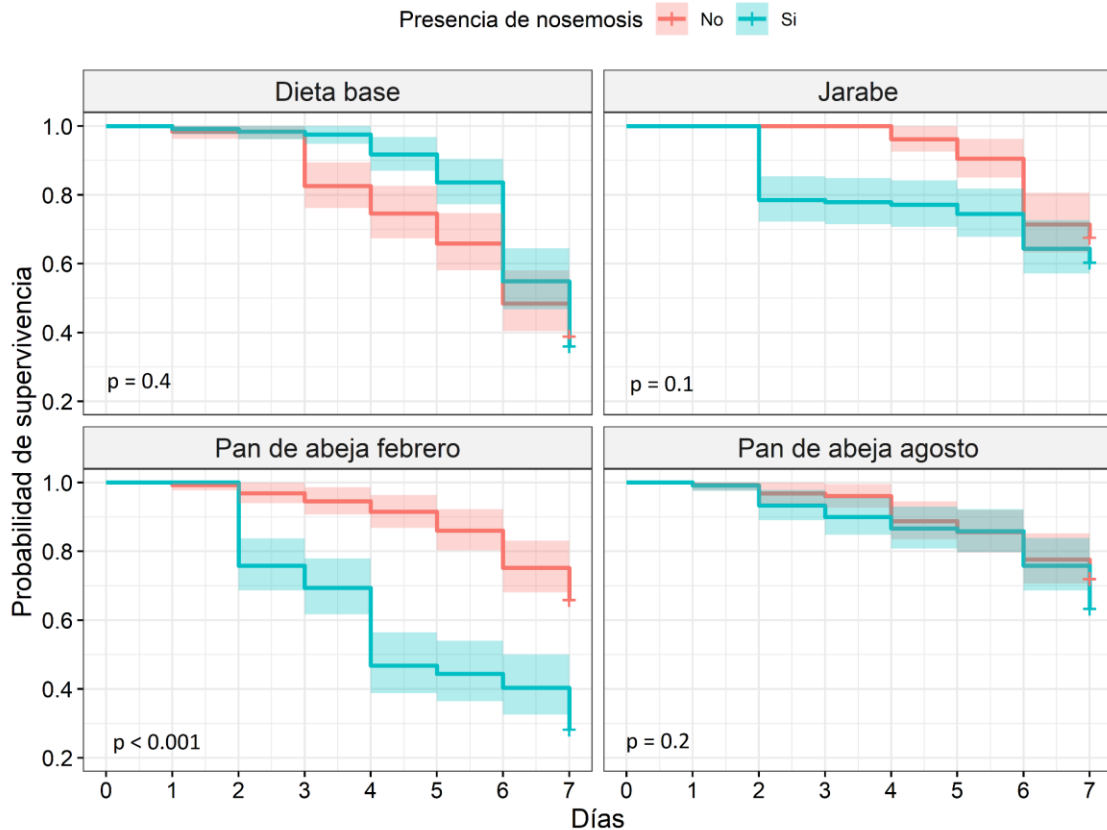
El análisis estratificado del modelo de riesgos proporcionales de Cox, que permite evaluar el efecto de la nosemosis por cada dieta de forma independiente, muestra que la enfermedad sólo influyó significativamente en el riesgo de muerte de las

abejas alimentadas con P-S (Fig. 3.5). En este caso, las abejas enfermas tuvieron un riesgo de muerte 3.6 veces mayor que las abejas saludables (Modelo de Cox,  $p < 0.0001$ ). Sin embargo, el modelo estratificado no permite comparar entre dietas por lo que se complementó con el análisis de Kaplan Meier.

A partir del estimador de la probabilidad de supervivencia se obtuvo que, a pesar de que la DB disminuye (aunque no significativamente; Fig. 3.5) el riesgo de muerte de las abejas enfermas, este fue el alimento más letal para las abejas. Tanto en las abejas infestadas como en las saludables que consumieron DB, el tiempo de supervivencia media de seis y cinco días respectivamente, se alcanza en el transcurso del bioensayo (Fig. 3.6). Esta situación no se presenta ni en abejas saludables alimentadas con P-S, ni en abejas alimentadas con las otras dos dietas independientemente de su estado de salud. De hecho, las abejas parasitadas con nosemosis con mayor probabilidad de supervivencia al final del experimento, de 63.3 y 60.4 %, fueron las que consumieron P-LL y JS respectivamente. A lo que se le añade que no hubo diferencias significativas en la supervivencia entre las abejas parasitadas que consumieron estas dietas (prueba de Mantel-Cox,  $p = 0.6$ ).



**Figura 3.5** Análisis estratificado para la evaluación del riesgo de muerte de *Apis mellifera* infestadas por nosemosis al consumir cuatro dietas: DB: dieta base; J: jarabe de sacarosa al 50 %; P-S y P-LL: pan de abeja de la temporada de sequía y de lluvias, respectivamente, del estado de Yucatán, México. La línea vertical señala el valor de referencia del riesgo de muerte para cada dieta teniendo en cuenta la ausencia de nosemosis.



**Figura 3.6** Efecto de cuatro dietas y la infección por nosemosis en la supervivencia de *Apis mellifera* del estado de Yucatán, México. Los datos muestran la probabilidad de supervivencia y sus intervalos de confianza al 95 % en un periodo de 7 días para abejas con y sin nosemosis. Valores de  $p$  para la prueba de Mentel-Cox.

### 3.6. Composición polínica del pan de abeja

Como parte del proceso del análisis palinológico se contaron en total 19,948 granos de polen, 1,930 de la temporada de sequía y 18,018 de la temporada de lluvias. El análisis permitió diferenciar 28 morfotipos de granos de polen, de los cuales se identificaron 23 familias de plantas y de estos solo en 19 casos se llegó a nivel de



---

especies; cinco tipos permanecen por identificar en ambos niveles taxonómicos (Anexos I y II). De dicho total, 17 morfotipos fueron detectados en el P-S de los cuales se identificaron 14 familias y 10 especies. En el caso del P-LL se detectaron 11 tipos de granos polen, identificándose nueve familias e igual cantidad de especies. Ambas muestras comparten tres tipos de granos de polen provenientes de las plantas *Leucaena leucocephala* (Familia Fabaceae), *Thouinia paucidentata* (Familia Sapindaceae) y un tercer tipo de polen proveniente de la familia Poaceae.

En correspondencia con el calendario apícola de la península de Yucatán, la especie más abundante en el P-S fue *Viguiera dentata* o tajonal (Familia Asteraceae), seguida por *Gymnopodium floribundum* o Ts'íits'ilché (Familia Polygonaceae) representando el 68 y 12 % respectivamente, del total de granos de polen contados para la temporada. En el caso del P-LL el taxón más abundante pertenece al género *Mimosa* sp. la cual representa el 94.8 % de los granos de polen encontrados, seguida por *Bidens pilosa* (Familia Asteraceae) que representó el 2.5 % de la muestra.

Para la evaluación de los índices ecológicos se utilizaron los morfotipos de granos de polen identificados. A partir de estos análisis se encontró poca similitud en los tipos de granos de polen que componen los panes de abeja de cada temporada (Coeficiente de Similitud de Jaccard = 0.1). De acuerdo con lo mencionado previamente, la temporada en la que hubo mayor dominancia de un tipo de polen fue en la de lluvias, en la que la probabilidad de encontrar dos tipos de polen diferentes fue solo del 9.9 %, respecto al 51 % de la temporada de sequía (Índice Simpson,  $1 - D$ ). Lo anterior coincide con el Índice de Shannon-Weiner con el cual se obtuvieron cifras de 0.26 y 1.18 para las temporadas de lluvias y sequías respectivamente. Un valor de cero del Índice de Shannon-Weiner indica que la muestra evaluada está compuesta por una sola especie y en este caso confirma la predominancia del polen de las mimosas en la temporada de lluvias. Todo esto confirma que la temporada de sequía es más diversa en cuanto a recursos florales disponibles para las abejas.

### CAPÍTULO IV

#### DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta el posible efecto de la alimentación en la resistencia a la nosemosis en condiciones tropicales, en este trabajo se planteó como hipótesis que el tipo de dieta influye de forma diferente en los indicadores de la capacidad de defensa de *A. mellifera* infectada por nosemosis. A partir de lo cual, se espera que, en las abejas enfermas alimentadas con dietas elaboradas con pan de abeja tengan mayor: i) consumo de alimento, ii) peso de los cuerpos grasos, iii) expresión de los genes que codifican para la Vg, la PPO y la GOX, iv) infección por nosemosis y v) probabilidad de supervivencia, que las abejas alimentadas con otro tipo artificial de dieta como el jarabe o un sustituto de polen. Sin embargo, la menor expresión de los tres genes de resistencia inmune evaluados, así como el menor peso del cuerpo graso en las abejas alimentadas con pan de abeja en comparación con la DB, nos lleva a rechazar dicha hipótesis.

Sin embargo, a pesar de que la respuesta de la mayor parte de los mecanismos relacionados con la inmunidad evaluados en este trabajo fue mayor en las abejas con nosemosis que consumieron la DB, estas abejas tuvieron menor probabilidad de supervivencia que aquellas alimentadas con el P-LL. De igual forma, las abejas enfermas que consumieron dicho pan de abejas tuvieron menor riesgo de muerte que las alimentadas con el P-S. Entre estas dos últimas dietas la única diferencia obtenida fue en el caso de la Vg, pero no debido a un incremento de la expresión de esta proteína en las abejas que consumieron P-LL, si no por una disminución en 1.45 veces de esta variable en las alimentadas con el P-S.

La actividad de la Vg está relacionada con la resistencia al estrés oxidativo (Seehuus *et al.*, 2006) por lo que es posible que contribuya a la resistencia a la nosemosis entre cuyos efectos está el incremento del estrés oxidativo y la desregularización de las enzimas para enfrentarlo (Dussaubat *et al.*, 2012). De ahí que, la disminución de la expresión de la Vg puede haber sido la causa por la cual las abejas

alimentadas con P-S tuvieron mayor riesgo de muerte, que aquellas alimentadas con el de la temporada de lluvias. A pesar de esto, queda por determinar hasta qué punto contribuye la Vg al enfrentamiento a la nosemosis ya que, en nuestro trabajo, aquellas abejas enfermas que consumieron DB expresaron 2.6 veces más Vg que las que consumieron P-LL, pero fue la dieta que mayor mortalidad provocó.

#### 4.1. Consumo de alimento

Aunque previamente se ha reportado que los sustitutos proteicos comerciales tienen similar palatabilidad que el polen (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2008), nuestros resultados con la dieta casera publicada por van der Steen, (2007) indican lo contrario, y concuerdan con Höcherl *et al.*, (2012). En este último trabajo los autores tuvieron que añadirle mielato a la DB para aumentar su aceptación por parte de las abejas debido a su bajo consumo. Los ingredientes proteicos presentes en la dieta de van der Steen, (2007) son utilizados comúnmente en el desarrollo de los sustitutos proteicos del polen (SAGARPA, 2004) mientras que, la adición del aceite de linaza se debió a que contiene ácido linoleico el cual es un isómero del componente fagoestimulante del polen: ácido trans, cis, cis-2,9,12-octadecatriónico ( $C_{18}H_{30}O_2$ ; Hopkins, *et al.*, 1969; Starratt y Boch, 1971). Teniendo en cuenta los resultados negativos con esta dieta casera, es posible que el isómero no sea tan atractivo para las abejas como el  $C_{18}H_{30}O_2$  en sí. Aunque se ha descrito que los lípidos del polen son los que tienen mayor actividad fagoestimulante (Lepage y Boch, 1968; Doull, 1974), Schmidt, (1985) encontró que no todas las fracciones lipídicas (según su polaridad) son igual de atractivas para las abejas y plantea la posibilidad de sinergia entre dichas fracciones. De ahí que quizás la palatabilidad de la dieta de van der Steen, (2007) se pueda mejorar con la combinación de varios tipos de lípidos.

