

Estudio comparativo de tres pruebas para evaluar el comportamiento higiénico en colonias de abejas (*Apis mellifera* L.)*

Comparative study of three assays to evaluate hygienic behavior in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies

Laura G. Espinosa-Montaño** Ernesto Guzmán-Novoa*** Alejandro Sánchez-Albarrán†
Hugo H. Montaldo‡ Adriana Correa-Benítez**

Abstract

The discriminatory capacity, cost and practicality of three assays to measure hygienic behavior in 60 honey bee colonies were compared in a first experiment. Capped worker brood of these colonies were killed with an insect pin (P), frozen in a freezer at -18°C (CC) and with liquid nitrogen at -195°C (CN₂). The percentage of brood removed by the bees was recorded 24 h after being killed. Since the P assay showed a low discriminatory capacity, an additional experiment with 50 colonies was performed, reducing the evaluation time to 8 h and verifying the influence of body fluids and odors released by the pin-killed brood. Colonies were significantly more hygienic ($P < 0.01$) with the P assay (88%) than with the CC (69%) and CN₂ (65%) assays. There were significant correlations among assays ($r > 0.54$, $P < 0.01$) and between replicates within assays ($r > 0.37$, $P < 0.01$). Variation among colonies was greater with the CN₂ and CC assays than with the P assay. The P assay was the least expensive and easiest to apply (6.59 pesos, 0.58 dollars per colony), but showed the lowest discriminatory capacity, that could not be enhanced even though the time of evaluation was reduced. This could have been caused by the strong stimulus from odors and haemolymph released from the pin-killed brood. The CN₂ and the CC assays showed a high discriminatory capacity, but the former was more expensive (14.80 pesos, 1.31 dollars) and the least practical. The CC assay was the second least expensive (10.15 pesos, 0.90 dollars) and practical. The application of either freeze assays is recommended for screening hygienic behavior in honey bees because of their reliability.

Key words: *APIS MELLIFERA* L., HYGIENIC BEHAVIOR, ASSAYS, DISCRIMINATORY CAPACITY, COSTS, MEXICO.

Resumen

Se comparó la capacidad discriminatoria, costo y facilidad de aplicación de tres pruebas para medir el comportamiento higiénico en 60 colonias de abejas melíferas en un primer experimento. Las crías operculadas de estas colonias fueron sacrificadas al puncionarlas con un alfiler entomológico (P), y congelarlas en congelador a -18°C (CC) con nitrógeno líquido a -195°C (CN₂). Se determinó el porcentaje de crías removidas por las abejas 24 h después de que fueron sacrificadas. Como consecuencia de la poca discriminación entre colonias inicialmente encontrada con la prueba P, se realizó un experimento adicional con 50 colonias, reduciendo el tiempo de lectura a 8 h y se verificó el efecto producido por la emanación de olores y fluidos de las crías sacrificadas. Las colonias fueron significativamente más higiénicas ($P < 0.01$) con la prueba P (88%), en comparación con la de CC (69%) y CN₂ (65%). Se encontraron correlaciones significativas entre pruebas ($r > 0.54$, $P < 0.01$) y entre repeticiones dentro de pruebas ($r > 0.37$, $P < 0.01$). La variación entre colonias fue mayor con las pruebas CN₂ y CC que con la P. La prueba P fue la más económica y práctica de aplicar (6.59 pesos, 0.58 dólares, por colonia), pero mostró menor capacidad discriminatoria, que no se incrementó aun cuando se redujo el tiempo de lectura. Este resultado pudo deberse al fuerte estímulo provocado por olores y hemolinfa emanados de las crías sacrificadas. Las pruebas CN₂ y CC mostraron alta capacidad discriminatoria, pero la primera fue más cara (14.80 pesos, 1.31 dólares) y la menos práctica. La prueba CC fue la segunda más económica (10.15 pesos, 0.90 dólares) y práctica. Se recomienda aplicar cualquiera de las pruebas de congelación para medir el comportamiento higiénico de colonias de abejas melíferas por su confiabilidad.

Palabras clave: *APIS MELLIFERA* L., COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO, PRUEBAS, CAPACIDAD DISCRIMINATORIA, COSTOS, MÉXICO.

Recibido el 3 de mayo de 2006 y aceptado el 21 de noviembre de 2007.

*Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor.

**Departamento de Producción Animal: Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, ON N1G2W1, Canadá.

†Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla 8534, Jiutepec, 62550, Morelos, México.

‡Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Correspondencia: Laura G. Espinosa Montaño, teléfono: 5622-5929, correo electrónico: laugespi@servidor.unam.mx

Introduction

Hygienic behavior is referred as the ability of some adult honey bees to detect, uncap and remove diseased or dead larvae or pupae from their cells.¹ That is why this behavior has been identified as one of the main mechanisms that confer resistance to honey bees against parasites and pathogens.^{2,3} Rothenbuhler¹ and Park⁴ showed that bees remove dead brood killed by *Paenibacillus larvae* (American foulbrood), while other researchers found that some bees remove brood infected with *Ascosphaera apis* (chalkbrood)⁵⁻⁷ and brood infested with *Varroa destructor*,⁸⁻¹⁰ which in turn, restrains its reproduction and restricts its population growth.

It is known that the expression of hygienic behavior is variable, and that this variability is partially caused by the influence of environmental factors such as the age of the removed brood,¹¹ the abundance of brood and adult bees in the colonies, and by the increased amount of nectar gathered by bees.¹²⁻¹⁴ Another source of variation that influences the expression of hygienic behavior corresponds to genetic effects. The genetic basis of this behavior was studied by Rothenbuhler,¹⁵ who proposed as an explanation the influence of two different *loci*, one of them responsible of uncapping and the other with the removing of afflicted brood. Later on, Moritz¹⁶ indicated that this character followed a more complex model of inheritance and Lapidge *et al.*¹⁷ detected seven *loci* that influence its expression. Other studies have demonstrated that hygienic behavior is an heritable trait, which would allow the development of hygienic bees by genetic breeding programs.^{13,18,19}

One of the basic requirements to begin breeding programs consists in applying reliable, economic and practical measurement techniques that identify the genetic variation in the assessed traits. Methods currently employed to evaluate hygienic behavior consist in killing a specific number of pupae (capped brood) in order to estimate the percentage removed by the worker bees of a colony. Procedures employed to sacrifice capped brood involve puncturing it, using an entomologic needle,²⁰ and two freezing methods, one which consists in placing a comb section with capped brood inside a freezer at -18°C to -20°C for at least 24 h,^{3,21} and the other in applying liquid nitrogen (N_2) over a selected capped brood area, which causes instantaneous death of the brood.²²

Researchers in the United States of America have compared some techniques to measure hygienic behavior in honey bee colonies. Newton and Ostasiewski²⁰ compared the pin-killing method with the freeze-killing method at -18°C , and estimated a correlation of 0.956 from five tested colonies; although

Introducción

El comportamiento higiénico se refiere a la capacidad de algunas abejas adultas para detectar, desopercular y remover de las celdas, larvas o pupas enfermas o muertas;¹ por ello, este comportamiento ha sido identificado como uno de los principales mecanismos que confieren resistencia a las abejas melíferas contra parásitos y patógenos.^{2,3} Rothenbuhler¹ y Park⁴ demostraron que las abejas retiran crías muertas por *Paenibacillus larvae* (loque americana), mientras que otros investigadores encontraron que algunas abejas remueven las crías afectadas por *Ascosphaera apis* (cría de cal),⁵⁻⁷ y las crías infestadas con el ácaro *Varroa destructor*,⁸⁻¹⁰ lo cual restringe su reproducción y limita su crecimiento poblacional.

