

UNIVERSIDAD NACIONAL
Sistema de Estudios de Posgrado (SEPUNA)
Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT)
Maestría en Apicultura Tropical

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DEL COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO,
DEFENSIVIDAD Y MÉTODOS DE CRÍA DE REINAS (*Apis mellifera*) EN EL
PACÍFICO CENTRAL DE COSTA RICA.

Leonardo Sandino Arias Lagos

Heredia, Agosto 2019

Trabajo presentado para optar el grado de máster en apicultura tropical. Cumple con los requisitos establecidos por el sistema de estudios de posgrados de la universidad nacional. Heredia. Costa Rica.

M.sc. Natalia Fallas Matamoros
M.sc Eduardo Umaña Rojas
Tutores

M.sc. José Fernando Ramírez Arias
Asesor

Este trabajo se realizó bajo auspicio del centro de investigaciones apícolas tropicales
(CINAT), de la Universidad Nacional.

AGRADECIMIENTOS

A los académicos y administrativos del centro de investigaciones Apícolas tropicales (CINAT), de la universidad nacional por el apoyo y constante aprendizaje durante la Maestría.

A la asociación de apicultores del pacífico central (APIPAC), Por la buena disposición y préstamo de material biológico para el desarrollo del trabajo de grado.

Al Colegio Técnico Profesional Ricardo Castro Beer, Orotina, por facilitar sus predios para la instalación del Apiario experimental y por el préstamo de equipos de laboratorio.

Al M.Sc José Fernando Ramírez Arias, por su acompañamiento, aprendizaje y cariño por las abejas.

Al fondo para el fortalecimiento de las capacidades estudiantiles en investigación FOCAES – 2019, de la vicerrectoría de investigación de la Universidad Nacional. Por el apoyo financiero proporcionado para el desarrollo del trabajo de gradación.

DEDICATORIA

Con cariño a todos los integrantes de mi familia, quienes me apoyaron para conseguir esta gran meta.

A mis padres: Pedro Ignacio y María de Jesús, por su apoyo, cariño y enseñanzas en mi formación personal y profesional.

A mis Hermanos: Daniel Ulises, Aida Verena, Gracias por su apoyo incondicional, sonrisas y amor.

A Ignacio Arias y familia: Por su apoyo y cariño

I. RESUMEN

El presente proyecto se llevó a cabo en el pacífico central de Costa Rica, municipio de Orotina, con el objetivo de Evaluar comportamientos y comparar métodos de crianza de abejas reinas en colonias de *Apis mellifera* para mejorar su producción. Se determinó la correlación entre comportamiento higiénico y defensivo, así como se evaluó, aceptación de larvas, tamaños de celdas reales, peso al nacimiento y reinas nacidas en los métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot.

Como resultado se obtuvo que el 42.9% de los datos indican un comportamiento higiénico Alto y el 57.1% presentó un comportamiento moderadamente higiénico, por su parte el 42.9% de los datos presentan una defensividad baja, el 28.6 % defensividad moderada y el restante 28.6 % presentan un comportamiento defensivo alto. Como resultado de la evaluación estadística, la correlación de Pearson indico con valor $P > 0.05$, indicando que el comportamiento defensivo, no está correlacionado significativamente con el comportamiento higiénico debido a la gran dispersión de los datos.

En la cría de reinas, el 92.5% de las larvas trasferidas en el método Doolittle y el 70% en el sistema Nicot fueron aceptadas a las 24 horas de hechas las trasferencias, el promedio del tamaño de la celda real en el método Doolittle fue de 20.92 mm y de 25.91 mm en el sistema Nicot. Los nacimientos vivos en el método Doolittle fue de 82.5% y 35% en el sistema Nicot y por último, los pesos promedios de las reinas al nacimiento para el sistema Doolittle fue de 0.210 g y de 0.216 g para el sistema Nicot.