Por otro lado, se encontró que la nosemosis provoca un incremento, aunque no significativo en nuestro caso, de la cantidad de alimento que consumen las abejas. Aunque se esperaría que las limitaciones fisiológicas ocasionadas por esta enfermedad estimulen a las abejas a ingerir más alimento para compensar las carencias provocadas por dicho parásito, la usencia de diferencia en el consumo de polen entre abejas saludables y enfermas ha sido reportado anteriormente (Jack *et al.*, 2016). Sin embargo,

se ha descrito una mayor ingesta de JS en abejas con nosemosis respecto a aquellas saludables (Naug y Gibbs, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2011). Por tanto, es posible que la disolución del pan de abeja en JS pudo haber incrementado el consumo de esta dieta proteica. De hecho, en nuestros resultados se observan patrones muy similares de consumo de estas tres dietas. Sin embargo, puede que nuestro pequeño tamaño muestral (4 réplicas por tratamiento) haya contribuido a no encontrar diferencias en el consumo entre abejas infestadas y saludables.

Por otro lado, la reducción en el consumo por día predicha por el modelo coincide con lo reportado por Pernal y Currie, (2000). Durante los primeros 15 días de vida las abejas son nodrizas y requieren de alimento en cantidad y calidad suficiente para el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas, con las cuales producen jalea real. En vida libre, se ha registrado que el consumo de polen aumenta a partir del día en que la abeja emerge alcanzando un pico entre los 4-9 días, momento a partir del cual comienza a disminuir pero se mantiene hasta los días 15-18 (Crailsheim *et al.*, 1992). Sin embargo, cuando están enjauladas las abejas regulan su ingesta de proteínas y carbohidratos (Altaye *et al.*, 2010), probablemente debido a la ausencia de reina y cría para alimentar lo que reduce la demanda de producción de jalea real en la abeja nodriza y por consiguiente disminuye su necesidad de incrementar la ingesta de alimento.

### **4.2. Efecto del tipo de dieta en los mecanismos de defensa**

Aunque en este trabajo no se evaluó la calidad nutricional del alimento suministrado, este es un aspecto fundamental a tener en cuenta. En nuestro caso, a pesar de que las abejas fueron alimentadas con pan de abeja polifloral, sí se observó la predominancia del polen de las familias Fabaceae y Asteraceae en los panes de abeja de las temporadas de lluvias y sequía respectivamente. En este sentido, a pesar de que la disponibilidad de nutrientes varía entre especies de la misma familia, a partir de su aporte proteico, el polen de las fabáceas se considera de mayor valor nutritivo (23 %; Liolios *et al.*, 2015) que el de las asteráceas (18 %; Tellería *et al.*, 2019). Mientras que, si tenemos en cuenta el porcentaje de proteínas presente en los ingredientes de la DB (Tabla 4.1), su aporte proteico es del 27 %, el cual se encuentra en el rango sugerido como óptimo para el polen (23-30%, Herbert *et al.*, 1977).

**Tabla 4.1** Aporte proteico de los ingredientes de la dieta base

<b>Componente</b>	<b>Proporción de masa total (g)</b>	<b>Contenido proteico (%)</b>	<b>Aporte proteico (g)</b>
Harina de soja	0.143	43.96 (Machado <i>et al.</i> , 2008)	0.06
Harina de levadura de cerveza	0.095	47.19 (Caballero-Córdoba y Sgarbieri, 2000)	0.04
Caseinato de calcio	0.152	90 (Braun, 2020)	0.14
Proteína de suero (whey protein)	0.038	72 (Morr y Ha, 1993)	0.03
Jarabe de Sacarosa (50% peso/volumen) en agua potable	0.476	-	-
Aceite de linaza	0.095	-	-
<b>Total</b>	<b>0.999</b>	<b>-</b>	<b>0.27</b>

Por tanto, es posible que los niveles de expresión de la Vg obtenidos en este trabajo sean el reflejo de un incremento del contenido proteico entre dietas, elemento nutricional que afecta positivamente los niveles de Vg en la hemolinfa (Bitondi y Simões, 1996). De igual forma el peso del cuerpo graso se ve afectado de forma positiva por el contenido proteico de la dieta (Alaux *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestro trabajo dicho nutriente no parece estar incidiendo de manera muy marcada, debido al bajo incremento registrado en las abejas que consumieron el pan de abejas. De ahí que, es posible que la deficiencia de otros nutrientes como los lípidos (Toth, 2005) o una demanda de polen superior a la disponibilidad de la dieta hayan incidido en el peso de dicho órgano.

Por otro lado, suponiendo que cada vez que el gen de la PPO se expresa en abejas enfermas tiene como resultado final una proteína activa, nuestros resultados coinciden con Di Pasquale *et al.*, (2013). Estos autores encontraron que la nosemosis provoca un incremento de la actividad de la fenoloxidasa en abejas alimentadas con jarabe, pero no así en las alimentadas con polen. Aunque en dicho trabajo no evaluaron el nivel de infección es posible que este incremento se deba a un alto nivel de parasitismo por *N. ceranae* como el encontrado en nuestros resultados en las abejas

privadas de dietas proteicas. Por otro lado, la carencia de efecto de la mayoría de las dietas de polen también fue reportado por Alaux *et al.*, (2010), quienes sólo encuentran un ligero efecto positivo en una dieta de polen con 23.6 % de proteínas. En caso de que el contenido proteico incremente la expresión o la actividad de la fenoloxidasa en abejas como en otros insectos (Lee *et al.*, 2006; 2008) esta podría ser la causa por la cual en nuestros experimentos, las abejas que consumieron el sustituto proteico del polen presentaron mayor expresión de esta enzima. No obstante, son necesarias más investigaciones para determinar el efecto de la dieta y las enfermedades en la PPO en *A. mellifera*.

Los altos niveles de expresión de la GOX en las abejas que consumieron DB pueden deberse al efecto positivo del contenido proteico de la dieta en esta enzima (Alaux *et al.*, 2010). En el caso de las abejas alimentadas con JS, la alta expresión de la GOX puede estar relacionada con la conjunción de los siguientes aspectos: i) la actividad de la GOX incrementa con la edad de la abeja (Ohashi *et al.*, 1999; Alaux *et al.*, 2010) y el comienzo del forrajeo está influido por ii) la pérdida de lípidos (Ament *et al.*, 2011) y iii) la nosemosis (Natsopoulou *et al.*, 2016; Fleites-Ayil *et al.*, 2018). Por tanto, el bajo peso de los cuerpos grasos y los altos niveles de parasitismo por *N. ceranae* pudieron haber provocado que las abejas que consumieron jarabe fuesen más “viejas” desde el punto de vista fisiológico y como respuesta natural, incrementó la expresión de la GOX.

### 4.3. Nivel de infección

Otro aspecto interesante y contrastante respecto al P-S fue el bajo nivel de infección que tuvieron las abejas que lo consumieron. Este fue de 11 y 28 veces menor respecto al P-LL, para *N. ceranae* y *N. apis* respectivamente. *Viguiera dentata* y *Bidens pilosa*, las especies de asteráceas presentes en los panes de abejas evaluados han sido ampliamente evaluadas por su importante actividad biológica y presencia en la medicina natural y tradicional de los pueblos latinoamericanos. Se ha comprobado por ejemplo, que el extracto metanólico de las hojas de *V. dentata* tiene actividad inhibitoria del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, el hongo que provoca antracnosis en el aguacatero (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005). A lo que se le añade que sus aceites

esenciales y la fracción hexánica del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta, tienen actividad antimicrobiana y antifúngica (Canales *et al.*, 2008). Mientras que, diferentes extractos de *B. pilosa* tienen actividad inhibitoria del crecimiento de *Plasmodium falciparum* (causante de la malaria) *in vitro* (Brandão *et al.*, 1997). Además, Deba *et al.*, (2008) encontraron actividad antifúngica en los aceites esenciales y los extractos acuosos de *B. pilosa*. Por lo que no se puede descartar la posibilidad de que el polen de estas plantas tenga actividad antinosémica.

Además las asteráceas presentan lactonas sesquiterpénicas, las cuales conforman un grupo de terpenoides con importancia taxonómica en la familia (Seaman, 1982) pero que tienen, entre otras, actividad citotóxica (Yang *et al.*, 2007), antitumoral (Li *et al.*, 2020), antihelmíntica (Peña-Espinoza *et al.*, 2020), tripanocida (Sosa *et al.*, 2020), antiinflamatoria y antibacteriana (Jiang *et al.*, 2020). Estas sustancias se han detectado en la subfamilia Asteroideae (a la cual pertenecen *B. pilosa* y *V. dentata*) con actividad antiparasitaria, insecticida y antiviral (Chen *et al.*, 2020). Por lo que es posible que hayan lactonas sesquiterpénicas en el polen de *B. pilosa* y *V. dentata*, al igual que en *Parthenium hysterophorus* (Asteroideae; Jayanth *et al.*, 1993) que tengan algún efecto fungicida contra las esporas de *Nosema*.

A partir de lo anteriormente planteado se puede teorizar que las sustancias presentes en polen de las asteráceas del P-S disminuyeron la vitalidad de las esporas de *Nosema spp.*: i) en el alimento antes que las abejas lo consumieran, ii) dentro del estómago de las abejas, o iii) que ocurrieran las dos situaciones mencionadas. Cualquiera de estos casos sería indicativo de que puede existir alguna sustancia(s) en el pan de abeja de la temporada de sequía que haya afectado a las esporas de *Nosema*. Incluso no se puede descartar este posible efecto en el P-LL, en el que también hubo polen de asteráceas y el nivel de infección en las abejas que lo consumieron fue menor a las que alimentadas con JS y DB para ambas especies de *Nosema*. De ahí que un posible efecto antinosémico del polen de plantas tropicales, podría ser la causa por la cual esta enfermedad no provoca serios problemas en la apicultura de la región.

Por otro lado, el mayor nivel de infección por *N. ceranae* en abejas alimentadas con JS no coincide con resultados previamente reportados en infecciones mixtas a los

siete días después de la inoculación (Charbonneau *et al.*, 2016). Forsgren y Fries (2010) encontraron que el incremento de la cantidad de esporas de *N. ceranae* es más lento que el de *N. apis* durante los primeros 11 días en abejas inoculadas con igual cantidad de esporas de ambas especies. Por lo cual se esperaría una menor presencia *N. ceranae* que de *N. apis* en abejas jóvenes, de ahí que es posible que la mayor infección por *N. ceranae* encontrada en este trabajo en abejas alimentadas con JS, se deba a las proporciones de esporas de cada especie de microsporidios en el inóculo (Forsgren y Fries, 2010; Milbrath *et al.*, 2015), factor que no fue evaluado inicialmente. A la vez, la reproducción más lenta de *N. ceranae* puede que haya favorecido inicialmente la rápida multiplicación de *N. apis* cuando las abejas fueron alimentadas con DB, ya que las dietas proteicas propician el incremento del número de esporas de ambas especies de microsporidios (Rinderer y Dell Elliott, 1977b; Jack *et al.*, 2016). No obstante, a largo plazo (>12 días después de la infección) los niveles de detección de ambas especies tienden a ser semejantes (Forsgren y Fries, 2010; Williams *et al.*, 2014; Charbonneau *et al.*, 2016).