Se sabe que la expresión del comportamiento higiénico es variable, lo que se debe, en parte, a la influencia de factores ambientales, entre éstos destacan: edad de las crías removidas,¹¹ abundancia de abejas adultas y crías en las colonias, así como incremento en la cantidad de néctar recolectado por las abejas.¹²⁻¹⁴ Otra fuente de variación que influye en la expresión del comportamiento higiénico corresponde a efectos genéticos. La base genética de este comportamiento fue estudiada por Rothenbuhler,¹⁵ quien propuso como explicación la influencia de dos *loci* diferentes, uno relacionado con la desoperculación y otro con la remoción de las crías afectadas. Posteriormente, Moritz¹⁶ indicó que la herencia de este carácter sigue un modelo más complejo, y Lapidge *et al.*¹⁷ detectaron siete *loci* que influyen en su expresión. Otros estudios han demostrado que el comportamiento higiénico es heredable, lo cual permitiría desarrollar abejas higiénicas en programas de mejoramiento genético.^{13,18,19}

Una necesidad básica para emprender programas de selección y mejoramiento genético consiste en aplicar técnicas de medición confiables, económicas y prácticas que identifiquen la variación genética en las características a estudiar. Los métodos que en la actualidad se utilizan para evaluar el comportamiento higiénico consisten en sacrificar determinado número de pupas (crías cerradas u operculadas), con la finalidad de estimar la proporción o porcentaje de ellas, que es removida por las abejas obreras de una colonia. Los procedimientos utilizados para sacrificar a las crías operculadas incluyen la punción por medio de un alfiler entomológico con el que se perfora tanto el opérculo como la pupa en desarrollo,²⁰ y dos tipos de congelación: uno consiste en introducir una sección de panal con crías operculadas en un congelador a -18°C o -20°C por un mínimo de 24 h,^{3,21} y otro mediante la aplicación de nitrógeno líquido (N_2) sobre el panal, lo que produce muerte instantánea de las crías.²²

they did not calculate the cost of the former method, they argued that its application was practical, so they did not hesitate to recommend it instead of the freezing method. Spivak and Downey³ also compared the pin-killing with the freezing techniques. In their study, they got a correlation of 0.8905 ($P < 0.01$, $n = 11$ colonies) between the time honey bees spent to take out punctured and frozen pupae from the cells. Moreover, they classified the hygienic response of their colonies in each of three categories: hygienic, intermediate and non-hygienic. They considered hygienic colonies those that removed more than 95% of dead brood and non-hygienic those that removed $\leq 5\%$ of the brood in the course of 48 h and in two consecutive trials. In accordance with these categories they compared hygienic responses of the colonies between both methods, in such a way that they noticed that when they applied the pin-killing technique, bees quickly detected the haemolymph released by the killed brood, provoking an intense cleaning response. Consequently, contrary to what occur in the freezing method, the number of colonies that expressed a false hygienic trait increased. Therefore, these researchers did not consider that the puncture technique was reliable.

The three mentioned methods have been assayed in Mexico;²³⁻²⁵ however, there are no studies that had compared these methods in their capacity to differentiate high hygienic colonies from low hygienic colonies (discriminatory capacity). Neither their costs nor their application facility have been estimated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the discriminatory capacity and estimate the costs and the facility application of three assays to measure hygienic behavior (puncture, freezing in a freezer at -18°C and freezing with N_2) in honey bee colonies of *Apis mellifera* L.

Material and methods

The research was conducted between October and November 2003 in the Center of Genetic Breeding, Generation and Transfer of Technology in Apiculture, which belongs to the National Institute of Forestry, Agriculture and Animal Research (INIFAP for its Spanish meaning), located in the km 29 state free road Tenango del Valle-Ixtapan de la Sal, Villa Guerrero municipality, State of Mexico, Mexico. The municipality is located in the southeast part of the State of Mexico, at $99^{\circ} 38' 00''$ West longitude and at $18^{\circ} 58' 36''$ North latitude, 2 160 masl. The weather of this zone is warm sub-humid (C(w)), with summer rains. This municipality presents an annual average temperature of 17°C and an annual average rainfall of 1 242.53 mm.²⁶

Investigadores de Estados Unidos de América han comparado algunas técnicas para medir el comportamiento higiénico en colonias de abejas melíferas. Newton y Ostasiewski²⁰ compararon la técnica de punción con la de congelación a -18°C , y estimaron una correlación entre éstas de 0.956 a partir de cinco colonias evaluadas, y aunque no estimaron sus costos, argumentaron que implicaba poco trabajo para aplicarla, por ello no dudaron en recomendarla en sustitución de la prueba de congelación. Spivak y Downey³ también compararon las técnicas de punción y de congelación. En su estudio obtuvieron una correlación de 0.8905 ($P < 0.01$, $n = 11$ colonias) para el tiempo que las abejas tardaron en remover las pupas congeladas y puncionadas; además clasificaron sus colonias en tres categorías: higiénicas, intermedias y no higiénicas. Consideraron colonias higiénicas a las que en el transcurso de 48 h y en dos pruebas consecutivas, removieron más de 95% de las crías muertas, y no higiénicas a las que removieron $\leq 5\%$ de las crías. Con base en estas categorías compararon las respuestas higiénicas de las colonias entre los métodos ensayados, de tal forma que observaron que al aplicar la técnica de punción, las abejas detectaron rápidamente la hemolinfa liberada de las crías sacrificadas, ello propició una respuesta intensa de limpieza, y por consiguiente, contrario a lo que ocurre al aplicar la técnica de congelación, se incrementó el número de colonias que al parecer expresaron de manera falsa la característica higiénica. Por ello, estos investigadores consideraron que la técnica de punción no resultaba confiable.

En México ya se han aplicado las tres técnicas mencionadas;²³⁻²⁵ sin embargo, ningún estudio las ha evaluado de manera comparativa en cuanto a su capacidad para diferenciar colonias altamente higiénicas de las poco higiénicas (capacidad discriminatoria). Tampoco se han estimado sus costos y facilidad de aplicación. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad discriminatoria y estimar el costo y facilidad de aplicación de tres pruebas para medir el comportamiento higiénico (punción, congelación en congelador a -18°C y congelación con N_2) en colonias de abejas *Apis mellifera* L.

Material y métodos

La investigación se realizó entre octubre y noviembre de 2003 en el Centro de Mejoramiento Genético, Generación y Transferencia de Tecnología Apícola, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), que se ubica en el km 29 de la carretera estatal Tenango del Valle-Ixtapan de la Sal, municipio de Villa Guerrero, Estado de México, México. El municipio se encuentra al suroeste del estado a $99^{\circ} 38' 00''$ de longitud Oeste y $18^{\circ} 58'$

Establishment of experimental colonies

For the development of the experiments, 110 honey bee colonies were used. The colonies were established in Jumbo type hives, initially assembled with three brood combs and approximately 2 kg of worker bees. In order to start experiments under uniform conditions it was proceeded as follows: a queen bee was introduced (randomly assigned) in each hive and it was identified with a numerated plastic tag attached to its thorax. Likewise, a preventive treatment against European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) and American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) was administered, dusting over the top bars of the brood frames a 25 g mixture made with 400 g of powdered sugar and 5.5 g of HCL oxytetracycline.* Besides, a treatment against *Varroa destructor* was administered, introducing two plastic strips impregnated with flumethrin.** Strips remained in the colonies for nine weeks, either with the purpose of keeping them free or with low levels of mite infestation. All the colonies were managed in the same way, feeding them with 2 L of 50% sugar syrup (sucrose and water in a 1:1 weight ratio) each 15 days. Two experiments were carried out eight weeks after removing flumethrin strips, this time was enough for the replacement of the original worker bees by those derived from the introduced queens.

Experiment 1

This experiment was carried out in order to evaluate the discriminatory capacity, estimate costs and to assess the practicability of application of three assays to measure hygienic behavior in 60 honey bee colonies. The three assays were applied the same day in the same comb obtained from each experimental colony, and were repeated 15 days later. In all tests we selected comb areas that had the greater quantity of pink eyed pupae.²

Freezing test using a freezer (CC)

A day before applying the three tests, a frame from each experimental colony was chosen, and a 6 × 5 cm section with at least 100 cells of capped brood was cut out. The sections were properly identified and individually placed in polyethylene bags, then they were carried to the laboratory in a polystyrene icebox with coolants while they were introduced into a freezer (-18°C) for 24 h. Once this time finished, the sections were taken out of the freezer and the number of capped cells were counted in both sides of the comb section. Later on, they were carried to the apiary to be re-introduced in the corresponding frame of its experimental colony.

36° de latitud Norte, a 2 160 msnm. El clima es templado-subhúmedo (C(w)), con lluvias en verano. Este municipio presenta temperatura promedio anual de 17°C con precipitación de 1 242.53 mm.²⁶

Establecimiento de las colonias experimentales

Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron 110 colonias de abejas que fueron alojadas en colmenas tipo Jumbo, constituidas inicialmente por tres bastidores con crías y alrededor de 2 kg de abejas obreras. Para homologar las condiciones de las colonias se procedió así: a cada colmena se le introdujo una reina (asignada en forma aleatoria), identificada con una placa de plástico numerada y pegada sobre su tórax; asimismo, se administró tratamiento preventivo contra loque europea (*Melissococcus pluton*) y loque americana (*Paenibacillus larvae*): sobre los bastidores de la cámara de cría se esparcieron 25 g de una mezcla de 400 g de azúcar pulverizada con 5.5 g de oxitetraciclina HCl.* Además se les aplicó tratamiento contra *Varroa destructor* mediante introducción de dos tiras plásticas impregnadas con flumetrina.** Las tiras permanecieron en las colonias durante nueve semanas, con la finalidad de que quedaran libres o con muy bajos niveles del ácaro. A todas las colonias se les dio manejo uniforme al alimentarlas cada 15 días con 2 L de jarabe de azúcar al 50% (sacarosa/agua a partes iguales por peso). Este trabajo implicó la realización de dos experimentos que se iniciaron ocho semanas después de retirar las tiras de flumetrina, tiempo suficiente para que las obreras hijas de las reinas introducidas reemplazaran a la población inicial.