Los resultados encontrados en la evaluación de estos dos métodos indican que el método de cría de reinas Doolittle es el mejor para la obtención de cantidad y calidad de reinas comparado con la cría de reinas mediante el sistema Nicot.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	V
II.	LISTA DE TABLAS	VII
III.	LISTA DE FIGURAS	VIII
IV.	INTRODUCCIÓN.....	1
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
VI.	JUSTIFICACIÓN	4
VII.	OBJETIVOS.....	5
	Objetivos específicos.....	5
VIII.	HIPÓTESIS.....	5
IX.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	5
X.	MARCO TEÓRICO	6
	Antecedentes	6
	Comportamiento higiénico	6
	Comportamiento defensivo	7
	Cría de abejas reinas	7
	Métodos Simples Para la Cría de Abejas Reinas	8
	Método artificial de cría de reinas Doolittle	8
	Método artificial de cría de reinas Nicot.....	8
XI.	METODOLOGÍA	9
XII.	MATERIALES.....	16
	Análisis Estadísticos.....	16
XIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	17
	Comportamiento Higiénico y Defensivo	17
	Métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot.	23
XIV.	CONCLUSIONES.....	30
XV.	RECOMENDACIONES.....	31
XVI.	BIBLIOGRAFÍA.....	32

II. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Material y Equipo utilizado	16
Tabla 2. Resultados de las pruebas de comportamiento Higiénico en colmenas de abejas <i>Apis mellifera</i>	18
Tabla 3. Resultados de las pruebas de comportamiento defensivo, en colmenas de abejas <i>Apis mellifera</i>	19
Tabla 4. Resumen de resultados de evaluación de los métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot en colmenas de abejas <i>Apis mellifera</i>	28

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apiario experimental del colegio Técnico profesional Orotina	9
Figura 2. Comportamiento altamente higiénico, mediante la prueba de punción con alfiler, en panales de abejas <i>Apis mellifera</i>	10
Figura 3. Evaluación del comportamiento defensivo, en colmenas de <i>Apis mellifera</i> , mediante la prueba de gamuza	11
Figura 4. Colmena criadora finalizadora de <i>Apis mellifera</i> utilizada en la cría de reinas, con excluidor y tabla divisoria para el aislamiento de la reina	12
Figura 5. Celdas reales de abejas <i>Apis mellifera</i> , al día 10 de realizada la transferencia de larvas, para hacer medición con caliper y trasladar a incubadora.	13
Figura 6. Celdas reales de abejas <i>Apis mellifera</i> , enjauladas y puestas en la incubadora para observar nacimientos.	13
Figura 7. Sistema de cría de reinas Nicot, realizando el procedimiento de transferencia de celdas con larvas de abejas <i>Apis mellifera</i>	14
Figura 8. Nacimiento de Reina <i>Apis mellifera</i> y posterior pesaje.	15
Figura 9. Clasificación del comportamiento Higiénico en colmenas de abejas <i>Apis mellifera</i>	17
Figura 10. Clasificación del comportamiento defensivo en colmenas de abejas <i>Apis mellifera</i> , según la cantidad de aguijones obtenidos en las pruebas.	18
Figura 11. Dispersión de datos en porcentaje de comportamiento higiénico y defensivo en colmenas de abejas <i>Apis mellifera</i>	20
Figura 12. Dispersión porcentual del comportamiento higiénico y defensivo por colmena de abejas <i>Apis mellifera</i>	21
Figura 13. Promedios porcentuales del comportamiento defensivo e higiénico en cada una de las colmenas de estudio de abejas <i>Apis mellifera</i>	22
Figura 14. Porcentaje de aceptación a las 24 horas de realizada la transferencia de larvas en los métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot en colmenas de abejas <i>Apis mellifera</i>	23

Figura 15.Media e intervalos de confianza del 95%, para el tamaño de celda real en los métodos Doolittle y Nicot, medidas 24 horas antes de su nacimiento en colmenas de abejas *Apis mellifera*.25

Figura 16. Porcentaje de reinas *Apis mellifera* nacidas vivas, para los métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot.26

Figura 17. Media e intervalos de confianza al 95 % de los pesos, al nacimiento de las reinas de abejas *Apis mellifera*, obtenidas de los métodos Doolittle y Nicot.27

IV. INTRODUCCIÓN

La apicultura en el mundo ha estado en los últimos años en boca de muchos organismos ambientales, apicultores y personas interesadas en la producción y conservación de estos insectos tan importantes para la seguridad agroalimentaria de muchas especies, con roles fundamentales como lo es la polinización y la producción de sus productos. Hoy en día el equilibrio entre abejas y plantas está siendo afectado por los cambios Antropogénicos (Gómez, 2002), haciéndose más evidente la aplicación de técnicas reproductivas, generando la implementación de nuevas técnicas, métodos y equipos en busca de colmenas más productivas, resistentes a enfermedades y la búsqueda de abejas más dóciles (Carrillo, 2013).