#### 4.4. Supervivencia

A excepción de las abejas alimentadas con DB, no se observó diferencia entre dietas en la supervivencia de las abejas saludables. De hecho, los resultados de este trabajo no coinciden con van der Steen (2007) quien evalúa el efecto de la DB y la presencia y ausencia de polen almacenado en la colmena, en la longevidad de las abejas. Este autor reporta que las abejas en vida libre alimentadas con la DB vivieron más (25 días) en comparación con las que se alimentaron de forma natural (16 días) y las que fueron privadas de polen (16 días).

Sin embargo, Höcherl *et al.*, (2012) al hacer un experimento similar usando DB, una mezcla de polen de diferentes orígenes y polen de maíz, encontraron que la dieta artificial tuvo un efecto negativo en la capacidad de producción de nueva cría en las colmenas así como en la eclosión de los huevos y la emersión de las abejas adultas. Esto último implica problemas nutricionales de las abejas nodrizas al no poder producir jalea real de suficiente calidad para alimentar a la reina y las larvas. En este sentido Höcherl *et al.*, (2012) encuentran muy bajas concentraciones de los aminoácidos



esenciales para las abejas en la DB respecto a los dos tipos de polen utilizados. Característica que puede ser la causa de la baja probabilidad de supervivencia obtenida en nuestros experimentos a pesar de incrementar la expresión de los genes de la inmunidad y el peso del cuerpo graso. Aspecto que resalta que no solo se puede tener en cuenta el aporte proteico de una dieta para evaluar su calidad (Liolios *et al.*, 2015).

Los experimentos de van der Steen (2007) se llevaron a cabo con abejas en vida libre mientras que el presente trabajo se realizó con abejas confinadas. En concordancia con las posibles repercusiones que puede tener el encierro en la supervivencia y consumo de alimento de las abejas, Williams *et al.*, (2013) reconocen la necesidad de evaluar la capacidad nutricional de esta dieta sustituta del polen en abejas confinadas. A partir de nuestra experiencia y lo reportado por Höcherl *et al.*, (2012) se puede plantear que el sustituto del polen recomendado por van der Steen, (2007) y Williams *et al.*, (2013) no tiene la suficiente calidad para ser utilizado, al menos, en la alimentación de abejas enjauladas.

Por otro lado, se ha documentado que el polen de algunas especies de plantas de la familia Asteraceae tienen bajo contenido proteico (Tasei y Aupinel, 2008; Liolios *et al.*, 2015) o son deficientes en aminoácidos esenciales (Loper y Cohen, 1987; Somerville y Nicol, 2006). A lo que se le añade la incapacidad de *A. mellifera* de digerir completamente el polen de algunas asteráceas como por ejemplo del Diente de León (*Taraxacum officinale*; Peng *et al.*, 1985). Lo cual es posible que sea el motivo de la reducción de la longevidad y la capacidad de criar de *A. mellifera* alimentada con el polen de dicha planta (Knox, Shimanuki y Herbert, 1971; Loper y Berdel, 1980b). Por tanto, si los mecanismos de la inmunidad y la supervivencia dependen de la calidad del alimento y su digestibilidad, entonces las abejas enfermas por nosemosis que consumieron el P-S podrían haber enfrentado un desafío triple: la presencia de parásitos que destruyen el epitelio digestivo que, por tanto, dificultan la absorción de un alimento de por sí pobre y de difícil digestión.

Por último, se debe tomar con cautela la aparente ausencia de efecto de la nosemosis en el riesgo de muerte de las abejas que consumieron JS y P-LL. La no significancia de este resultado se debe a que el alfa del modelo es 0.05, por tanto, una modificación de este valor probablemente haría significativo el efecto de la enfermedad

en estas dietas. Además, la superposición con el valor de referencia (Fig. 3.5) representa sólo el 5.23 y 7.64% del rango de probabilidades de riesgo de muerte para las respectivas dietas antes mencionadas. De ahí que es probable que sí haya un efecto significativo de la enfermedad en el riesgo de muerte el cual debe ser mayor para las abejas que consumieron JS (Di Pasquale *et al.*, 2013).

### **4.5. Composición polínica del pan de abeja**

Aunque la temporada de sequía tuvo un menor índice de dominancia respecto a la de lluvias, ello no implica la ausencia de este fenómeno. De hecho, la predominancia de un tipo de polen por temporada en la dieta natural de *A. mellifera* ha sido previamente reportado por Avni, Dag y Shafir, (2009), quienes encontraron que la especie dominante puede representar entre el 22 y el 94% de la muestra durante un período de muestreo. En nuestro caso prevalecieron el polen de las familias Asteraceae y Fabaceae en las temporadas de sequía y lluvias respectivamente, los cuales representaron el 68.86 % y el 96.88 % de las muestras correspondientes. Esto a pesar de las más de 100 de especies de plantas que se ha descrito visitan tanto las abejas europeas como africanizadas en la península de Yucatán (Villanueva, 1999).

No obstante, la prevalencia de las familias Asteraceae y Fabaceae ha sido registrada previamente en el acopio de polen de las abejas de otras regiones (Andrada y Tellería, 2005; Dimou y Thrasylvoulou, 2007). De igual forma ha sido documentado el contraste entre la biodiversidad local y la variedad de tipos de polen acopiados por las abejas europeas. Por ejemplo, en Israel, donde se han registrado 2371 plantas silvestres, las abejas por período de muestreo colectan polen proveniente de 5 a 20 especies (Avni *et al.*, 2009). Mientras que, en la región de Caldenal, Argentina, se encontró que de 139 especies florecidas en dos periodos apícolas, las abejas visitaron 29 de las cuales solo 16 representaron más del 1 % de la muestra (Andrada y Tellería, 2005). Lo cual sugiere que, independientemente del paisaje que rodee la colmena y de ser una especie generalista, las abejas melíferas son selectivas al escoger las fuentes de alimento.

Existen fortalezas y limitaciones en los bioensayos con abejas enjauladas en lugar de colmenas. El principal inconveniente es que no se tienen en cuenta las interacciones entre las castas de la colmena, así como entre las propias abejas obreras de diferentes edades. A lo que se le añade que las abejas son alimentadas con dietas que ellas no consumen en condiciones naturales. Todo lo cual puede afectar la conducta natural de los individuos experimentales, como por ejemplo la ingesta de alimento, con las consiguientes repercusiones en el metabolismo y el sistema inmune. Sin embargo, los bioensayos eliminan el sesgo que introduce la variabilidad entre colmenas en cuanto a disponibilidad de alimento, cantidad de individuos y la genética. Por tanto, los resultados son interpretados teniendo en cuenta dichos aspectos, pero con la visión que puedan ser extrapolados a la realidad apícola de Yucatán.

La apicultura del siglo XXI enfrenta el reto de condiciones climáticas más agresivas y extremas, la pérdida de la biodiversidad, la fragmentación de ecosistemas naturales y la aparición de nuevas enfermedades, condiciones que ponen en riesgo la realización de dicha actividad. Una medida paliativa ha sido el estudio de las necesidades nutricionales de las abejas y el consecuente desarrollo de suplementos nutricionales que garanticen una buena nutrición de las abejas. Sin embargo, no siempre, los productos artificiales resultantes de mezclas aditivas de materias primas que en teoría cumplen con lo deseado, logran igualar la calidad del alimento natural. En nuestro estudio la mayor mortalidad se registró en aquellas abejas, tanto sanas como enfermas, que fueron alimentadas con el sustituto proteico del polen. Por tanto, la utilidad de esta dieta como complemento de la nutrición natural de colmenas de *A. mellifera* debe evaluarse ya que, pero por sí sola no cubre las necesidades nutricionales de la especie. A lo que se le añade su baja calidad como sustituto del polen para abejas enjauladas en condiciones experimentales.

Por otro lado, se plantea que una dieta variada a partir de la combinación de diferentes tipos de polen, puede suplir los requerimientos nutricionales de las abejas y, por tanto, otorgarles mayor capacidad de defensa frente a agente estresante o patógeno. Sin embargo, nuestros resultados muestran que las abejas pueden coleccionar y por tanto consumir combinaciones desproporcionadas de diferentes tipos de polen, en las cuales la calidad del polen predominante parece tener un rol importante. Lo que

implica, por tanto, que no todas las combinaciones de polen acopiadas en ambientes naturales en un momento dado son ideales. Pero una colmena dispone para su alimentación, tanto del polen recién colectado como de las reservas de pan de abeja. A partir de lo cual se deriva y refuerza la importancia de propiciar una abundante reserva de pan de abeja en la colmena, así como de estudiar el aporte nutricional del polen de las principales plantas de interés apícola de cada región y temporada, con vistas a la propagación de aquellas que contribuyan a cubrir óptimamente los requerimientos nutricionales de la colmena.

## CAPÍTULO V

### 5.1. CONCLUSIONES

- Las abejas con nosemosis que consumieron dieta base tuvieron mayor expresión de los genes de la vitelogenina, la profenoloxidasa y la glucosa oxidasa, así como mayor peso del cuerpo graso, en comparación con las abejas alimentadas con pan de abeja
- Las abejas parasitadas por nosemosis que consumieron pan de abeja de la temporada de lluvias tuvieron mayor probabilidad de supervivencia que las alimentadas con dieta base y pan de abeja de la temporada de sequía
- A pesar de tener baja probabilidad de supervivencia, las abejas alimentadas con pan de abeja de la temporada de sequía presentaron los menores niveles de infección para ambas especies de *Nosema*
- El pan de abejas colectado en la temporada de sequía (febrero de 2019) del estado de Yucatán fue más diverso que el de la temporada de lluvias (agosto de 2019) de la misma región

## 5.2. PERSPECTIVAS

La presente investigación constituye a juicio de los autores el primer esfuerzo para evaluar el efecto de la dieta natural de *A. mellifera* en su capacidad de resistencia a las enfermedades en ambientes tropicales. Nuestros resultados permitieron identificar nuevas preguntas para futuras investigaciones:

- ¿Es más importante la calidad de un tipo de polen predominante en una mezcla de pan de abeja que la diversidad de especies que lo componen, en la resistencia a la nosemosis?
- En caso positivo: ¿Cuál es el umbral a partir del que deja de tener efecto la calidad del polen predominante?
- ¿Existen sustancias con actividad antinosémica en el polen de *Bidens pilosa* o *Viguiera dentata*?
- En caso positivo ¿Cuáles son esas sustancias y cómo afectan a *Nosema*?

**LITERATURA CITADA**

Ahmed, M. and Kim, D. R. (2018) 'pqr: an R package for quality assessment, analysis and testing of qPCR data', *PeerJ*, 6, p. e4473. doi: 10.7717/peerj.4473.

Akaike, H. (1973) 'Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle', in *Selected Papers of Hirotugu Akaike*. New York, NY: Springer New York, pp. 267–281.

Alaux, C. *et al.* (2010) 'Diet effects on honeybee immunocompetence', *Biology Letters*, 6(4), pp. 562–565. doi: 10.1098/rsbl.2009.0986.

Alaux, C. *et al.* (2011) 'Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees', *BMC Genomics*, 12(1), p. 496. doi: 10.1186/1471-2164-12-496.

Alfaro-Bates, R. G. *et al.* (2010) *Caracterización Palinológica de las mieles de la península de Yucatán*. Mérida, Yucatán, México: UAD/CONABIO.

Altaye, S. Z. *et al.* (2010) 'Convergence of carbohydrate-biased intake targets in caged worker honeybees fed different protein sources', *Journal of Experimental Biology*, 213(19), pp. 3311–3318. doi: 10.1242/jeb.046953.

Amdam, G. V. *et al.* (2003) 'Social exploitation of vitellogenin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), pp. 1799–1802. doi: 10.1073/pnas.0333979100.