Experimento 1

Este experimento se realizó para evaluar la capacidad discriminatoria, estimar los costos y analizar la facilidad de aplicación de tres pruebas para medir el comportamiento higiénico en 60 colonias de abejas. Las tres pruebas se aplicaron el mismo día en un mismo panal obtenido de cada colonia experimental y se repitieron a los 15 días. Para todas las pruebas se seleccionaron áreas del panal que tuvieran la mayor cantidad de pupas en etapa de ojos color rosado.²

Prueba de congelación en congelador (CC)

Un día antes de aplicar las tres pruebas se escogió un bastidor de cada colonia experimental, del cual se

*Terramicina polvo soluble fórmula animal®, Pfizer, México.

**Bayvarol®, Bayer, México.

Freezing test using liquid nitrogen (CN₂)

Another area with at least 100 brood cells from the comb was chosen (the same comb from which the former section was cut out). A metallic cylinder of 7 cm diameter × 11 cm height, without the two end covers, was fitted over this area, pressuring it with rotating movements. Immediately, the cylinder was slowly filled with 250 mL of liquid nitrogen (at -195° C) to kill the brood. Once the ice formed over the comb melted, the cylinder was removed, so the number fully capped cells in the frozen area could be counted.

Piercing test (P)

By means of an entomologic needle, 100 pupae aligned in a horizontal pattern in the selected comb were pin-killed. To ensure the death of the brood, the needle was inserted in the middle of each cell until touching its bottom. To facilitate the identification of the perforated cells, two short pins* were inserted in the borders of each row, one at the beginning and the other at the end of each array.

Measurement of hygienic behavior

After applying the three methods, the selected comb of each hive was identified with a thumbtack fixed over the top bar of its frame and then the frame was reintroduced in the middle of the brood chamber of its hive. Twenty four hours later, the percentage of killed brood removed was recorded using the formula:

$$\left[\frac{\text{Number of pupae removed}}{\text{total number of treated cells (pierced or frozen)}} \right] \times 100.$$

Classification of the degree of hygienic response

After being evaluated with each one of the tests, the experimental colonies were classified in accordance with their degree of hygienic response as follows: low, intermediate or high hygienic behavior. Colonies that showed high hygienic behavior were those that removed more than 95% of killed brood, intermediate those that removing rates were among 50% to 95%, and those with rates below 50% were classified as low hygienic colonies.

Costs

The cost of application (one replicate) of each trial was estimated considering the following components: a) equipment, where investment expenses, the depreciation of a 7" horizontal freezer and a 20.5 L liquid

cortó una sección de panal de 6 × 5 cm, que tuviera al menos 100 celdas con crías operculadas. Las secciones se colocaron individualmente dentro de bolsas de polietileno debidamente identificadas, y se transportaron al laboratorio en una hielera de poliestireno con refrigerantes, para después introducirlas en un congelador (-18°C) durante 24 h. Finalizado este tiempo, las secciones se sacaron del congelador y en cada una de ellas se contó el número de celdas operculadas en ambos lados del panal. Luego se llevaron al apiario y se reinsertaron en los bastidores correspondientes en cada colonia experimental.

Prueba de congelación con nitrógeno líquido (CN₂)

Se escogió otra área del mismo panal (del que se cortó la sección para la prueba anterior), con al menos 100 celdas de crías operculadas. Sobre esta área se encajó un cilindro metálico de 7 cm de diámetro × 11 cm de altura, sin tapa en los dos extremos, ejerciendo ligera presión con movimientos giratorios. Enseguida se vertió lentamente en el interior del cilindro 250 mL de nitrógeno líquido (a -195°C) para sacrificar a las crías. Al derretirse el hielo formado sobre el panal, se retiró el cilindro para contar las celdas íntegramente operculadas en el área congelada.

Prueba de punción (P)

Se utilizó un alfiler entomológico para puncionar y sacrificar 100 pupas en celdas alineadas horizontalmente sobre el panal seleccionado. El alfiler se introdujo en el centro de cada celda hasta tocar el fondo de ésta, para asegurar la muerte de las crías. Con el propósito de facilitar la identificación de las celdas perforadas se insertaron alfileres cortos* en los extremos de cada fila, uno al inicio y el otro al final de cada hilera.

Medición del grado de comportamiento higiénico

Después de aplicar los tres métodos, el panal seleccionado de cada colmena se identificó con una tachuela clavada sobre el cabezal superior de su bastidor y se reintrodujo al centro de la cámara de cría de su colmena. La lectura de resultados del comportamiento higiénico se realizó a las 24 h de aplicadas las pruebas y consistió en determinar el porcentaje de crías sacrificadas que fueron removidas por las abejas, utilizando la fórmula:

*Alfileres para marcar sitios en mapas, Maped®, México

nitrogen container were included, b) labor, where the support of four people with four minimal wages each was included, calculated in the year 2003,²⁷ and taking into consideration the number of days required for the execution of each test, c) transportation, in this component the expenses of fuel and maintenance of a truck that surrendered a displacement of 8 km/L of gasoline was included. The depreciation of this vehicle was not included due its antiquity overcame ten years, d) supplies, in this item there were considered the prices of liquid nitrogen, entomologic needles, metallic cylinders, knives, etc., e) the unexpected expenses, as the emergent expenditures that represented the 10% of all the previous components.

Facility of application

The facility of application of the tests was determined in relation to the number of trips that were employed for their execution. Specifically, there were considered the days destined to the selection of the brood comb, the execution of the surveys and data recording. Besides, the time employed for each trial in each colony was measured.

Experiment 2

This experiment was conducted because the results of the first experiment showed that the puncture test had a low discriminatory capacity; but since it resulted to be the most practical and economic to apply in the field, it was decided to carry out this additional assay. The purpose was to verify if the discriminatory capacity of the pin-killing test could be enhanced by reducing the recording time from 24 to 8, as well as to verify if the odors and fluids emanated from the killed brood, stimulated an artificially and a faster hygienic response (environmentally induced) of the bees. Three treatments were compared and applied at the same time in a brood comb obtained from each one of the 50 colonies. The first treatment was carried out just as described above, the second was carried out selecting another area of the comb, where the capping of 100 cells was partially opened, taking care of not damaging the pupa. The third treatment (control) consisted in selecting another area of the same comb, in which 100 cells of capped brood were delimited. In these cells, neither the caps nor the pupae were damaged (only the caps were touched with the needle).

Statistical analysis

To determine the discriminatory capacity and reliability of the tests of the first experiment, and by this way be able to differentiate with a better possible precision

[Número de pupas removidas/total de celdas tratadas (puncionadas o congeladas)] × 100

Clasificación del grado de higiene

Luego de ser evaluadas con cada una de las pruebas, las colonias experimentales se clasificaron según su grado de limpieza, en colonias de bajo, intermedio o alto comportamiento higiénico. Las colonias de alto comportamiento higiénico fueron aquellas con lecturas superiores a 95% de remoción de crías sacrificadas, las de comportamiento intermedio tuvieron lecturas entre 50% y 95%, y las de bajo grado de higiene retiraron menos de 50% de las crías.

Costos

La estimación del costo de la aplicación (repetición) de cada prueba por colonia se realizó considerando las siguientes variables: a) el equipo, que incluyó gastos de inversión y depreciación de un congelador horizontal de 7" y termo para almacenar 20.5 L de nitrógeno líquido, b) la mano de obra, ésta se estimó considerando la participación de cuatro personas. A cada una se le asignaron tres salarios mínimos para 2003,²⁷ al considerar el número de días que requirió la ejecución de cada prueba, c) el transporte, en este rubro se incluyeron los gastos de combustible y mantenimiento de una camioneta que rindió un desplazamiento de 8 km/L de gasolina. No se incluyó la depreciación del vehículo en virtud de que su antigüedad superaba los diez años, d) los insumos, dentro de éstos se consideró el precio del nitrógeno líquido, materiales como alfileres entomológicos, cilindros metálicos, cuchillos, etc., e) los gastos imprevistos, como las erogaciones emergentes, que representaron 10% de dichos conceptos.

Facilidad de aplicación

La facilidad de aplicación de las pruebas se determinó en función del número de viajes (días) que se utilizaron para su realización; esto es, se consideraron los traslados destinados a la selección del panal, la ejecución de las técnicas y la lectura de resultados. También se midió el tiempo empleado para usar cada prueba en cada colonia.