La presencia de enfermedades en las abejas es una de las dificultades a las que se enfrenta la producción apícola, generando debilitamiento y en muchos casos pérdida de las colmenas, la selección de la característica de alto comportamiento higiénico se considera una herramienta para la resistencia natural frente a las enfermedades (Pérez & Lorenzo, 2014). Factores como la africanización tienen un efecto sobre la alta defensividad en las colmenas, dificultando el manejo y provocando accidentes por picaduras (Esquivel et al, 2015) por lo que se hace necesario hacer una selección de estas características deseables.

Hoy en día, existen muchos métodos utilizados para la cría de abejas reinas, que van desde los más simples sin realizar mucha manipulación de la colmena, hasta métodos más industriales para la producción de reinas y jalea real (Carrillo, 2013).

Entre estos métodos, se puede citar el método artificial Doolittle el cual consiste en trasladar larvas de menos de un día de nacidas a unas cúpulas que simulan una celda real, que puede ser elaborada con cera o plástico, están sujetas a un listón de madera en un bastidor que se ingresa a la colmena para la cría de reinas o producción de jalea real (Simbaña, 2015).

Por otra parte el método Nicot, es un método en donde la reina es introducida en una jaula en forma de panal, realiza la postura en copa celdas de plástico, posteriormente se inicia el desarrollo de las larvas en una colmena destinada y

preparada para este fin, garantizando condiciones óptimas de alimentación y presencia de cría en todos sus estados (Büchler et al, 2015).

El objetivo del estudio, es la selección y evaluación de ciertas características de *Apis mellifera*, como lo son: baja defensividad y alto comportamiento higiénico, que le faciliten al apicultor el manejo y tener colmenas con alta resistencia natural a enfermedades. Así como, el establecer en la región de estudio el mejor método en la crianza de abejas reinas, bajo condiciones óptimas para su producción.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La implementación de métodos de selección y cría de reinas, son prácticas ampliamente distribuidas en la actividad apícola de Costa Rica, lo cual ha mejorado significativamente la condición de las colmenas en parámetros como la baja defensividad, comportamiento higiénico y producción, aspectos importantes para los apicultores, pero que carecen de registros de estos resultados y evaluación de los diferentes métodos utilizados.

El desarrollo de las técnicas de selección y crianza de reinas, están contempladas en diferentes manuales, en capacitaciones a los productores, donde se les explica el procedimiento para la ejecución adecuada de los métodos, pero la realidad es que muchos apicultores descuidan pasos fundamentales como el obtener buenas colmenas madres, iniciadoras y finalizadoras, las condiciones de la zona, además del manejo de registros que es la base para el desarrollo eficiente de la producción.

VI. JUSTIFICACIÓN

El aprovechamiento de técnicas y métodos para el desarrollo de la apicultura ha traído avances significativos en mejorar la producción de miel, polen, propóleo, cera y de más productos de las abejas, así como el uso de servicios de polinización que son fundamentales en la seguridad alimentaria de muchas especies.

Para lograr abejas con ciertas características favorables, se deben enfrentar al manejo de fenómenos como la africanización y aparición de diferentes enfermedades de las abejas (Uribe *et al*, 2002), ya que de no hacerlo se crean temores a las conductas negativas de las abejas y desencadenan efectos desfavorables frente a las poblaciones de abejas, la salud pública en humanos, como también el lograr establecer técnicas de manejo adecuadas (Guzmán *et al* 2011).