Ament, S. A. *et al.* (2011) 'Mechanisms of stable lipid loss in a social insect', *Journal of Experimental Biology*, 214(22), pp. 3808–3821. doi: 10.1242/jeb.060244.

Anand, A. N. and Lorenz, M. W. (2008) 'Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus*', *Journal of Insect Physiology*, 54(10–11), pp. 1404–1412. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.08.001.

Anderson, K. E. *et al.* (2014) 'Hive-stored pollen of honey bees: many lines of

evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion', *Molecular Ecology*, 23(23), pp. 5904–5917. doi: 10.1111/mec.12966.

Anderson, L. M. and Dietz, A. (1976) 'Pyridoxine requirement of the honey bee (*Apis mellifera*) for brood rearing', *Apidologie*, 7, pp. 67–84.

Andrada, A. C. and Tellería, M. C. (2005) 'Pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from south of Caldén district (Argentina): botanical origin and protein content', *Grana*, 44(2), pp. 115–122. doi: 10.1080/00173130510010459.

Antúnez, K. *et al.* (2009) 'Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia)', *Environmental Microbiology*, 11(9), pp. 2284–2290. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x.

Arathi, H. S., Burns, I. and Spivak, M. (2000) 'Ethology of Hygienic Behaviour in the Honey Bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): Behavioural repertoire of Hygienic bees', *Ethology*, 106(4), pp. 365–379. doi: 10.1046/j.1439-0310.2000.00556.x.

Arrese, E. L. and Soulages, J. L. (2010) 'Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation', *Annual Review of Entomology*, 55(1), pp. 207–225. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085356.

Avni, D., Dag, A. and Shafir, S. (2009) 'Pollen sources for honeybees in Israel: Source, periods of shortage, and influence on population growth', *Israel Journal of Plant Sciences*, 57(3), pp. 263–275. doi: |.

Badaoui, B. *et al.* (2017) 'RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*', *PLOS ONE*. Edited by O. Rueppell, 12(3), p. e0173438. doi: 10.1371/journal.pone.0173438.

Barker, R. J. and Lehner, Y. (1974) 'Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.)', *Journal of Experimental Zoology*, 187(2), pp. 277–285. doi: 10.1002/jez.1401870211.

Barribeau, S. M. *et al.* (2015) 'A depauperate immune repertoire precedes



evolution of sociality in bees', *Genome Biology*, 16(1), p. 83. doi: 10.1186/s13059-015-0628-y.

Bashey, F. *et al.* (2011) 'Virulence and competitive ability in an obligately killing parasite', *Oikos*. Wiley Online Library, 120(10), pp. 1539–1545.

Bates, D. *et al.* (2015) 'Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4', *Journal of Statistical Software*, 67(1). doi: 10.18637/jss.v067.i01.

Batllori-Sampedro, E. *et al.* (2006) 'Caracterización hidrológica de la región costera noroccidental del estado de Yucatán, México', *Invest. Geog.*, (59), pp. 74–92.

Bilisik, A. *et al.* (2008) 'Seasonal variation of collected pollen loads of honeybees ( *Apis mellifera* L. *anatoliaca* )', *Grana*, 47(1), pp. 70–77. doi: 10.1080/00173130801923976.

Bitondi, M. M. G. and Simões, Z. L. P. (1996) 'The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers', *Journal of Apicultural Research*, 35(1), pp. 27–36. doi: 10.1080/00218839.1996.11100910.

Borges Peña, R. E. (2005) 'Análisis de Supervivencia utilizando el lenguaje R'. Paipa, Boyacá, Colombia: Simposio de Estadística, p. 91.

Brandão, M. G. . *et al.* (1997) 'Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds', *Journal of Ethnopharmacology*, 57(2), pp. 131–138. doi: 10.1016/S0378-8741(97)00060-3.

Braun, B. (2020) *Caseinato de calcio*.

Brennan, C. A. and Anderson, K. V. (2004) 'Drosophila: The Genetics of Innate Immune Recognition and Response', *Annual Review of Immunology*, 22(1), pp. 457–483. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104626.

Brodtschneider, R. *et al.* (2009) 'Protein uptake in honeybee colonies

supplemented with two protein diets simultaneously', *Apidologie*, 40, p. 662.

Brodschneider, R. and Crailsheim, K. (2010) 'Nutrition and health in honey bees', *Apidologie*, 41(3), pp. 278–294. doi: 10.1051/apido/2010012.

Brookman, J. L., Ratcliffe, N. A. and Rowley, A. F. (1989) 'Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components', *Insect Biochemistry*, 19(1), pp. 47–57. doi: 10.1016/0020-1790(89)90008-5.

Brooks, G. T. (1985) 'Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology', *Insect Biochemistry*, 15(5), pp. i–xiv. doi: 10.1016/0020-1790(85)90131-3.

BROWN, M. J. F., MORET, Y. and SCHMID-HEMPEL, P. (2003) 'Activation of host constitutive immune defence by an intestinal trypanosome parasite of bumble bees', *Parasitology*, 126(3), pp. 253–260. doi: 10.1017/S0031182002002755.

Burgher-MacLellan, K. L. *et al.* (2010) 'Optimization of duplex real-time PCR with melting-curve analysis for detecting the microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*', *The Canadian Entomologist*. Cambridge University Press, 142(3), pp. 271–283.

Burnham, K. P. and Anderson, D. R. (2001) 'Kullback-Leibler information as a basis for strong inference in ecological studies', *Wildlife Research*, 28(2), p. 111. doi: 10.1071/WR99107.

Burnham, K. P. and Anderson, D. R. (eds) (2002) *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*. 2da edn. New York, NY: Springer New York. doi: 10.1007/b97636.

Burnham, K. P. and Anderson, D. R. (2004) 'Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection', *Sociological Methods & Research*, 33(2), pp. 261–304. doi: 10.1177/0049124104268644.

Caballero-Córdoba, G. M. and Sgarbieri, V. C. (2000) 'Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast

---

protein concentrate', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), pp. 341–351. doi: 10.1002/1097-0010(200002)80:3<341::AID-JSFA533>3.0.CO;2-M.

Cajero Avelar, S. (1999) 'Situación actual de la apicultura mexicana y sus perspectivas', *Memorias del primer Foro de proyectos integrales. Sistema Producto Miel. Mérida: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Sistema de Investigación Justo Sierra (SISIERRA)-Universidad Autónoma de Yucatán (UADY)*.

Canales, M. *et al.* (2008) 'Antimicrobial Activity of the Extracts and Essential Oil of *Viguiera dentata*', *Pharmaceutical Biology*, 46(10–11), pp. 719–723. doi: 10.1080/13880200802215727.

Chaimanee, V. *et al.* (2012) 'Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*', *Journal of Insect Physiology*, 58(8), pp. 1090–1095. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.04.016.

Charbonneau, L. R. *et al.* (2016) 'Effects of *Nosema apis*, *N. ceranae*, and coinfections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6. doi: 10.1038/srep22626.

Chen, D.-L., Li, X. and Zhou, X.-J. (2020) 'Research progress on sesquiterpenes and its pharmacological activities in genus *Carpesium*.', *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*. China, 45(1), pp. 37–51. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190929.201.

Chen, Y. *et al.* (2008) '*Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States.', *J Invert Pathol*, 97.

Chen, Y. *et al.* (2009) 'Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*.', *J Euk Microbiol*, 56.

Chen, Y. P. and Huang, Z. Y. (2010) '*Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia', *Apidologie*, 41(3), pp. 364–374. doi: 10.1051/apido/2010021.

Chevtchik, V. (1950) 'Mikrobiologie pylového kvasení', *Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk*, 323, pp. 103–130.

Choisy, M. and de Roode, J. C. (2010) 'Mixed infections and the evolution of virulence: effects of resource competition, parasite plasticity, and impaired host immunity', *The American Naturalist*. The University of Chicago Press, 175(5), pp. E105--E118.

Coffey, M. F. and Breen, J. (1997) 'Seasonal variation in pollen and nectar sources of honey bees in Ireland', *Journal of Apicultural Research*, 36(2), pp. 63–76. doi: 10.1080/00218839.1997.11100932.

Collision, C. (2015) 'A Closer Look: Beeswax, Wax Glands', *Bee Culture*, March. Available at: <https://www.beeculture.com/a-closer-look-beeswax-wax-glands/>.

Colwell, M. J. *et al.* (2017) 'Honey bee-collected pollen in agro-ecosystems reveals diet diversity, diet quality, and pesticide exposure', *Ecology and Evolution*, 7(18), pp. 7243–7253. doi: 10.1002/ece3.3178.

CONABIO (2006) *Capital natural y bienestar social*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

CONABIO (2018) 'Mieles Peninsulares y diversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Corredor Biológico Meso-americano-México'.

Copley, T. R. *et al.* (2012) 'Prevalence and seasonality of *Nosema* species in Québec honey bees', *The Canadian Entomologist*, 144(4), pp. 577–588. doi: 10.4039/tce.2012.46.

Corby-Harris, V. *et al.* (2018) 'Honey bee (*Apis mellifera*) nurses do not consume pollens based on their nutritional quality', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 13(1). doi: 10.1371/journal.pone.0191050.

Cornman, R. S. *et al.* (2009) 'Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees', *PLoS Pathogens*. Edited by A. Andrianopoulos. Public Library of Science, 5(6), p. e1000466. doi:

---

10.1371/journal.ppat.1000466.

Cortassa, S., O'Rourke, B. and Aon, M. A. (2014) 'Redox-Optimized ROS Balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(2), pp. 287–295. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.11.007.

Cox, D. R. (1972) 'Regression models and life tables', *Biometrics*, 38, pp. 67–77.

Crailsheim, K *et al.* (1992) 'POLLEN CONSUMPTION AND UTILIZATION IN WORKER HONEYBEES ( APIS MELLIFERA CARNICA ): DEPENDENCE ON INDIVIDUAL AGE AND FUNCTION \*', *Journal of Insect Physiology*, 38(6), pp. 409–419.

Crailsheim, K. *et al.* (1992) 'Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function', *Journal of Insect Physiology*, 38(6), pp. 409–419. doi: 10.1016/0022-1910(92)90117-V.

Cremonese, T. M., De Jong, D. and Bitondi, M. G. (1998) 'Quantification of Hemolymph Proteins as a Fast Method for Testing Protein Diets for Honey Bees (Hymenoptera: Apidae)', *Journal of Economic Entomology*, 91(6), pp. 1284–1289. doi: 10.1093/jee/91.6.1284.

Danner, N. *et al.* (2016) 'Season and landscape composition affect pollen foraging distances and habitat use of honey bees', *Ecological Applications*, 26(6), pp. 1920–1929. doi: 10.1890/15-1840.1.

Danner, N. *et al.* (2017) 'Honey bee foraging ecology: Season but not landscape diversity shapes the amount and diversity of collected pollen', *PLOS ONE*. Edited by W. Blenau, 12(8), p. e0183716. doi: 10.1371/journal.pone.0183716.

Danner, N., Härtel, S. and Steffan-Dewenter, I. (2014) 'Maize pollen foraging by honey bees in relation to crop area and landscape context', *Basic and Applied Ecology*, 15(8), pp. 677–684. doi: 10.1016/j.baae.2014.08.010.

Day, S. *et al.* (1990) 'The Nutrient Composition of Honeybee-Collected Pollen in Otago, New Zealand', *Journal of Apicultural Research*, 29(3), pp. 138–146. doi:

10.1080/00218839.1990.11101210.

Deba, F. *et al.* (2008) 'Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*', *Food Control*, 19(4), pp. 346–352. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.04.011.