Experimento 2

Este experimento se realizó debido a que los resultados del experimento 1 mostraron que la prueba de punción tenía baja capacidad discriminatoria, pero dado que resultó ser la más práctica y económica de aplicar en campo, se realizó este experimento adicional con el propósito de comprobar si se podía aumentar su

colonies with high and low hygienic behavior, dispersion measures and Pearson's^{28,29} correlation coefficients were estimated, between the two replicates and among the tests. It is assumed that the more variation is found between colonies in their expression of hygienic behavior, and the higher correlation and/or less variation between replicates is present, the better discriminatory capacity and reliability of a test.^{30,31} For the above mentioned, a variance ratio test was accomplished, so we could compare the variances obtained from the three techniques applied and also to compare the variability obtained from two measurements carried out within each technique.³²

To determine differences among the three categories, the averages of removal responses of the colonies (from the two replicates) were subjected to an analysis variance with a fixed effects statistical model, except for the piercing test, in which by means of a Student's t test, the responses of the colonies previously classified as high and intermediate hygienic behavior were compared. Additionally, in order to identify differences between the three techniques applied in the first experiment, an analysis variance with a fixed effects model was performed.^{28,29} Previous to the statistical analyses, data were transformed to provide a normal distribution. Transformation was performed by means of the root-square of the proportion arcsine procedure.³² The following model considered was:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

where:

Y_{ij} = j th proportion of hygienic response (transformed) from the i th category or technique applied

μ = general mean

T_i = i th effect of the category or technique applied

E_{ij} = experimental error NID ($0, \sigma^2$)

Data obtained from the second experiment were also transformed with the root-square of the proportion arcsine procedure. A Student's t test and a variance ratio test were performed with the purpose of comparing hygienic responses recorded at 24 h and 8 h after piercing the brood (experiments 1 and 2, respectively). Likewise, an analysis of variance with the model previously cited was performed to compare the hygienic responses of the treatments of piercing, partial removing of the cells' cappings and control. Finally, for all the variance analyses the Tukey's multiple comparison test was performed.^{28,29}

capacidad discriminatoria mediante la reducción del tiempo de lectura de 24 a 8 h, así como para verificar si los olores y fluidos emanados como resultado de la perforación de las crías sacrificadas, estimulaba artificialmente una rápida respuesta higiénica (ambientalmente inducida) de las abejas. La prueba de punción se usó para comparar tres tratamientos que se aplicaron al mismo tiempo en un panal obtenido de cada una de 50 colonias. El primer tratamiento se realizó tal como se describió antes, el segundo se llevó a cabo seleccionando otra área del panal, donde se retiró parcialmente el opérculo de las 100 celdas, cuidando no dañar a la pupa. El tercer tratamiento (testigo) consistió en seleccionar otra área del mismo panal, en la que se delimitaron 100 celdas de cría operculada. En estas celdas no se dañó ni a los opérculos ni a las pupas (sólo se tocaron los opérculos con el alfiler).

Análisis estadísticos

Para determinar la capacidad discriminatoria y confiabilidad de las pruebas del primer experimento y así diferenciar con la mayor precisión posible, colonias con alto y bajo comportamiento higiénico, se obtuvieron medidas de dispersión y coeficientes de correlación de Pearson^{28,29} entre las dos repeticiones (mediciones) y entre las pruebas. Se asume que entre más variación se encuentre en la expresión del comportamiento higiénico entre colonias, y entre mayor grado de correlación o menor variación exista entre las repeticiones, la prueba resulta mejor en términos de capacidad discriminatoria y confiabilidad.^{30,31} Por lo anterior, se realizó una prueba de razón de varianzas, tanto para comparar las varianzas obtenidas de las tres técnicas aplicadas como para comparar las varianzas obtenidas de las dos mediciones realizadas en cada técnica.³²

Para determinar diferencias entre las tres categorías, los promedios de respuesta de las colonias (de las dos repeticiones) se sometieron a un análisis de varianza con un modelo de efectos fijos, con excepción de la prueba de punción, en la cual mediante una prueba "t" de Student, se compararon las respuestas de las colonias clasificadas como de alto e intermedio comportamiento higiénico. Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza bajo un modelo de efectos fijos para verificar diferencias entre las tres técnicas aplicadas del primer experimento.^{28,29} Previo a estos análisis, los datos se transformaron mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a una distribución normal.³² El modelo general utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = j -ésima proporción de comportamiento higiénico

Results

Experiment 1

Relationship between tests

There were positive and significant correlations for the hygienic behavior responses obtained from the three tests ($P < 0.01$, Table 1). Significant differences were detected among tests for the percentage of brood removed by the bees ($F = 30.122$; $df = 2,177$; $P < 0.01$). Colonies expressed higher hygienic behavior for brood killed in the piercing assay (88%), in comparison with brood frozen in the freezer (69%), and with brood frozen with liquid nitrogen (65%). There was no difference between these latter tests ($P > 0.05$, Table 2).

Discriminatory capacity and reliability

Higher variation was observed among colonies with both freezing tests in comparison with the piercing test ($P < 0.05$, Table 2). There was no difference among the variances of the freezing tests ($P > 0.05$). The correlation between replicates was of $r = 0.56$, 0.45 y 0.37 ($n = 60$, $P < 0.01$, in all cases), for the freezing tests using a freezer and with liquid nitrogen and for the piercing test, respectively. There was no difference among the variances of the two measurements of each test ($P > 0.05$).

The number and percentage of colonies classified as low, intermediate and high hygienic behavior is shown in Table 3. Five to six colonies ($\leq 10\%$) were classified as highly hygienic with the freezing tests, but 25 were classified as highly hygienic with the piercing test (41.7%); actually, no colony entered in the category of low hygienic behavior with this last test.

nico (transformada) de la i -ésima categoría o técnica aplicada

μ = media general

T_i = efecto de la i -ésima categoría o técnica aplicada

E_{ij} = error experimental NID ($0, \sigma^2$)

Los datos obtenidos del segundo experimento también se transformaron con la función arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Se realizó un análisis de "t" de Student y una prueba de comparación de varianzas para comparar las respuestas obtenidas entre la prueba de punción leída a las 24 h y a las 8 h (experimentos 1 y 2, respectivamente). Asimismo, los tratamientos de punción, retiro parcial del opérculo y testigo se compararon mediante análisis de varianza bajo el modelo de efectos fijos anteriormente señalado. Finalmente, para todos los análisis de varianza se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.^{28,29}

Resultados

Experimento 1

Relación entre pruebas

Se encontraron correlaciones positivas y significativas para las respuestas de comportamiento higiénico obtenidas de las tres pruebas ($P < 0.01$, Cuadro 1). Se detectaron diferencias significativas entre las pruebas para el porcentaje de crías removidas por las abejas ($F = 30.122$; $gl = 2,177$; $P < 0.01$). Las colonias expresaron mayor comportamiento higiénico para las crías sacrificadas con la prueba de punción (88%), en comparación con la de congelación en congelador (69%) y con la de congelación con nitrógeno líquido (65%). Entre estas dos últimas pruebas no hubo diferencia ($P > 0.05$, Cuadro 2).

Cuadro 1

CORRELACIONES PARA LAS RESPUESTAS DE COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO OBTENIDAS DE 60 COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS EVALUADAS CON TRES PRUEBAS: CONGELACIÓN EN CONGELADOR (CC), CONGELACIÓN CON NITRÓGENO LÍQUIDO (CN₂) Y PUNCIÓN (P)

CORRELATIONS FOR THE HYGIENIC BEHAVIOR RESPONSES OF 60 HONEY BEE COLONIES EVALUATED WITH THREE TESTS: FREEZING IN A FREEZER (CC), FREEZING WITH LIQUID NITROGEN (CN₂) AND PIERCING (P)

	r	n	P
CC-CN ₂	0.63	60	< 0.0001
CC-P	0.54	60	< 0.0001
CN ₂ -P	0.62	60	< 0.0001

Significant differences were found among colonies that expressed low, intermediate and high hygienic behavior in the freezer and liquid nitrogen freezing tests ($F = 88.31$; $df = 2,57$; $P < 0.01$ and $F = 46.14$; $df = 2,57$; $P < 0.01$, respectively), and between colonies that expressed intermediate and high hygienic behavior with the piercing test ($t = 8.27$, $df = 58$, $P < 0.01$) (Table 3). Figure 1 shows the distribution of colonies that expressed different degrees of hygienic responses with the three tests.

Costs and practicality of application

Referring to costs and application of each test per beehive, the most expensive was the freezing assay with liquid nitrogen with a cost of 14.80 pesos (1.31 dollars), followed by the freezing assay using a freezer, which its cost was of 10.15 pesos (0.90 dollars). The least expensive was the piercing assay with a cost of 6.59 pesos (0.58 dollars). The piercing method was also the most practical, since it required 17 min on average for its application in only two trips made to the apiary. In contrast, the least practical tests were those of freezing with liquid nitrogen and freezing with a freezer, since they required 23 and 18 min for their application per beehive, as well as two and three trips to the apiary, respectively (Table 4).