En la apicultura, existen métodos innumerables para la selección y cría de reinas, en donde la aplicación de estos va a depender de las condiciones ambientales, el manejo que se realice a las colmenas, el estado sanitario, la época del año, la alimentación y la finalidad que se busca con la implementación de la selección y cría de reinas (Büchler *et al*, 2015), siendo esencial tener referencias de técnicas, que es lo que busca el presente proyecto comparando características favorables de selección y métodos de cría de abejas reinas *Apis mellifera*, que favorezcan el manejo y el reducir costos en sanidad y compra de reinas.

VII. OBJETIVOS

Evaluar comportamientos de selección y cría de reinas en colonias de abejas *Apis mellifera*, mediante la comparación de métodos artificiales para mejorar su producción.

Objetivos específicos

- Realizar selección de colmenas con comportamiento higiénico alto y baja defensividad, mediante pruebas, para determinar si existe una relación entre estos parámetros.
- Comparar los métodos Doolittle y Nicot, mediante el registro de parámetros, para evaluar el porcentaje de éxito de cada método en colmenas finalizadoras.

VIII. HIPÓTESIS

- Existe una correlación significativa entre el comportamiento higiénico y la defensividad de las abejas.
- Existe una mayor aceptación en la transferencia de larvas realizada mediante el método Doolittle

IX. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El sistema NICOT es el mejor método de producción de abejas reinas comparado con el sistema Doolittle?

X. MARCO TEÓRICO

Antecedentes

La abeja melífera (*Apis mellifera*) pertenece a la clase de insectos Himenópteros que incluye miles de especies de abejas, avispas, hormigas y otras especies semejantes. Su característica principal es que posee un par de alas membranosas, siendo el par delantero mucho mayor que el posterior. Como muchos miembros de su clase mantienen sus crías en celdas estrechas, poseen un aguijón abdominal con el cual muchas especies pueden inyectar un veneno en el cuerpo de sus enemigos o víctimas.

La apicultura es una rama de la zootecnia que representa una gran fuente de riqueza por los múltiples beneficios que se pueden obtener a través de la explotación artesanal o industrial. Además de proporcionarnos miel como producto principal, con la apicultura también se puede producir polen, cera, jalea real, propóleo, veneno de abejas y se pueden obtener ingresos adicionales por la venta de núcleos, reinas y alquiler de colmenas para polinización (IICA, 2009).

Existen características de comportamiento importantes en las abejas, como lo son el comportamiento higiénico, defensivo, alta producción entre otros, que se pueden mejorar a través de selección y cría de reinas, contribuyendo al rendimiento productivo, condiciones de manejo y rentabilidad de la producción.

Comportamiento higiénico

Algunas de las obreras que componen cada colonia de abejas melíferas tienen la habilidad de detectar y remover cría muerta o enferma del interior de las celdas de un panal, es decir, muestran comportamiento higiénico. Este comportamiento permite a las abejas defenderse mejor de enfermedades como el ácaro *Varroa destructor*, loque americana o europea, cría de cal, entre otros.

Cuando las obreras que expresan comportamiento higiénico detectan una cría muerta o enferma dentro de una celda, proceden a removerla y sacarla al exterior

de la colmena. De esta manera, cortan el ciclo de enfermedades bacterianas o fungosas, o del parásito *Varroa destructor*. Se sabe que un mayor porcentaje de abejas en colonias africanizadas expresan este comportamiento en comparación con abejas europeas, lo cual las hace más resistentes (Guzmán, 2011)

Comportamiento defensivo

El alto comportamiento de defensa ha sido la característica más evidente de las abejas africanizadas en comparación con abejas de origen europeo, es una respuesta de defensa de las abejas frente a un estímulo, haciéndolas sentirse atacadas y reaccionando con la utilización de su aguijón para defender su colonia. El comportamiento defensivo de las abejas es altamente heredable. Además, esta característica parece ser afectada por efectos de dominancia genética y por efectos paternos, es decir, que la progenie muestra un comportamiento defensivo más cercano al de la colonia paterna que al de la materna (Guzmán 1999).