DeGrandi-Hoffman, G. *et al.* (2008) 'Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations', *Journal of Apicultural Research*, 47(4), pp. 265–270. doi: 10.1080/00218839.2008.11101473.

DeGrandi-Hoffman, G. *et al.* (2010) 'The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.)', *Journal of Insect Physiology*, 56(9), pp. 1184–1191. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.03.017.

DeGrandi-Hoffman, G. *et al.* (2016) 'Honey bee colonies provided with natural forage have lower pathogen loads and higher overwinter survival than those fed protein supplements', *Apidologie*, 47(2), pp. 186–196. doi: 10.1007/s13592-015-0386-6.

DeGrandi-Hoffman, G. *et al.* (2018) 'Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies', *Journal of Insect Physiology*, 109, pp. 114–124. doi: 10.1016/j.jinsphys.2018.07.002.

Dimou, M. and Thrasyvoulou, A. (2007a) 'A comparison of three methods for assessing the relative abundance of pollen resources collected by honey bee colonies', *Journal of Apicultural Research*, 46(3), pp. 144–148. doi: 10.1080/00218839.2007.11101385.

Dimou, M. and Thrasyvoulou, A. (2007b) 'Seasonal variation in vegetation and pollen collected by honeybees in Thessaloniki, Greece', *Grana*, 46(4), pp. 292–299. doi: 10.1080/00173130701760718.

Dixon, P. (2003) 'VEGAN, a package of R functions for community ecology', *Journal of Vegetation Science*, 14(6), pp. 927–930. doi: 10.1111/j.1654-

1103.2003.tb02228.x.

Doull, K. M. (1974) 'Effects of Attractants and Phagostimulants in Pollen and Pollen Supplement on the Feeding Behaviour of Honeybees in the Hive', *Journal of Apicultural Research*, 13(1), pp. 47–54. doi: 10.1080/00218839.1974.11099758.

Doums, C. *et al.* (2002) 'Senescence of immune defence in *Bombus* workers', *Ecological Entomology*, 27(2), pp. 138–144. doi: 10.1046/j.1365-2311.2002.00388.x.

Dussaubat, C. *et al.* (2012) 'Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*', *PLoS ONE*. Edited by L. A. Moreira, 7(5), p. e37017. doi: 10.1371/journal.pone.0037017.

Echazarreta-González, C. (1999) 'Caracterización de la apicultura en la península de Yucatán'. Merida: Sisiera/UADY.

Echazarreta, C. M. *et al.* (1997) 'Beekeeping in the Yucatan peninsula: development and current status', *Bee World*, 78(3), pp. 115–127. doi: 10.1080/0005772X.1997.11099346.

Ellis, M. D. and Baxendale, F. P. (1997) 'Toxicity of Seven Monoterpenoids to Tracheal Mites (Acari: Tarsonemidae) and Their Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Hosts When Applied as Fumigants', *Journal of Economic Entomology*, 90(5), pp. 1087–1091. doi: 10.1093/jee/90.5.1087.

Erdtman, G. (1969) *Handbook of Palynology. Morphology - Taxonomy - Ecology. An Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores.*, *Feddes Repertorium*. Edited by Munksgaard. Copenhagen.

Evans, J. *et al.* (2006) 'Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*.' *Insect Mol Biol*, 15.

Evans, J. D. (2006) 'Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease', *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(2), pp. 135–139. doi: 10.1016/j.jip.2006.04.004.

- Faucon, J. P. (2005) 'La nosémose', *La santé de l'Abeille*, 209, pp. 343–367.
- Fleites-Ayil, F. A., Quezada-Euán, J. J. G. and Medina-Medina, L. A. (2018) 'Onset of foraging and lifespan of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) infected with different levels of *Nosema ceranae* spores in Neotropical Mexico', *Apidologie*, 49(6), pp. 781–788. doi: 10.1007/s13592-018-0602-2.
- Flores, J. S. (1990) 'The flowering periods of leguminosae in the Yucatan Peninsula in relation to honey flows', *Journal of Apicultural Research*. Taylor & Francis, 29(2), pp. 82–88.
- Folan, W. J. *et al.* (1983) 'Paleoclimatological patterning in southern Mesoamerica', *Journal of Field Archaeology*. Taylor & Francis, 10(4), pp. 453–468.
- Forsgren, E. and Fries, I. (2010) 'Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees', *Veterinary Parasitology*, 170(3–4), pp. 212–217. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.010.
- Franchi, G. G. *et al.* (1996) 'Types of carbohydrate reserves in pollen: Localization, systematic distribution and ecophysiological significance', *Flora*. doi: 10.1016/S0367-2530(17)30706-5.
- Frias, B. E. D., Barbosa, C. D. and Lourenço, A. P. (2016) 'Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health', *Apidologie*, 47(1), pp. 15–25. doi: 10.1007/s13592-015-0373-y.
- Fries, I. (1989) 'Observations on the Development and Transmission of *Nosema Apis* Z. In the Ventriculus of the Honeybee', *Journal of Apicultural Research*, 28(2), pp. 107–117. doi: 10.1080/00218839.1989.11100830.
- Fries, I. *et al.* (1996) '*Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae)', *European Journal of Protistology*, 32(3), pp. 356–365. doi: 10.1016/S0932-4739(96)80059-9.
- Fries, I. *et al.* (2006) 'Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey



---

bees', *Journal of Apicultural Research*, 45(4), pp. 230–233. doi: 10.1080/00218839.2006.11101355.

Fries, I. *et al.* (2013) 'Standard methods for Nosema research', *Journal of Apicultural Research*, 52(1), pp. 1–28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.14.

Fries, I., Morse, R. and Flottum, K. (1997) *Honeybee pests, predators and diseases*. Ohio, USA: Cornell University Press.

García-Rodríguez, L. J., Gay, A. C. and Pon, L. A. (2007) 'Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast', *The Journal of Cell Biology*, 176(2), pp. 197–207. doi: 10.1083/jcb.200606054.

Gilby, A. R. (1965) 'Lipids and Their Metabolism in Insects', *Annual Review of Entomology*, 10(1), pp. 141–160. doi: 10.1146/annurev.en.10.010165.001041.

Gillespie, J. P., Kanost, M. R. and Trenczek, T. (1997) 'BIOLOGICAL MEDIATORS OF INSECT IMMUNITY', *Annual Review of Entomology*, 42(1), pp. 611–643. doi: 10.1146/annurev.ento.42.1.611.

Gilliam, M. (1979a) 'Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*', *Apidologie*, 10, pp. 269–274.

Gilliam, M. (1979b) 'Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts', *Apidologie*, 10, pp. 43–53.

Gilliam, M. *et al.* (1988) 'Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*', *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(2), pp. 314–325. doi: 10.1016/0022-2011(88)90141-3.

Gilliam, M. (1997) 'Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees<sup>1</sup>', *FEMS Microbiology Letters*, 155(1), pp. 1–10. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x.

Gilliam, Martha, Prest, D. B. and Lorenz, B. J. (1989) 'Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds', *Apidologie* 1, 20, pp. 53–68.

Gilliam, M., Prest, D. B. and Lorenz, B. J. (1989) 'Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds', *Apidologie*, 20(1), pp. 53–68. doi: 10.1051/apido:19890106.

Goblirsch, M., Huang, Z. Y. and Spivak, M. (2013) 'Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection', *PLoS ONE*. Edited by G. V. Amdam, 8(3), p. e58165. doi: 10.1371/journal.pone.0058165.

Gómez, H. A. (1990) *Estudio del desarrollo de la apicultura de Quintana Roo, México*. Universidad Autónoma de México, Mexico, D.F.

González-Santoyo, I. and Córdoba-Aguilar, A. (2012) 'Phenoloxidase: a key component of the insect immune system', *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142(1), pp. 1–16. doi: 10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x.

De Groot, A. (1952) *Amino Acid requirements for growth of the honey bee (*Apis mellifera*)*.

De Groot, A. (1953) 'Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.)', *Physiolo. comparata et æcol.*, 3, pp. 197–285.

Güemes-Ricalde, F. J., Villanueva-G, R. and Eaton, K. D. (2003) 'Honey production by the Mayans in the Yucatan peninsula', *Bee World*, 84(4), pp. 144–154. doi: 10.1080/0005772X.2003.11099596.

Güemes Ricalde, F. J. and Pat Fernández, J. M. (2001) 'Condiciones actuales de la apicultura en el estado de Campeche'. Campeche, México: Conacyt-Sisierra, UQROO-ECOSUR, p. 32.

Gunn, J. and Adams, R. E. W. (1981) 'Climatic change, culture, and civilization in North America', *World Archaeology*. Taylor & Francis, 13(1), pp. 87–100.

Harwood, G., Amdam, G. and Freitak, D. (2019) 'The role of Vitellogenin in the

transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*)', *Journal of Insect Physiology*, 112, pp. 90–100. doi: 10.1016/j.jinsphys.2018.12.006.

van den Heever, J. P. *et al.* (2015) 'Stability of dicyclohexylamine and fumagillin in honey', *Food Chemistry*, 179, pp. 152–158. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.111.

Heinrich, B. (1980) 'Mechanisms of Body-Temperature Regulation in Honeybees, *Apis Mellifera*: II. Regulation of Thoracic Temperature at High Air Temperatures', *The Journal of Experimental Biology*, 85(1), pp. 73 LP – 87. Available at: <http://jeb.biologists.org/content/85/1/73.abstract>.

Herbario CICY, U. de R. N. (2010) *Flora Digital: Península de Yucatán*. Available at: [https://www.cicy.mx/sitios/flora digital/index.php](https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/index.php).

Herbert, E., Vanderslice, J. and Higgs, D. (1985) 'Effect of dietary vitamin C levels on the rate of brood production of freeflying and confined colonies of honey bees', *Apidologie*, 16, pp. 385–394.

Herbert, E. W. and Shimanuki, H. (1978) 'Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen', *Apidologie*, 9(1), pp. 33–40. doi: 10.1051/apido:19780103.

Herbert, E. W., Shimanuki, H. and Caron, D. (1977) 'Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing', *Apidologie*, 8(2), pp. 141–146. doi: 10.1051/apido:19770204.

Higes, M *et al.* (2007) 'Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia).', *J Invert Pathol*, 94.

Higes, Mariano *et al.* (2007) 'Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia)', *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), pp. 211–217. doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001.

Higes, M. *et al.* (2008) 'How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse.', *Environ Microbiol*, 10.

Higes, M., Martín-Hernández, R. and Meana, A. (2010) 'Nosema ceranae in Europe: an emergent type C nosemosis', *Apidologie*, 41(3), pp. 375–392. doi: 10.1051/apido/2010019.

Höcherl, N. *et al.* (2012) 'Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees', *Journal of Insect Physiology*, 58(2), pp. 278–285. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.12.001.

Hopkins, C. Y., Jevans, A. W. and Boch, R. (1969) 'Occurrence of octadeca-trans -2, cis -9, cis -12-trienoic acid in pollen attractive to the honey bee', *Canadian Journal of Biochemistry*, 47(4), pp. 433–436. doi: 10.1139/o69-067.

Hoshizaki, D. K. (2005) 'Complete Molecular Insect Science', *Fat-cell Development. Elsevier, Berlin*, pp. 315–345.

Huang, Q. *et al.* (2016) 'Effective Silencing of Dicer Decreases Spore Load of the Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*', *Fungal Genomics & Biology*, 06(02). doi: 10.4172/2165-8056.1000144.

Human, H. and Nicolson, S. W. (2006) 'Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae)', *Phytochemistry*, 67(14), pp. 1486–1492. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.05.023.

Invernizzi, C. *et al.* (2009) 'Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay', *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), pp. 150–153. doi: 10.1016/j.jip.2009.03.006.