Capacidad discriminatoria y confiabilidad

Se observó mayor variación entre colonias con las dos pruebas de congelación, en comparación con la de punción ($P < 0.05$, Cuadro 2). No se halló diferencia entre las varianzas de las pruebas de congelación en congelador y congelación con nitrógeno líquido ($P > 0.05$). La correlación entre repeticiones fue de $r = 0.56$, 0.45 y 0.37 ($n = 60$, $P < 0.01$ en todos los casos) para las pruebas de congelación en congelador, congelación con nitrógeno líquido y punción, respectivamente. No se encontró diferencia entre las varianzas de las repeticiones de cada prueba ($P > 0.05$).

El número y porcentaje de colonias clasificadas como de bajo, intermedio y alto comportamiento higiénico se muestra en el Cuadro 3. De cinco a seis colonias ($\leq 10\%$) fueron clasificadas de alto comportamiento higiénico con las pruebas de congelación, pero 25 se clasificaron altamente higiénicas usando la prueba de punción (41.7%); asimismo, ninguna colonia entró en la categoría de bajo comportamiento higiénico con esta última prueba. Se encontraron diferencias significativas entre las colonias que expresaron bajo, intermedio y alto comportamiento higiénico con las pruebas de congelación en congelador y con nitrógeno líquido ($F = 88.31$; $gl = 2,57$; $P < 0.01$ y $F = 46.14$; $gl = 2,57$; $P < 0.01$, respectivamente) y entre las colonias que expresaron intermedio y alto comportamiento higiénico con la prueba de punción (t

Cuadro 2

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO DE 60 COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS EVALUADAS CON TRES PRUEBAS: CONGELACIÓN EN CONGELADOR (CC), CONGELACIÓN CON NITRÓGENO LÍQUIDO (CN₂) Y PUNCIÓN (P)
DESCRIPTIVE STATISTICS OF HYGIENIC BEHAVIOR OF 60 HONEY BEE COLONIES EVALUATED WITH THREE TESTS: FREEZING IN A FREEZER (CC), FREEZING WITH LIQUID NITROGEN (CN₂) AND PIERCING (P)

<i>Hygienic behavior (% ± S.D.)</i>						
<i>Test</i>	<i>Measurement 1</i>	<i>Measurement 2</i>	<i>Total</i>	<i>Variance</i>	<i>Minimum-maximum values (%)</i>	<i>Coefficient of variation (%)</i>
CC	69.1 ± 22.4	68.3 ± 22.9	68.7 ± 20.0 ^a	400.54	27.2-99.5	29.1
CN ₂	67.1 ± 25.1	62.3 ± 23.3	64.7 ± 20.6 ^a	424.53	23.2-99.5	31.8
P	89.9 ± 14.5	86 ± 15.5	88.0 ± 12.4 ^b	154.47	52.4-100	14.1

Different letters show significant differences ($P < 0.01$) with Tukey's multiple comparison test

Cuadro 3

FRECUENCIA ABSOLUTA (RELATIVA) Y PROMEDIOS $\pm$ DE DE COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS CLASIFICADAS EN BAJO, INTERMEDIO Y ALTO COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO, LUEGO DE SER EVALUADAS CON TRES PRUEBAS: CONGELACIÓN EN CONGELADOR (CC), CONGELACIÓN CON NITRÓGENO LÍQUIDO (CN₂) Y PUNCIÓN (P)

ABSOLUTE FREQUENCY (RELATIVE) AND MEANS $\pm$ SD, OF HONEY BEE COLONIES CLASSIFIED IN LOW, INTERMEDIATE AND HIGH HYGIENIC BEHAVIOR, AFTER BEING EVALUATED WITH THREE TESTS: FREEZING IN A FREEZER (CC), FREEZING WITH LIQUID NITROGEN (CN₂) AND PIERCING (P)

<i>Test</i>	<i>Low behavior</i> < 50.0%	<i>Intermediate behavior</i> 50.0 ≤ 95.0%	<i>High behavior</i> > 95.0%
CC	12 (20.0)	43 (71.7)	5 (8.3)
Mean $\pm$ SD	40.71 $\pm$ 7 ^a	73.13 $\pm$ 14.34 ^b	97.76 $\pm$ 1.71 ^c
CN ₂	15 (25.0)	39 (65.0)	6 (10.0)
Mean $\pm$ SD	37.67 $\pm$ 8.28 ^a	70.02 $\pm$ 12.02 ^b	97.69 $\pm$ 1.40 ^c
P	0 (0.0)	35 (58.3)	25 (41.7)
Mean $\pm$ SD		81.23 $\pm$ 12.53 ^a	97.29 $\pm$ 1.61 ^b

Different letters between columns indicate significant differences ($P < 0.01$) with Tukey's and Student's *t* (piercing assay), comparison tests. Statistical analyses were performed with data transformed with the root-square of the proportion arcsine procedure. Means are displayed without transformation.

Experiment 2

No significant differences were found among the hygienic responses of the colonies when the measurements of the piercing test were done at 8 and 24 h ($t = 0.72$, $df = 108$, $P > 0.05$); neither it was found difference between the variances of both recording times ($F = 1.54$; $df = 59, 49$; $P > 0.05$). Significant differences were found among the hygienic responses of the three treatments of this experiment ($F = 609.63$; $df = 2, 147$; $P < 0.01$). The mean ($\% \pm S.D.$) of the hygienic response of the pierced brood was 85.5 ± 15.44 , while the mean of the brood removed in the treatment where the cappings were partially opened without piercing the brood was 14.3 ± 10.76 , and that of the control treatment was 2.1 ± 3.98 (Figure 2).

Discussion

Experiment 1

Results revealed that the three tests measured the bees' hygienic behavior in a related way, since there were significant correlations among them (Table 1). Spivak and Downey³ as well as Newton and Ostasiewski²⁰ also found correlation among the proportion of brood that was pin-killed and when it was frozen in a freezer, but

= 8.27, $gl = 58$, $P < 0.01$) (Cuadro 3). En la Figura 1 se muestra la distribución de colonias que expresaron diferentes grados de respuesta higiénica con las tres pruebas aplicadas.

Costos y facilidad de aplicación

En cuanto a los costos de aplicación de cada prueba por colmena, la más cara fue la de congelación con nitrógeno líquido, 14.80 pesos (1.31 dólares), seguida de la prueba de congelación en congelador, cuyo costo fue de 10.15 pesos (0.90 dólares), mientras que la más económica fue la de punción, 6.59 pesos (0.58 dólares). El método de punción también fue el más práctico, por requerir de 17 min en promedio, para su aplicación, en sólo dos viajes realizados al apiario. En contraparte, las pruebas menos prácticas fueron las de congelación con nitrógeno líquido y en congelador, ya que para su aplicación se invirtieron 23 y 18 min por colmena, así como dos y tres viajes al apiario, respectivamente (Cuadro 4).

Experimento 2

No se encontraron diferencias significativas entre las respuestas higiénicas de las colonias a las 8 y 24 h de lectura con la prueba de punción ($t = 0.72$, $gl = 108$, $P >$

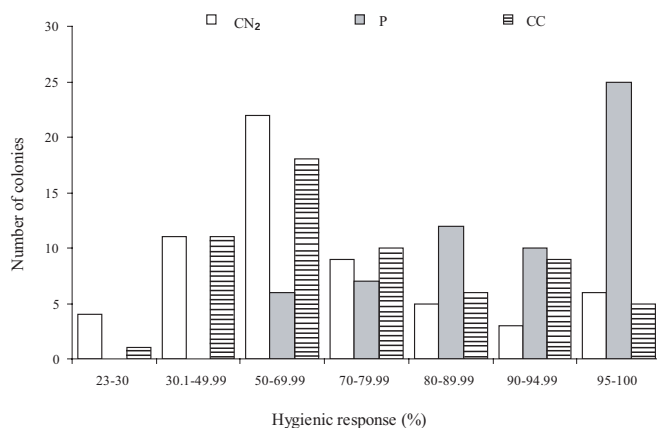


Figura 1: Distribución de diferentes grados de respuesta higiénica en 60 colonias de abejas después de aplicar las pruebas de congelación con nitrógeno líquido (CN₂), punción (P) y congelación en congelador (CC).

Figure 1: Distribution of different degrees of hygienic response in 60 honey bee colonies, after applying the tests of freezing with liquid nitrogen (CN₂), piercing (P) and freezing in a freezer (CC).