Cría de abejas reinas

La cría de abejas reinas es una actividad especializada de la apicultura que requiere conocimientos de biología de las abejas y experiencia en el manejo de colmenas. Criar reinas es necesario para la mejor explotación de las abejas, se requiere de reinas jóvenes y genéticamente mejoradas para que las colonias sean productivas, dóciles y saludables; por eso la cría y el cambio de reinas son prácticas apícolas muy importantes. Si las reinas no se cambian la producción no solo bajará por no contar con reinas jóvenes, sino que además las poblaciones de abejas tenderán a africanizarse con el paso del tiempo, lo cual es perjudicial para la producción y el mantenimiento (Guzmán, 2009).

Métodos Simples Para la Cría de Abejas Reinas

El método más simple para criar reinas es dejando a una colonia huérfana y esperando a que las obreras construyan celdas reales. Una división sin introducir una reina es un ejemplo de esto.

Método artificial de cría de reinas Doolittle

Es el método más utilizado para la producción de jalea real y reinas, consiste en transferir larvas de menos de un día de nacidas a unas cúpulas que simulan una celda real, que puede ser elaborada con cera o plástico, están sujetas a un listón de madera en un bastidor que se ingresa a la colmena para la cría de reinas o producción de jalea real. Se utiliza una aguja de transferencia plástica o de acero para manipular las larvas. Este método depende en gran medida de una programación y preparación de las colmenas madres, iniciadoras, finalizadoras, así como el transferir larvas de menos de 24 horas, garantizan reinas de calidad. (Simbaña, 2015).

Método artificial de cría de reinas Nicot

Es un método en donde la reina es introducida en una jaula en forma de panal, realiza la postura en copa celdas de plástico, posteriormente se inicia el desarrollo de esos huevos en una colmena destinada y preparada para este fin, garantizando condiciones óptimas de alimentación y presencia de cría en todos sus estados. Se debe prestar atención a el manejo adecuado de este sistema, ya que para cada región puede variar los días en que tarda la reina en realizar postura en estas copa celdas, que dependerá de una estimulación con alimento y buen manejo de la colmena (Büchler et al, 2015).

XI. METODOLOGÍA

El proyecto se desarrolló de enero a agosto de 2019, en el colegio Técnico profesional de Orotina, con sus coordenadas 9°54.3090´N- 84°32.0500´O, este municipio cuenta con un clima seco tropical y una temperatura promedio de 30°C, está ubicado en la provincia de Alajuela, a 224 msnm en el Pacífico Central (Muniorotina, 2019).

Se dispuso de 10 colmenas como apiario experimental (Figura 1) con desarrollo a dos cajas, proporcionadas por apicultores de la Asociación de Apicultores del Pacífico Central (APIPAC). Estas colmenas se ubicaron en un lugar adecuado y preparado previamente dentro de los predios del colegio. Así mismo, se contó con la disposición de un laboratorio para el desarrollo de los objetivos del proyecto.



Figura 1. Apiario experimental del colegio Técnico profesional Orotina

Una vez instalado el apiario, se procedió a evaluar las condiciones iniciales y hacer mejoras en cuanto a organización de la colmena y materiales. Así como la identificación numérica de las colmenas y sus respectivos registros de seguimiento de actividades que se realizaron a cada colmena.

Para el desarrollo de la primera etapa, se inició con la prueba de comportamiento higiénico, se tomaron 7 colmenas y se utilizó el método de punción con alfiler entomológico, en pupas operculadas entre 16 y 17 días de edad, las cuales

correspondieron a pupas con ojos rosados. Se procedió a realizar la punción de 100 celdas introduciendo el alfiler en el centro y hasta el fondo de la celda asegurando así la muerte de la pupa, se identificaron los extremos de las filas de celdas punzadas para facilitar la identificación, 24 horas después se tomaron los datos de los resultados mediante la fórmula: número de pupas removidas / total celdas tratadas (puncionadas) x 100 (Espinosa *et al*, 2007). Se realizaron 3 repeticiones del método en cada colmena en diferentes días y así trabajar con el promedio.

Para la clasificación del grado de comportamiento higiénico, se utilizó el método de Marla Spivak (Spivak, 1996), seleccionando así la colmena madre con alto comportamiento higiénico (Figura 2), bajo el criterio de porcentaje de remoción de crías muertas:

- Más del 95% de remoción, son altamente higiénicas (AH),
- Entre 75 y 95% de remoción, son moderadamente higiénicas (MH)
- Menos de 75% de remoción, son consideradas levemente higiénicas (LH).