Jack, C. J. *et al.* (2016) 'Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees', *Journal of Insect Physiology*, 87, pp. 12–19. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.01.004.

Jayanth, K. P. *et al.* (1993) 'Parthenium pollen induced feeding by *Zygogramma bicolorata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on sunflower ( *Helianthus annuus* ) (Compositae)', *Bulletin of Entomological Research*, 83(4), pp. 595–598. doi: 10.1017/S0007485300040013.

Jiang, X. *et al.* (2020) 'Secoeudesma sesquiterpenes lactone A alleviates inflammation and offers adjuvant protection in severe infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*', *Journal of Ethnopharmacology*, 252, p. 112605. doi: 10.1016/j.jep.2020.112605.

Johnson, R. (2007) *CRS Report for Congress: Recent Honey Bee Colony Declines*.

De Jong, D. *et al.* (2009) 'Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen', *Journal of Apicultural Research*, 48(1), pp. 34–37. doi: 10.3896/IBRA.1.48.1.08.

Katinka, M. *et al.* (2001) 'Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi* .', *Nature*, 414.

Keohane, E. M. and Weiss, L. M. (1998) 'Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review', *Folia parasitologica*. Praha: Czechoslovak Academy of Sciences., 45(2), pp. 117–127.

Knox, D. A., Shimanuki, H. and Herbert, E. W. (1971) 'Diet and the Longevity of Adult Honey Bees', *Journal of Economic Entomology*, 64(6), pp. 1415–1416. doi: 10.1093/jee/64.6.1415.

Kralj, J. and Fuchs, S. (2010) 'Nosema sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers', *Apidologie*, 41(1), pp. 21–28. doi: 10.1051/apido/2009046.

Kulic, M. *et al.* (2009) 'Examination of genotoxic effects of fumagillin in vivo', *Genetika*, 41(3), pp. 329–338. doi: 10.2298/GENSR0903329K.

Kwong, W. K. and Moran, N. A. (2016) 'Gut microbial communities of social bees', *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), pp. 374–384. doi: 10.1038/nrmicro.2016.43.

Labougle, J. M. (1991) 'Beekeeping in Mexico: past, present and future', *American bee journal (USA)*.

Labougle, J. M. and Zozaya, J. A. (1986) 'La apicultura en México', *Ciencia y desarrollo*, 12(69), pp. 17–36.

Larsson, R. (1986) *Ultrastructure, function, and classification of microsporidia*. Edited by J. O. Corliss and D. J. Patterson. Bristol, England: Progress in protistology.

Lavine, M. D. and Strand, M. R. (2002) 'Insect hemocytes and their role in immunity', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), pp. 1295–1309. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9.

Lee, F. J. *et al.* (2014) 'Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome', *Environmental Microbiology*, 17(3), pp. 796–815. doi: 10.1111/1462-2920.12526.

Lee, K. . *et al.* (2006) 'Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1588), pp. 823–829. doi: 10.1098/rspb.2005.3385.

Lee, K. P., Simpson, S. J. and Wilson, K. (2008) 'Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect', *Functional Ecology*, 22(6), pp. 1052–1061. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01459.x.

Leonhardt, S. D. and Blüthgen, N. (2012) 'The same, but different: pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies', *Apidologie*, 43(4), pp. 449–464. doi: 10.1007/s13592-011-0112-y.

Lepage, M. and Boch, R. (1968) 'Pollen lipids attractive to honeybees', *Lipids*, 3(6), pp. 530–534. doi: 10.1007/BF02530897.

Li, Q. *et al.* (2020) 'Antitumor activity and mechanism of costunolide and dehydrocostus lactone: Two natural sesquiterpene lactones from the Asteraceae family', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, p. 109955. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109955.

Li, W. *et al.* (2016) 'Silencing the Honey Bee (*Apis mellifera*) Naked Cuticle Gene ( *nkd* ) Improves Host Immune Function and Reduces *Nosema ceranae* Infections', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by H. L. Drake, 82(22), pp. 6779–6787.

doi: 10.1128/AEM.02105-16.

Liolios, V. *et al.* (2015) 'Ranking pollen from bee plants according to their protein contribution to honey bees', *Journal of Apicultural Research*, 54(5), pp. 582–592. doi: 10.1080/00218839.2016.1173353.

Loper, G. . *et al.* (1980) 'Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread', *Apidologie*, 11(1), pp. 63–73.

Loper, G. M. and Berdel, R. L. (1980a) 'A nutritional bioassay of honeybee brood-rearing potential', *Apidologie*, 11(2), pp. 181–189.

Loper, G. M. and Berdel, R. L. (1980b) 'The effects of nine pollen diets on broodrearing of honeybees', *Apidologie*, 11(4), pp. 351–359.

Loper, G. M. and Cohen, A. C. (1987) 'Amino Acid Content of Dandelion Pollen, a Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Nutritional Evaluation', *Journal of Economic Entomology*, 80(1), pp. 14–17. doi: 10.1093/jee/80.1.14.

Machado, A. M. D. *et al.* (2009) 'Helicobacter pylori Infection Induces Genetic Instability of Nuclear and Mitochondrial DNA in Gastric Cells', *Clinical Cancer Research*, 15(9), pp. 2995–3002. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2686.

Machado, F. P. P. *et al.* (2008) 'Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin', *Food Chemistry*, 107(2), pp. 649–655. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.061.

Magurran, A. E. (1989) *Ecological diversity and its measurement*. New Jersey: Princeton University Press.

Magurran, A. E. (2004) *Measuring biological diversity*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Maistrello, L. *et al.* (2008) 'Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees ( *Apis mellifera* )', *Apidologie*, 39(4), pp. 436–445. doi: 10.1051/apido:2008022.

Mak, T. W. and Saunders, M. E. (2005) *The immune response: basic and clinical principles*. Academic Press.

Martín-Hernández, R. *et al.* (2007) 'Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), pp. 6331–6338. doi: 10.1128/AEM.00270-07.

Martín-Hernández, R. *et al.* (2011) 'Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*)', *Parasitology Research*, 109(3), pp. 605–612. doi: 10.1007/s00436-011-2292-9.

Mattila, H. R. and Otis, G. W. (2006) 'Influence of Pollen Diet in Spring on Development of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies', *Journal of Economic Entomology*, 99(3), pp. 604–613. doi: 10.1093/jee/99.3.604.

Mayack, C. and Naug, D. (2009) 'Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection', *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), pp. 185–188. doi: 10.1016/j.jip.2008.12.001.

Mazerolle, M. (2013) *Model Selection and Multimodel Inference Based on (Q)AIC(c)*, *R package version*.

Milbrath, M. O. *et al.* (2015) 'Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees ( *Apis mellifera* )', *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY*. Elsevier Inc., 125, pp. 9–15. doi: 10.1016/j.jip.2014.12.006.

Morais, M. M. *et al.* (2013) 'Evaluation of inexpensive pollen substitute diets through quantification of haemolymph proteins', *Journal of Apicultural Research*, 52(3), pp. 119–121. doi: 10.3896/IBRA.1.52.3.01.

Morr, C. V. and Ha, E. Y. W. (1993) 'Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), pp. 431–476. doi: 10.1080/10408399309527643.



Nabors, R. (2000) 'The effects of spring feeding pollen substitute to colonies of *Apis mellifera*', *American Bee Journal*, 140(4), pp. 322–323.

Natsopoulou, M. E. *et al.* (2015) 'Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society, 282(1798), p. 20141896.

Natsopoulou, M. E., McMahon, D. P. and Paxton, R. J. (2016) 'Parasites modulate within-colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee', *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(7), pp. 1019–1031. doi: 10.1007/s00265-015-2019-5.

Naug, D. and Gibbs, A. (2009) 'Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*', *Apidologie*, 40(6), pp. 595–599. doi: 10.1051/apido/2009039.

Nicolson, S. W. and Human, H. (2008) 'Bees get a head start on honey production', *Biology Letters*, 4(3), pp. 299–301. doi: 10.1098/rsbl.2008.0034.

Nicolson, S. W. and Human, H. (2013) 'Chemical composition of the "low quality" pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae)', *Apidologie*, 44(2), pp. 144–152. doi: 10.1007/s13592-012-0166-5.

Oertel, E. *et al.* (1951) 'Inversion of Cane Sugar in the Honey Stomach of the Bee', *Journal of Economic Entomology*, 44(4), pp. 487–492. doi: 10.1093/jee/44.4.487.

Ohashi, K., Natori, S. and Kubo, T. (1999) 'Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.)', *European Journal of Biochemistry*, 265(1), pp. 127–133. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00696.x.

Oldroyd, B. P. and Palmer, K. A. (2003) 'Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry', *Naturwissenschaften*, 90(6), pp. 265–268. doi: 10.1007/s00114-003-0418-3.

Oliveira, K. C. L. S. *et al.* (2009) 'Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen', *Química Nova*, 32(5), pp. 1099–1102. doi: 10.1590/S0100-40422009000500003.

Park, W. (1925) 'The Storing and Ripening of Honey by Honeybees', *Journal of Economic Entomology*, 18(2), pp. 405–410. doi: 10.1093/jee/18.2.405.

Di Pasquale, G. *et al.* (2013) 'Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter?', *PLoS ONE*. Edited by J. Zeil, 8(8), p. e72016. doi: 10.1371/journal.pone.0072016.

Di Pasquale, G. *et al.* (2016) 'Variations in the Availability of Pollen Resources Affect Honey Bee Health', *PLOS ONE*. Edited by W. Blenau, 11(9), p. e0162818. doi: 10.1371/journal.pone.0162818.

Paul A. Opler, Frankie, G. W. and Baker, H. G. (1976) 'Rainfall as a Factor in the Release, Timing, and Synchronization of Anthesis by Tropical Trees and Shrubs', *Journal of Biogeography*, 3(3), pp. 231–236.

Paxton, R. J. *et al.* (2007) 'Nosema ceranae has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*', *Apidologie*, 38(6), pp. 558–565. doi: 10.1051/apido:2007037.

Peet, R. K. (1975) 'Relative Diversity Indices', *Ecology*, 56(2), pp. 496–498. doi: 10.2307/1934984.

Peña-Espinoza, M. *et al.* (2020) 'Anthelmintic and metabolomic analyses of chicory (*Cichorium intybus*) identify an industrial by-product with potent in vitro antinematodal activity', *Veterinary Parasitology*, 280, p. 109088. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109088.

Peng, Y.-S. *et al.* (1985) 'The digestion of dandelion pollen by adult worker honeybees', *Physiological Entomology*, 10(1), pp. 75–82. doi: 10.1111/j.1365-3032.1985.tb00021.x.

Peng, Y., D'Antuono, M. and Manning, R. (2012) 'Effects of pollen and artificial

diets on the hypopharyngeal glands of newly hatched bees ( *Apis mellifera* L.)', *Journal of Apicultural Research*, 51(1), pp. 53–62. doi: 10.3896/IBRA.1.51.1.07.

Peraza-Sánchez, S. R., Chan-Che, E. O. and Ruiz-Sánchez, E. (2005) 'Screening of Yucatecan Plant Extracts To Control *Colletotrichum gloeosporioides* and Isolation of a New Pimarene from *Acacia pennatula*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), pp. 2429–2432. doi: 10.1021/jf040422i.

Pernal, S. and Currie, R. (2001) 'The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees ( *Apis mellifera* L.)', *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51(1), pp. 53–68. doi: 10.1007/s002650100412.

Pernal, S. F. and Currie, R. W. (2000) 'Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees ( *Apis mellifera* L.)', *Apidologie*, 31(3), pp. 387–409. doi: 10.1051/apido:2000130.