Cuadro 4

COSTO ESTIMADO, TIEMPO INVERTIDO Y NÚMERO DE VISITAS REQUERIDAS POR COLONIA, PARA APLICAR LAS PRUEBAS DE CONGELACIÓN EN CONGELADOR (CC), CONGELACIÓN CON NITRÓGENO LÍQUIDO (CN₂) Y PUNCIÓN (P), CON EL FIN DE EVALUAR EL COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO DE COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS EN VILLA GUERRERO, ESTADO DE MÉXICO

ESTIMATED COST, TIME INVESTED AND NUMBER OF VISITS (TRIPS) DESTINATED TO APPLY THE TESTS OF FREEZING IN A FREEZER (CC), FREEZING WITH LIQUID NITROGEN (CN₂) AND PIERCING (P), TO EVALUATE HYGIENIC BEHAVIOR IN HONEY BEE COLONIES IN VILLA GUERRERO, STATE OF MEXICO

Components	Tests		
	CC	CN ₂	P
Costs* per hive (one replicate)			
Equipment	0.12 (0.01)	0.26 (0.02)	0.00 (0.00)
Labor	8.06 (0.71)	5.61 (0.49)	5.37 (0.47)
Transportation	0.88 (0.08)	0.58 (0.05)	0.58 (0.05)
Supplies	0.17 (0.01)	7.00 (0.62)	0.04 (0.00)
Unexpected expenses	0.92 (0.08)	1.35 (0.12)	0.60 (0.05)
Total	10.15 (0.90)	14.80 (1.31)	6.59 (0.58)
Advantages/disadvantages			
Number of trips (days)	3 [†]	2**	2**
Time spent (min)	18	23	17

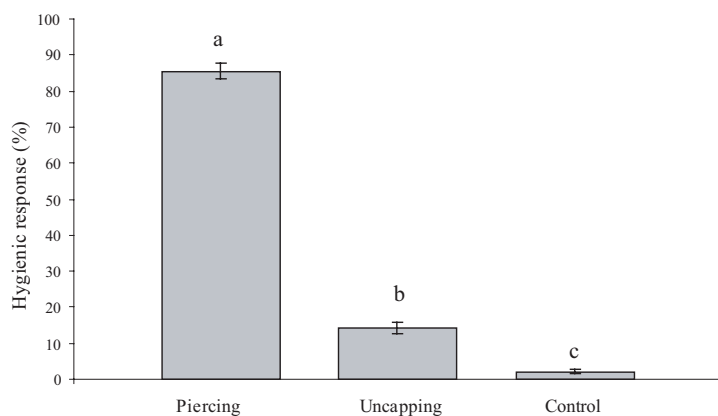
* Cost in Mexican pesos (US\$). Dollar price update: November 28, 2003 (11.3385 Mexican pesos)³⁵

** Trip 1 = comb selection and test application; Trip 2 = data recording.

† Trip 1 = comb selection and section cutting; Trip 2 = test application; Trip 3 = data recording.

they did not compare these tests with that of freezing with liquid nitrogen. Correlations among tests probably obey to the fact that in the three cases the brood is killed, and the bees have the capacity to detect and remove dead brood.^{1,7}

0.05); tampoco se halló diferencia entre las varianzas de los dos tiempos de lectura (F = 1.54; gl = 59, 49; P > 0.05), pero sí se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos de este experimento (F = 609.63; gl = 2, 147; P < 0.01). La media registrada (% ±



Results of the piercing test showed the least variability among colonies, and in accordance with the established criteria, which was sustained with their distribution and their minimum and maximum values, only colonies with intermediate and high hygienic behavior could be detected (Tables 2 and 3, Figure 1); so its discriminatory capacity and reliability was lower. In spite of its low discriminatory capacity, the piercing test was the least expensive and the most practical procedure to measure hygienic behavior in bees (Table 4). Other researchers have also arrived to the same conclusion.^{20,33}

Greater variability among colonies was found with the freezing test using liquid nitrogen compared to the piercing test (Table 2); therefore, colonies with high and low level of hygienic behavior could be detected (Table 3, Figure 1). The correlation between replicates of this assay was significant ($r = 0.45$, $P < 0.01$) and there was no difference between the variances of the two measurements ($P > 0.05$). These evidences support its discriminatory capacity and reliability. Other qualities of the freezing test using liquid nitrogen, reside in that it causes an instantaneous death of the brood, and only two trips to the apiary for its implementation are necessary. However, the following disadvantages were observed: the liquid nitrogen is difficult to acquire, it is expensive, a special container is needed to be stored, and a vehicle is required to transport it. Moreover, the weight of the container complicated its mobilization under field conditions; therefore, to nimble the experiments it was necessary to increase the number of assistants for their application. Besides, it was the method that took the longer time for its application (23 min), and additional security steps had to be taken to avoid accidents that could provoke burnings to the personnel that applied it. These circumstances contributed to increase its costs and to consider it as impractical; therefore, inaccessible for most commercial beekeepers.

The freezing test using a freezer had a significant

Figura 2: Porcentaje promedio de comportamiento higiénico ($\pm$ EE.) de 50 colonias de abejas melíferas tras la aplicación de tres tratamientos: punción de las crías, desoperculación sin daño a las crías y testigo. Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) basadas en un análisis de varianza y en una prueba de comparación múltiple de Tukey, con datos transformados mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción.

Figure 2: Mean percentage of hygienic behavior ($\pm$ EE.) of 50 honey bee colonies after the application of three treatments: brood piercing, uncapping without damaging the brood and control. Different letters show significant differences ($P < 0.05$) with an analysis of variance and the Tukey's multiple comparison test. Statistical analysis was performed with data transformed with the root-square of the proportion arcsine procedure.

DE) para la limpieza de las celdas puncionadas fue de 85.5 ± 15.44 , mientras que la media de remoción del tratamiento donde sólo se abrieron los opérculos sin puncionar las crías fue de 14.3 ± 10.76 , y la del tratamiento testigo, de 2.1 ± 3.98 (Figura 2).

Discusión

Experimento 1

Los resultados revelaron que las tres pruebas midieron de manera relacionada el comportamiento higiénico en las abejas, ya que se encontraron correlaciones significativas entre ellas (Cuadro 1). Spivak y Downey,³ así como Newton y Ostasiewski²⁰ encontraron correlación entre la proporción de cría removida por punción y por congelación en congelador, pero no compararon estas pruebas con la de congelación con nitrógeno líquido. Las correlaciones entre pruebas quizá obedecen al hecho de que en los tres casos se sacrifican crías y las abejas tienen la capacidad de detectar y remover crías muertas.^{1,7}

Los resultados obtenidos con la prueba de punción mostraron menor variabilidad entre colonias, y de acuerdo con los criterios establecidos que se sustentaron con su distribución y sus valores mínimo y máximo, únicamente se pudieron detectar colonias con capacidad de limpieza intermedia o alta (Cuadros 2 y 3, Figura 1); en este contexto, su capacidad discriminatoria y confiabilidad fueron menores. A pesar de su menor capacidad discriminatoria, la prueba de punción fue la más económica y práctica para medir el comportamiento higiénico de las abejas (Cuadro 4). Otros investigadores también han llegado a dicha conclusión.^{20,33}

La prueba de congelación con nitrógeno líquido mostró mayor variabilidad entre colonias en comparación con la prueba de punción (Cuadro 2), por lo que se pudieron distinguir colonias de alto y bajo nivel de comportamiento higiénico (Cuadro 3, Figura 1). La

correlation between replicates ($r = 0.56$, $P < 0.01$) and higher variability in comparison with the piercing test. The variability was not different from the liquid nitrogen-freezing test, and colonies with high and low hygienic behavior were identified too. (Table 3, Figure 1), so its discriminatory capacity and reliability are guaranteed. Spivak and Downey³ pointed out that the freezing technique using a freezer, constitutes the most conservative and reliable procedure to measure hygienic behavior. Likewise, these researchers found that with this method, neither the age of the killed pupae nor the origin of the brood comb section, influence the degree of hygienic behavior of the colonies; therefore, more colonies could be tested in short time. Nevertheless, in the present study, there were slight disadvantages detected for this method such as: the need to have a freezer and that three trips to the apiary had to be made for the measurement process. Both circumstances caused a slight increase in its costs, due to the time, labor and transportation employed (Table 4).

Bees removed 23% and 19% more pupae in the piercing test compared to those removed with the freezer and liquid nitrogen freezing tests, respectively (Table 2). In fact, 25 colonies (41.7%) expressed more than 95% of hygienic behavior with this technique (Table 3, Figure 1). These figures agree with those of Spivak and Downey,³ who observed 40% more pinkilled brood removed when compared with the brood removed when it was frozen using a freezer. From five to six colonies ($\leq 10\%$) tested with the two freezing methods, removed more than 95% of the killed brood, which agrees with a study of Spivak and Reuter.²² They pointed out that the high hygienic trait has been identified in approximately 10% of the colonies of any race or stock of bees in the United States of America, and with 12% reported in a study carried out in honey bee colonies in Yucatan, Mexico.²⁵

The low, intermediate and high levels of hygienic behavior of the colonies were significantly different ($P < 0.01$). Although Spivak and Downey³ classified their colonies in these three categories, they did not compare them statistically. However, they suggested that colonies with extreme levels of hygienic behavior could be surveyed to evaluate their hygienic response as a disease resistance mechanism. This evaluation well could be carried out from a divergent selection program, in which aspects of productive and economic nature might be additionally analyzed. Spivak and Reuter¹⁰ found that colonies with a hygienic behavior higher than 95%, removed significantly more frozen brood, produced more honey and had less incidence to chalkbrood, American foulbrood and less number of *V. destructor* mites, contrary to unselected colonies from commercial apiaries. Moreover, some queens

correlación entre repeticiones de esa prueba fue significativa ($r = 0.45$, $P < 0.01$) y no se halló diferencia entre las varianzas de las dos mediciones ($P > 0.05$). Estas evidencias respaldan su capacidad discriminatoria y confiabilidad. Otras cualidades de la prueba de congelación con nitrógeno líquido radican en que provoca muerte instantánea de las crías y en que sólo requiere hacer dos viajes al apiario para su instrumentación. Sin embargo, se observaron desventajas, entre ellas: el nitrógeno líquido es difícil de conseguir, es costoso, se necesita un termo especial para almacenarlo, así como un vehículo para transportarlo. El peso del termo dificultó su movilización en condiciones de campo, por lo que para agilizar los experimentos se incrementó el número de personas para su aplicación. Además, fue el método de aplicación más lento (23 min) y se tomaron medidas de seguridad adicionales para evitar accidentes que provocaran quemaduras en el personal que lo aplicó. En conjunto, estas circunstancias contribuyeron a elevar sus costos y a catalogarlo como impráctico, y, por tanto, inaccesible para la mayoría de los apicultores.

La prueba de congelación en congelador tuvo correlación significativa entre repeticiones ($r = 0.56$, $P < 0.01$) y variabilidad mayor en comparación con la prueba de punción. La variabilidad no fue diferente a la de la prueba de congelación con nitrógeno líquido, e igualmente se identificaron colonias con alto y bajo comportamiento higiénico con esta prueba (Cuadro 3, Figura 1), lo que acredita su capacidad discriminatoria y confiabilidad. Spivak y Downey³ señalaron que la técnica de congelación en congelador constituye el procedimiento más conservador y confiable para medir el comportamiento higiénico. Asimismo, encontraron que para este método la edad de las pupas sacrificadas y la procedencia de la sección de panal utilizada no influyen en el grado de respuesta higiénica de las colonias, por lo que podrían probarse más colonias en menos tiempo. Sin embargo, en el presente trabajo se detectaron ligeras desventajas del método, entre ellas, la necesidad de tener un congelador y que el proceso de medición implicó la realización de tres viajes al apiario. Ambas circunstancias provocaron ligero incremento en sus costos debido al tiempo, mano de obra y transporte empleados (Cuadro 4).

Las abejas removieron 23% y 19% más pupas con la prueba de punción que las congeladas con nitrógeno líquido y en congelador, respectivamente (Cuadro 2). De hecho, 25 colonias (41.7%) expresaron un comportamiento higiénico superior a 95% con esta técnica (Cuadro 3, Figura 1). Estos resultados concuerdan con los de Spivak y Downey,³ quienes observaron 40% de mayor remoción de las crías sacrificadas mediante el método de punción cuando lo compararon con el de congelación en congelador. De cinco a seis colonias

obtained from higher hygienic stocks that mated freely with drones of unknown genotype produced more hygienic bees than the commercial ones.

Experiment 2

The results of this experiment demonstrated that, although the recording time of the piercing treatment was reduced, the test did not improve its discriminatory capacity, since there was no difference among the percentages of hygienic responses, neither among the variances obtained at 8 and 24 h after piercing the brood. Thus, these results reinforce the asseveration that the piercing test is less reliable than the freezing tests. In accordance with the analysis of variance, it was found that when the brood was pierced in the 8 h recording treatment, bees removed around 41 times more damaged pupae, than the unaffected ones of the control treatment, and six times more when cells were partially uncapped. Brood from this last treatment were removed in a significantly higher number than the control treatment, even though it was not damaged (Figure 2). Additionally, if we take into account that in the first experiment the bees removed near of 1.3 times more pierced brood than frozen brood, then it can be suggested that in the piercing test, a higher stimulus is generated, which unfolds a higher and faster hygienic response of the bees. This can be caused by odors and haemolymph released from the perforated cappings. This argument is opposed to that referred by Newton y Ostasiewski,²⁰ who pointed out that neither the perforation of the cappings nor the loss of haemolymph from the killed pupae, cause a quick uncapping of the brood cells. Nevertheless, the results of these investigators are contradictory, since when they deposited haemolymph upon living pupae, bees removed 81% of them. Spivak and Downey³ as well as Gramacho *et al.*,³³ evaluated the keys that stimulate the removal behavior of pin-killed brood. In their studies, they found that more pupae were removed when they were pierced or treated with haemolymph, in comparison with pupae that had not been damaged, concluding that haemolymph perceived by the bees was the removal trigger factor.

In the second experiment of this study, it was observed that when the structure of the capping was altered without damaging the brood, bees removed a low percentage of pupae (14%, Figure 2); this situation was probably caused by odors that were released from the perforated capping; although the present study does not demonstrate it. It is important to consider that even though neither the brood nor the cappings of the control treatment were damaged, the bees removed a small proportion of pupae (2.1%, Figure 2). This result could indicate that internal environmental

($\leq 10\%$) evaluadas con los dos métodos de congelación removieron más de 95% de las crías sacrificadas, ello concuerda con el estudio de Spivak y Reuter,²² quienes señalaron que la característica de alta higiene se ha identificado en casi 10% de las colonias de cualquier raza o estirpe de abejas en Estados Unidos de América, y con 12% registrado en un estudio en colonias de abejas en Yucatán, México.²⁵

Los niveles bajo, intermedio y alto comportamiento higiénico de las colonias fueron significativamente diferentes ($P < 0.01$). Spivak y Downey,³ aunque también clasificaron sus colonias en estas tres categorías, no las compararon estadísticamente. Sin embargo, sugirieron que las colonias con niveles extremos de comportamiento higiénico pueden ser sometidas a pruebas para evaluar la respuesta higiénica como mecanismo de resistencia a enfermedades. Esta evaluación podría realizarse a partir de un programa de selección divergente, en el cual adicionalmente, se analicen y valoren aspectos de índole productiva y económica. Spivak y Reuter¹⁰ encontraron que las colonias con un comportamiento higiénico superior a 95%, removieron significativamente más crías congeladas, produjeron más miel y tuvieron menor incidencia de cría de cal, loque americana y menor número de ácaros de *V. destructor*, a diferencia de colonias no seleccionadas de apiarios comerciales. Inclusive, algunas reinas procedentes de la estirpe altamente higiénica, que se aparearon libremente con zánganos de genotipo desconocido, produjeron abejas más higiénicas que las comerciales.

Experimento 2

Los resultados de este experimento demostraron que a pesar de que se redujo el tiempo de lectura del tratamiento de punción, la prueba no mejoró su capacidad discriminatoria, ya que no hubo diferencia entre los porcentajes de respuesta higiénica ni entre las varianzas obtenidas a las 8 y 24 h de lectura, por lo que se refuerza la aseveración de que la prueba de punción es menos confiable que las pruebas que involucran el congelamiento de las crías. Con base en el análisis de varianza, se encontró que cuando se puncionaron las crías en el tratamiento a 8 h, las abejas retiraron alrededor de 41 veces más pupas dañadas que las inalteradas del tratamiento testigo, y seis veces más que cuando las celdas se desopercularon parcialmente. Las crías de este último tratamiento fueron removidas en un número significativamente mayor al del tratamiento testigo, a pesar de que no fueron dañadas (Figura 2). Aunado a esto, si se toma en cuenta que en el primer experimento las abejas removieron cerca de 1.3 veces más crías puncionadas que las sacrificadas con las dos pruebas de congelación, entonces se

conditions of the colony influences hygienic behavior, such as diverse researchers referred.^{11,14,23} In this sense Gramacho *et al.*³⁴ suggest to discount the percentage of brood removed by environmental effects, from the total percentage of brood removed when the piercing method is applied. This would allow having a more accurate measurement of the hygienic behavior of the colonies.

In accordance to the results of this study, it is concluded that freezing techniques were more reliable than the piercing test to measure hygienic behavior of bees, leaving to the researchers or interested beekeepers, the decision to choose which test fulfills the required conditions for the accomplishment of their objectives.