Ptaszyńska, A. A. *et al.* (2018) 'Porphyrins inactivate *Nosema* spp. microsporidia', *Scientific Reports*, 8(1), p. 5523. doi: 10.1038/s41598-018-23678-8.

Quiroz-García, D. L. and Arreguín-Sánchez, M. de la L. (2008) 'Determinación palinológica de los recursos florales utilizados por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) en el estado de Morelos, México', *Polibotánica. scielomx*, (26), pp. 159–173.

Ricalde, F. J. G. *et al.* (2003) 'La apicultura en la Península de Yucatán. Actividad de subsistencia en un entorno globalizado', *Revista Mexicana del Caribe. Universidad de Quintana Roo*, 8(16), pp. 117–132.

Rinderer, T. E. and Dell Elliott, K. (1977a) 'Worker Honey Bee Response to Infection with *Nosema apis*: Influence of Diet', *Journal of Economic Entomology*, 70(4), pp. 431–433. doi: 10.1093/jee/70.4.431.

Rinderer, T. E. and Dell Elliott, K. (1977b) 'Worker Honey Bee Response to Infection with *Nosema apis*: Influence of Diet<sup>123</sup>', *Journal of Economic Entomology*, 70(4), pp. 431–433. doi: 10.1093/jee/70.4.431.

Rinderer, T. E., Rothenbuhler, W. C. and Gochnauer, T. A. (1974) 'The influence

of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus* larvae', *Journal of Invertebrate Pathology*, 23(3), pp. 347–350. doi: 10.1016/0022-2011(74)90100-1.

Ritz, C. and Spiess, A.-N. (2008) 'qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis', *Bioinformatics*, 24(13), pp. 1549–1551. doi: 10.1093/bioinformatics/btn227.

Rosenkranz, P., Aumeier, P. and Ziegelmann, B. (2010) 'Biology and control of *Varroa destructor*', *Journal of Invertebrate Pathology*. Elsevier Inc., 103(SUPPL. 1), pp. S96–S119. doi: 10.1016/j.jip.2009.07.016.

Roulston, T. H. and Cane, J. H. (2000) 'Pollen nutritional content and digestibility for animals', in *Pollen and pollination*, pp. 187–209.

Roulston, T. H., Cane, J. H. and Buchmann, S. L. (2000) 'What Governs Protein Content of Pollen: Pollinator Preferences, Pollen-Pistil Interactions, or Phylogeny?', *Ecological Monographs*, 70(4), p. 617. doi: 10.2307/2657188.

Ruedenauer, F. A., Spaethe, J. and Leonhardt, S. D. (2015) 'How to know which food is good for you: bumblebees use taste to discriminate between different concentrations of food differing in nutrient content', *Journal of Experimental Biology*, 218(14), pp. 2233–2240. doi: 10.1242/jeb.118554.

Ruedenauer, F. A., Spaethe, J. and Leonhardt, S. D. (2016) 'Hungry for quality—individual bumblebees forage flexibly to collect high-quality pollen', *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(8), pp. 1209–1217. doi: 10.1007/s00265-016-2129-8.

Ruiz, J. A. *et al.* (1998) 'El grooming en *Apis mellifera iberica* frente a *Varroa jacobsoni* Oud', *Archivos de zootecnia*, 47(178–179), pp. 213–218.

Saffari, A., Keva, P. G. and Atkinson, J. L. (2010) 'Palatability and consumption of patty-formulated pollen and pollen substitutes and their effects on honeybee colony performance.', *J. Apic. Sci*, 54, pp. 63–71.

Sagarpa-CEA (2003) *Información Apícola en México 1990-99*. Mexico.

SAGARPA (2004) 'Manual de buenas prácticas de producción de miel. Programa de inocuidad de los alimentos'. Mexico: SAGARPA.

Saint-Georges, Y. *et al.* (2008) 'Yeast Mitochondrial Biogenesis: A Role for the PUF RNA-Binding Protein Puf3p in mRNA Localization', *PLoS ONE*. Edited by J. Bähler, 3(6), p. e2293. doi: 10.1371/journal.pone.0002293.

Salmela, H., Amdam, G. V. and Freitak, D. (2015) 'Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin', *PLOS Pathogens*. Edited by D. S. Schneider, 11(7), p. e1005015. doi: 10.1371/journal.ppat.1005015.

Salvador-Flores, J. and Espejel-Carvajal, I. (1994) *Etnoflora yucateense. Tipos de vegetación de la Península de Yucatán*. 3rd edn, *Universidad Autónoma de Yucatán*. 3rd edn. Mérida, Yucatán.

Schmid-Hempel, R. and Schmid-Hempel, P. (1998) 'Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments', *Functional Ecology*, 12(1), pp. 22–30. doi: 10.1046/j.1365-2435.1998.00153.x.

Schmidt, J. O. (1984) 'Feeding preferences of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): individual versus mixed pollen species', *Journal of the Kansas entomological society*. JSTOR, pp. 323–327.

Schmidt, J. O. (1985) 'Phagostimulants in Pollen', *Journal of Apicultural Research*, 24(2), pp. 107–114. doi: 10.1080/00218839.1985.11100657.

Schmidt, J. O. and Buchmann, S. L. (1985) 'Pollen digestion and nitrogen utilization by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)', *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 82(3), pp. 499–503. doi: 10.1016/0300-9629(85)90423-2.

Schmidt, J. O. and Buchmann, S. L. (1999) *Other products of the hive*. The hive a. Edited by J. M. Graham. Hamilton, IL: Dadant and Sons.

Schmidt, J. O., Thoenes, S. C. and Levin, M. D. (1987) 'Survival of Honey Bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), Fed Various Pollen Sources', *Annals of the*

*Entomological Society of America*, 80(2), pp. 176–183. doi: 10.1093/aesa/80.2.176.

Schoenfeld, D. (1982) 'Partial residuals for the proportional hazards regression model', *Biometrika*, 69(1), pp. 239–241. doi: 10.1093/biomet/69.1.239.

Schwarz, G. (1978) 'Estimating the Dimension of a Model', *Annals of Statistics*, 6(2), pp. 461–464.

Seaman, F. C. (1982) 'Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the asteraceae', *The Botanical Review*, 48(2), pp. 121–594. doi: 10.1007/BF02919190.

Seehuus, S.-C. *et al.* (2006) 'Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), pp. 962–967. doi: 10.1073/pnas.0502681103.

Somerville, D. C. and Nicol, H. I. (2006) 'Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity', *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1), p. 141. doi: 10.1071/EA03188.

Sosa, A. *et al.* (2020) 'Trypanocidal activity of South American Vernonieae (Asteraceae) extracts and its sesquiterpene lactones', *Natural Product Research*, pp. 1–5. doi: 10.1080/14786419.2020.1739682.

Soto-Muciño, L. E., Elizarraras-Baena, R. and Soto-Muciño, I. (2017) 'Situación apícola en México y perspectiva de la producción de miel en el Estado de Veracruz', *Revista de Estrategias del Desarrollo Empresarial*, 3(7), pp. 40–64.

Starratt, A. N. and Boch, R. (1971) 'Synthesis of octadeca- trans -2, cis -9, cis -12-trienoic acid and its evaluation as a honey bee attractant', *Canadian Journal of Biochemistry*, 49(2), pp. 251–254. doi: 10.1139/o71-036.

van der Steen, J. (2007) 'Effect of a home-made pollen substitute on honey bee colony development', *Journal of Apicultural Research*, pp. 114–119. doi: 10.3896/IBRA.1.46.2.09.

Steffan-Dewenter, I. and Kuhn, A. (2003) 'Honeybee foraging in differentially structured landscapes', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1515), pp. 569–575. doi: 10.1098/rspb.2002.2292.

Steffan-Dewenter, I. and Tschardtke, T. (1999) 'Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set', *Oecologia*, 121(3), pp. 432–440. doi: 10.1007/s004420050949.

Steffan, S. A. *et al.* (2019) 'Omnivory in Bees: Elevated Trophic Positions among All Major Bee Families', *The American Naturalist*, 194(3), pp. 414–421. doi: 10.5061/dryad.b6063f5.

Steinhauer, N. A. *et al.* (2014) 'A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership', *Journal of Apicultural Research*, 53(1), pp. 1–18. doi: 10.3896/IBRA.1.53.1.01.

Stoltz, D. R. *et al.* (1970) 'Cytogenetic Studies with Cyclamate and Related Compounds', *Science*, 167(3924), pp. 1501–1502. doi: 10.1126/science.167.3924.1501.

Strand, M. R. (2008) 'The insect cellular immune response', *Insect Science*, 15(1), pp. 1–14. doi: 10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x.

Sugumaran, M. (1988) 'Molecular Mechanisms for Cuticular Sclerotization', in, pp. 179–231. doi: 10.1016/S0065-2806(08)60124-1.

Svoboda, J. A. *et al.* (1978) 'Insect steroid metabolism', *Lipids*, 13(10), pp. 742–753. doi: 10.1007/BF02533755.

Svoboda, J. A. *et al.* (1982) 'Utilization and metabolism of dietary sterols in the honey bee and the yellow fever mosquito', *Lipids*, 17(3), pp. 220–225. doi: 10.1007/BF02535107.

Svoboda, J. A. *et al.* (1986) 'Selective sterol transfer in the honey bee: Its significance and relationship to other hymenoptera', *Lipids*, 21(1), pp. 97–101. doi: 10.1007/BF02534310.

Tanner, G. *et al.* (2012) 'Comparison of mass versus individual inoculation of worker honey bees with *Nosema ceranae*', in *Proceedings of the 8th COLOSS Conference / MC meeting FA0803. Halle-Saale, Germany*, p. 59.

Tasei, J.-N. and Aupinel, P. (2008) 'Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers ( *Bombus terrestris* , Hymenoptera: Apidae)', *Apidologie*, 39(4), pp. 397–409. doi: 10.1051/apido:2008017.

Team, R. C. (2019) 'R: A language and environment for statistical computing'. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.r-project.org/>.

Teixeira, E. W. *et al.* (2013) 'Nosema ceranae has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees', *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3), pp. 250–254. doi: 10.1016/j.jip.2013.09.002.

Tellería, M. C. *et al.* (2019) 'Protein Content of Pollen of Asteraceae Collected by Honey Bees', *Bee World*, 96(4), pp. 104–107. doi: 10.1080/0005772X.2019.1634958.

Therneau, T. M. (2015) 'A Package for Survival Analysis in S. version 2.38'. Available at: <https://cran.r-project.org/package=survival>.

Toth, A. L. (2005) 'Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees', *Journal of Experimental Biology*, 208(24), pp. 4641–4649. doi: 10.1242/jeb.01956.

Traver, B. E. and Fell, R. D. (2011) 'Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia', *Journal of Invertebrate Pathology*, 107(1), pp. 43–49. doi: 10.1016/j.jip.2011.02.003.

Tsaousis, A. D. *et al.* (2008) 'A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*', *Nature*, 453(7194), pp. 553–556. doi: 10.1038/nature06903.

Tsuruda, J. M., Amdam, G. V. and Page, R. E. (2008) 'Sensory Response System of Social Behavior Tied to Female Reproductive Traits', *PLoS ONE*. Edited by L.



Keller, 3(10), p. e3397. doi: 10.1371/journal.pone.0003397.

UNAM-SENASICA (2017) 'Estudio de algunos de los factores que influyen en la pérdida de colonias de abejas en diferentes estados de importancia apícola de la República Mexicana', in *CONVENIO UNAM-SENASICA 48545-1361-26-V-17*.

Vandame, R. and Palacio, M. A. (2010) 'Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping?', *Apidologie*, 41(3), pp. 243–255. doi: 10.1051/apido/2010025.

Vásquez, A. and Olofsson, T. C. (2009) 'The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread', *Journal of Apicultural Research*, 48(3), pp. 189–195. doi: 10.3896/IBRA.1.48.3.07.

Vavrek, M. (2011) 'Fossil: Palaeoecological and Palaeogeographical Analysis Tools', *Palaeontologia Electronica*, 14, p. 16.

Villanueva, R. (1999) 'Pollen Resources Used by European and Africanized Honey Bees in the Yucatan Peninsula, Mexico', *Journal of Apicultural Research*, 38(1–2), pp. 105–111. doi: 10.1080/00218839.1999.11101001.

Wagenmakers, E.-J. and Farrell, S. (2004) 'AIC model selection using Akaike weights', *Psychonomic Bulletin & Review*, 11(1), pp. 192–196. doi: 10.3758/BF03206482.

Wahl, O. and Ulm, K. (1983) 'Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*', *Oecologia*, 59(1), pp. 106–128. doi: 10.1007/BF00388082.

Waser, N. M. and Ollerton, J. (eds) (2006) *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. University of Chicago Press.

Weiner, C. N. *et al.* (2010) 'Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees', *Apidologie*, 41(4), pp. 476–487. doi: 10.1051/apido/2009083.

White, D. A. and Hood, C. S. (2004) 'Vegetation patterns and environmental

gradients in tropical dry forests of the northern Yucatan Peninsula', *Journal of Vegetation Science*. Wiley Online Library, 15(2), pp. 151–160.

White Jr., J. W., Subers, M. H. and Schepartz, A. I. (1963) 'The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system', *Biochimica et Biophysica Acta*, 73(1), pp. 57–70. doi: 10.1016/0006-3002(63)90359-7.

Williams, G. R. *et al.* (2011) 'Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? q', *Journal of Invertebrate Pathology*. Elsevier Inc., 99(3), pp. 342–344. doi: 10.1016/j.jip.2008.04.005.

Williams, G. R. *et al.* (2013) 'Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions', *Journal of Apicultural Research*, 52(1), pp. 1–36. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.04.

Williams, Geoffrey R *et al.* (2014) 'Infra-population and-community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts', *PLoS one*. Public Library of Science, 9(7).

Williams, Geoffrey R. *et al.* (2014) 'Infra-Population and -Community Dynamics of the Parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and Consequences for Honey Bee (*Apis mellifera*) Hosts', *PLoS ONE*. Edited by O. Rueppell, 9(7), p. e99465. doi: 10.1371/journal.pone.0099465.

Wilson-Rich, N., Dres, S. T. and Starks, P. T. (2008) 'The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*)', *Journal of Insect Physiology*, 54(10–11), pp. 1392–1399. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.07.016.

Wilson, W. T. and Nunamaker, R. A. (1983) 'The Incidence of *Nosema Apis* in Honeybees in Mexico', *Bee World*, 64(3), pp. 132–136. doi: 10.1080/0005772X.1983.11097930.

Winston, M. L. (1991) *The biology of the honey bee*. harvard university press.

Wittner, M. and Weiss, L. M. (1999) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington DC: American Society of Microbiology.

Wolf, S. *et al.* (2014) 'So Near and Yet So Far: Harmonic Radar Reveals Reduced Homing Ability of Nosema Infected Honeybees', *PLoS ONE*. Edited by N. E. Raine, 9(8), p. e103989. doi: 10.1371/journal.pone.0103989.

Wood, W., Faria, C. and Jacinto, A. (2006) 'Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*', *Journal of Cell Biology*, 173(3), pp. 405–416. doi: 10.1083/jcb.200508161.

Wright, G. A., Nicolson, S. W. and Shafir, S. (2018) 'Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees', *Annual Review of Entomology*, 63(1), pp. 327–344. doi: 10.1146/annurev-ento-020117-043423.

Yang, K. *et al.* (2013) 'Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), pp. 708–718. doi: 10.1021/jf304056b.

Yang, N.-Y. *et al.* (2007) 'Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium lindleyanum*', *Journal of Asian Natural Products Research*, 9(4), pp. 339–345. doi: 10.1080/10286020600727673.

Yang, X. and Cox-Foster, D. L. (2005) 'Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), pp. 7470–7475. doi: 10.1073/pnas.0501860102.

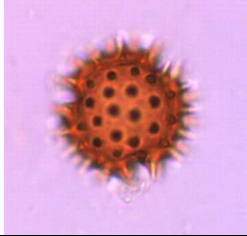
Zapata Bello, R. R. (2017) 'Decreto XXX/2017 por el que se establecen las zonas apícolas del estado de Yucatán, para el fomento de su aprovechamiento racional',.



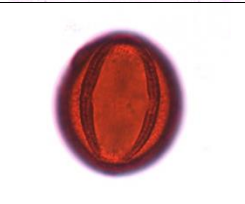


Zuur, A. F. *et al.* (2009) 'Mixed effects models and extensions in ecology with R', in. New York, NY: Springer New York (Statistics for Biology and Health), p. 574. doi: 10.1007/978-0-387-87458-6.

## ANEXOS


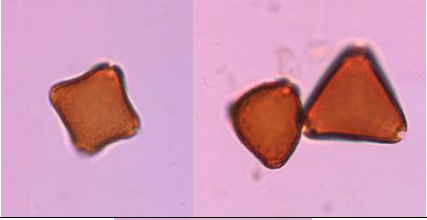
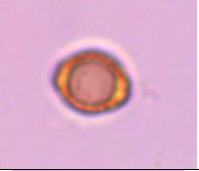


## ANEXO I.

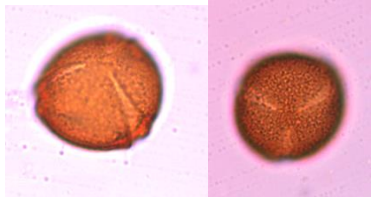


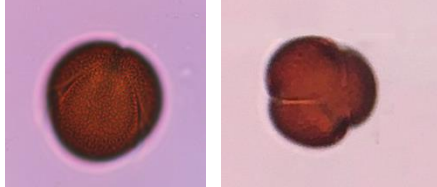
**Tipos de granos de polen identificados en el pan de abejas de tres colmenas del apiario “Los africanos” de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, colectado el mes de febrero (temporada de sequía de la región)**

Tipo de polen	Familia	Nombre científico	Nombre común	Mes de colecta	Temporada de floración	Foto	Porcentaje
1	Asteraceae	<i>Viguiera dentata</i>	Tajonal	Febrero	Noviembre-marzo		68.29
2	Polygonaceae	<i>Gymnopodium floribundum</i>	Ts'íits'ilché	Febrero	Diciembre-junio		12.28

3	Desconocido	-	-	Febrero	-		4.04
4	Arecaceae	-	-	Febrero	-		5.08
5	Asteraceae	<i>Trixis inula</i>	<i>Ya'ax k'an aak'</i>	Febrero	Agosto-abril		0.57
7	Bombacaceae	<i>Ceiba pentandra</i>	Ceiba	Febrero	Diciembre-febrero		0.05
8	Fabaceae			Febrero		Falta foto	0.10
10	Convolvulaceae	-	-	Febrero	-		0.10


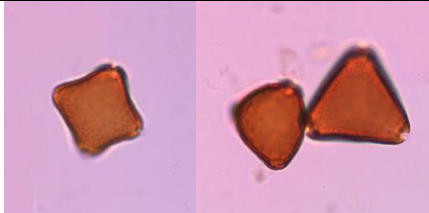


ANEXOS

11	Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i>	Huaxin	Febrero	Todo el año		2.23
12	Sapindaceae	<i>Thouinia paucidentata</i>	K'an chunúuo	Febrero	Marzo, Julio-diciembre		0.57
13	Ulmaceae	<i>Trema micrantha</i>	Sak pixooy	Febrero	Todo el año		0.05
14	Moraceae	<i>Cecropia peltata</i>	K'áaxil	Febrero	Todo el año		0.16
15	Fabaceae	<i>Mimosa sp.</i>	-	Febrero	-		0.05

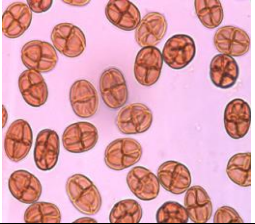
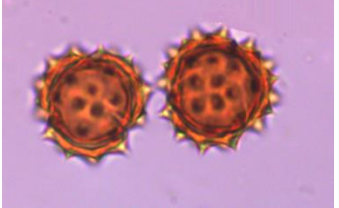

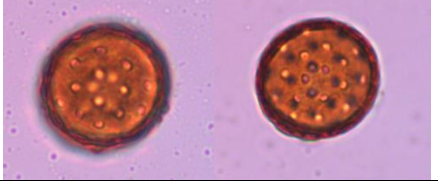
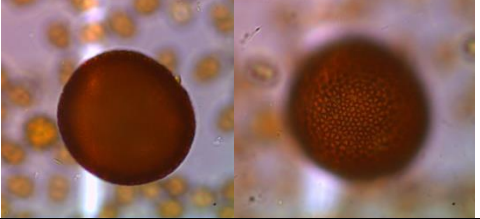
16	Convolvulaceae	<i>Merremia sp.</i>	-	Febrero	-		5.60
17	Desconocido	-	-	Febrero	-		0.05
18	Poaceae	-	-	Febrero y agosto	-		0.10
19	Desconocido	-	-	Febrero	-		0.67

## ANEXO II.

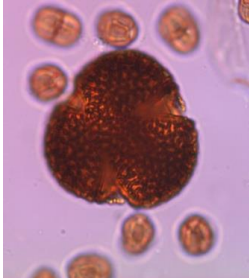
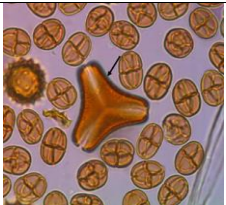

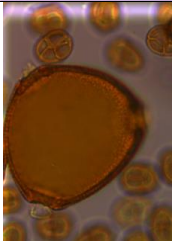
**Tipos de granos de polen identificados en el pan de abejas de tres colmenas del apiario “Los africanos” de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, colectado el mes de agosto (temporada de lluvias de la región)**

Tipo de polen	Familia	Nombre científico	Nombre común	Mes de colecta	Temporada de floración	Foto	Porcentaje
11	Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i>	Huaxin	Febrero	Todo el año		0.05
12	Sapindaceae	<i>Thouinia paucidentata</i>	K'an chunúuo	Febrero	Marzo, Julio-diciembre		0.01
18	Poaceae	-	-	Febrero y agosto	-		0.09
20	Fabaceae	<i>Acacia gaumeri</i>	Box káatsim	Agosto	Julio		1.98



21	Fabaceae	<i>Mimosa sp.</i>	-	Agosto	-		94.85
22	Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	Kán múul	Agosto	Todo el año		2.58
23	Desconocido	-	-	Agosto	-		0.06
25	Amaranthaceae	<i>Amaranthus sp.</i>	-	Agosto	-		0.16
26	Euphorbiaceae	<i>Croton fragilis</i>	Táan che´	Agosto	Febrero, junio		0.05

## ANEXOS

27	Verbenaceae	<i>Stachytarpheta jamaicensis</i>		Agosto			0.03
28	Convolvulaceae	<i>Ipomea carnea</i>	<i>ke'elil, choko kat</i>	Agosto	Todo el año	Falta foto	0.04
29	Desconocido	-	-	Agosto	-		0.01
30(5)	Polygonaceae	<i>Neomillspaughia emarginata</i>	<i>Sak itsa´</i>	Agosto	Marzo-mayo y julio-agosto		0.09
31(32)	Sapindaceae	<i>Talisia floresii</i>	<i>k'oolok</i>	Agosto	Abril-agosto		0.01