Acknowledgments

Special thanks to the National Institute for Forestry, Agriculture and Animal Research (Project 22329) and to the Program for Support to Research Projects and Technological Innovation of the Academic Personnel Matters Head Office of the UNAM (Project IN222203) for their financial support. Authors are also grateful to Dr. Carlos Vasquez Pelaez, for his statistical assistance, Dr. Rafael Melendez Guzman and CP Nora N. Rodriguez Muñoz for their guidance in the estimation of costs. MSc Jose Luis Uribe Rubio, for his aid in the establishment of some colonies used in this study, and finally to MVZ Adriana Ramos Sanchez, MVZ Carlos A. Robles Rios and to the technician Eusebio Sanchez Castañeda for their help on field measurements.

Referencias

1. Rothenbuhler WC. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees I. Responses of four inbreed lines to disease-killed brood. *Anim Behav* 1964;12:578-583.
2. Büchler R. Test de tolerancia de las colmenas frente a varroasis. *Vida Apícola* 1997;82:45-48.
3. Spivak M, Downey DL. Field assays for hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 1998;91:64-70.
4. Park OW. Disease resistance and American foulbrood. *Am Bee J* 1936;76:12-15.
5. Gilliam M, Taber S, Richardson GV. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie* 1983;14:29-39.
6. Milne CP. Honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behavior and resistance to chalkbrood. *Ann Entomol Soc Am* 1983;76:384-387.
7. Masterman R, Smith BH, Spivak M. Brood odor discrimination abilities in hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.) using proboscis extension reflex conditioning. *J Insect Behav* 2000;13:87-101.
8. Boecking O, Drescher W. The removal response of *Apis mellifera* L. colonies to brood in wax and plastic cells

puede sugerir que con la prueba de punción se genera un mayor estímulo, que desencadena una alta y rápida respuesta higiénica de las abejas, lo que puede ser ocasionado por la liberación de olores y hemolinfa a través del opérculo perforado. Este argumento se contrapone con lo referido por Newton y Ostasiewski,²⁰ quienes señalaron que ni la perforación del opérculo ni la pérdida de hemolinfa de la pupa provocan rápida desoperculación de las crías sacrificadas. No obstante, los resultados de estos investigadores son contradictorios, ya que cuando depositaron hemolinfa sobre pupas vivas, las abejas removieron 81% de éstas. Spivak y Downey³ y Gramacho *et al.*³³ evaluaron las claves que estimulan el comportamiento de remoción de las crías sacrificadas por punción. En esos estudios se encontró que mayor número de pupas fueron removidas cuando se puncionaron o fueron tratadas con hemolinfa, en comparación con pupas que no se habían dañado, por lo que se concluyó que el factor desencadenante de la remoción fue la hemolinfa que fue percibida por las abejas.

En el segundo experimento de este estudio se observó que cuando se alteró la estructura del opérculo sin dañar a las crías, las abejas removieron un bajo porcentaje de pupas (14%, Figura 2); esta situación quizá se debió a olores liberados a través del opérculo perforado, aunque el presente estudio no lo demuestra. Es importante considerar que aun cuando no se dañó a las crías ni al opérculo de las celdas con el tratamiento testigo, las abejas removieron una pequeña proporción de las pupas (2.1%, Figura 2). Este resultado podría indicar que el ambiente interno de la colonia influye en el comportamiento higiénico, como lo refieren diversos investigadores.^{11,14,23} En este sentido, Gramacho *et al.*³⁴ sugieren descontar este porcentaje (que expresa el efecto ambiental) del porcentaje total de remoción expresado cuando se aplica el método de punción, lo cual permitiría tener una medición más precisa del comportamiento higiénico de las colonias.

Con base en los resultados de este trabajo, se concluye que las técnicas de congelación fueron más confiables que la de punción, para medir el comportamiento higiénico de las abejas, quedando a decisión de los investigadores o apicultores interesados, la elección de la prueba que reúna las condiciones requeridas para el cumplimiento de los objetivos que se planteen.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Proyecto 22329) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, de la Dirección General

- after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud. and to freeze-killed brood. *Exp Appl Acarol* 1992;16:321-329.
9. Spivak M. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 1996;27:245-260.
 10. Spivak M, Reuter GS. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie* 1998;29:291-302.
 11. Message D, Gonçalves LS. Efeito de diferentes condições ambientais no comportamento higiénico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). *Anais do Simpósio Internacional sobre Apicultura em Clima Quente*; 1978 octubre 19-28; Florianópolis (SC) Brasil. Bucharest (Romania): International Federation of Beekeepers Association, 1979:218-219.
 12. Spivak M, Gilliam M. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *J Apic Res* 1993;32:147-157.
 13. Spivak M, Reuter GS, Lamb M. Frequency of hygienic behavior in naturally mated daughters of a hygienic breeder queen. *Am Bee J* 1995;135:830-831.
 14. Spivak M, Gilliam M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. *Bee World* 1998;79:124-134.
 15. Rothenbuhler WC. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. *Am Zool* 1964;4:111-123.
 16. Moritz RFA. A reevaluation of the two-locus model for hygienic behavior in honeybees. *J Heredity* 1988;79:257-262.
 17. Lapidge KL, Oldroyd BP, Spivak M. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften* 2002;89:565-568.
 18. Harbo JR, Harris JW. Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with the resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *J Econ Entomol* 1999;92:261-265.
 19. Arechavaleta VME, Hunt G. Componentes genéticos y medio ambientales del comportamiento higiénico de colonias de abejas melíferas. *Memorias del XVIII Seminario Americano de Apicultura*; 2004 septiembre 8-10; Villa Hermosa (Tabasco). México (DF): Unión Nacional de Apicultores, 2004:204-207.
 20. Newton D, Ostasiewski N. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Am Bee J* 1986;126:278-281.
 21. Newton DC, Cantwell GC, Bourquin EP. Removal of freeze-killed brood as an index of nest cleaning behavior in honey bee colonies (*Apis mellifera* L.). *Am Bee J* 1975;115:388, 402, 406.
 22. Spivak M, Reuter GS. Honey bee hygienic behavior. *Am Bee J* 1998;138:283-286.
 23. Espinosa ML. Estudio de tres factores asociados con la tolerancia al ácaro *Varroa jacobsoni* Oud., en colonias de abejas africanizadas (*Apis mellifera* L.) en Yucatán, México (tesis de maestría). Mérida (Yucatán) México: Univ Autónoma de Yucatán, 1998.
 24. Arechavaleta VME, Guzmán-Novoa E. Relative effect

de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (Proyecto IN222203) el financiamiento otorgado, así como al Dr. Carlos Vásquez Peláez por su asistencia estadística, al Dr. Rafael Meléndez Guzmán y a la CP Nora N. Rodríguez Muñoz por su orientación en el cálculo de costos; al M en C José Luis Uribe Rubio, por su apoyo en el establecimiento de algunas colonias utilizadas en este estudio; a la MVZ Adriana Ramos Sánchez, al MVZ Carlos A. Robles Ríos y al técnico Eusebio Sánchez Castañeda, por su participación en las mediciones de campo.

-
- of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 2001;32:157-154.
25. Medina FCA, Medina ML. Frecuencia de colonias altamente higienistas en abejas africanizadas (*Apis mellifera*) de Yucatán. *Memorias del XVIII Seminario Americano de Apicultura*; 2003 agosto 7-9; Aguascalientes (Aguascalientes) México. México (DF): Unión Nacional de Apicultores, 2003:69-72.
 26. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario estadístico del Estado de México. México (DF): INEGI, 1998.
 27. Secretaría de Gobernación. Diario Oficial de la Federación, Comisión Nacional de los Salarios Mínimos. Salario mínimo publicado el 26 de diciembre de 2002 para el área geográfica C, vigente para 2003. México (DF): Segob, 2002.
 28. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 8th ed. USA: Iowa State University Press, 1991.
 29. SAS Institute. JMP The statistical discovery software (computer program) versión 5.0.1 Cary (NC): SAS Institute Inc, 2002.
 30. Guzmán-Novoa E, Page RE, Spangler HG, Erickson EH. A comparison of two assays to test the defensive behaviour of honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res* 1999;38:205-209.
 31. Guzmán-Novoa E, Prieto-Merlos D, Uribe-Rubio JL, Hunt GH. Relative reliability of four field assays to test defensive behaviour of honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res* 2003;42:42-46.
 32. Zar JH. Bioestatistical Analysis. New Jersey: Prentice Hall, 1996.
 33. Gramacho KP, Gonçalves LS, Rosenkranz P, De Jong D. Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. *Apidologie* 1999;30:367-374.
 34. Gramacho KP, Gonçalves LS, Stort A, Noronha AB. Is the number of antennal plate organs (sensilla placodea) greater in hygienic than in non-hygienic Africanized honey bees? *Genet Mol Res* 2003;2:309-316.
 35. Sistema de Administración Tributaria. Tipo de cambio del 28 de noviembre de 2003. [citado 2006 noviembre 2]. Disponible en: http://www.sat.gob.mx/sitio_internet/asistencia_contribuyente/informacion_frecuente/tip