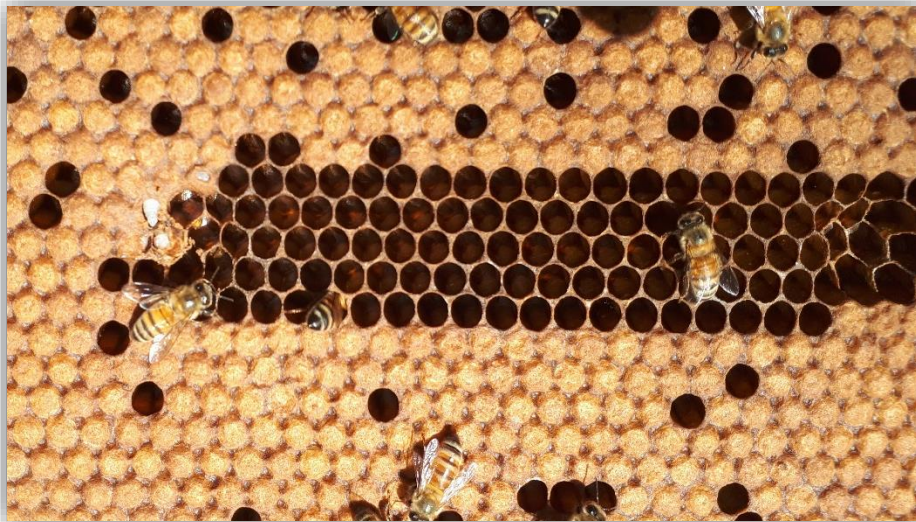


Figura 2. Comportamiento altamente higiénico, mediante la prueba de punción con alfiler, en panales de abejas *Apis mellifera*.

Se evaluó el comportamiento de defensividad en 7 colmenas mediante la prueba de conducta defensiva, utilizando una bandera de gamuza negra de 10 x 8 cm que se agito por 10 segundos sobre los panales de cría para generar el estímulo defensivo (Guzmán et al, 2003) sin aplicación de humo. Una vez transcurridos 60 segundos, se retiró y se guardó en una bolsa ziploc para el posterior conteo de los aguijones. Se realizaron las pruebas de 9 a 11 am, las colmenas estaban separadas una de otra, mínimo 5 metros, para reducir falsos positivos con abejas de otras colmenas, se realizaron tres repeticiones en cada colmena, en diferente día.

Para determinar defensividad, primero se observó si hubo o no respuesta frente al estímulo, clasificándolo como positivo (Figura 3) o negativo. Si era positivo se clasificó según el número de aguijones encontrados (Guzmán et al, 2003) de la siguiente manera:

- Baja defensividad: Menos de 21 aguijones
- Moderada defensividad: Entre 21 y 100 aguijones.
- Alta defensividad: mayor a 100 aguijones.

Los datos finales obtenidos del comportamiento higiénico y defensividad se evaluaron para saber si existía alguna relación entre ellos.



Figura 3. Evaluación del comportamiento defensivo, en colmenas de *Apis mellifera*, mediante la prueba de gamuza

Método Doolittle:

En el desarrollo de la segunda etapa se realizó la cría de reinas por el método Doolittle, consistió en transferir de una colmena madre previamente seleccionada larvas de menos de 24 horas de nacidas a copa celdas plásticas.

Las copas celdas se sujetaron a un cuadro con dos listones, cada uno con 10 copa celdas, para un total de 20 en cada cuadro y 40 en total en las dos repeticiones realizadas. Este cuadro con las trasferencias fue introducido a un núcleo iniciador de aceptación, este previamente preparado y con 24 horas de orfandad, posteriormente un día después de haber introducido las copas celdas en el núcleo, se realizó la observación del número de celdas aceptadas, observando la larva, abundante jalea real y crecimiento de la estructura de celda real. Luego se transfirieron a una colmena criadora finalizadora, (Figura 4) previamente adecuada y alimentada para la producción de reinas. Las trasferencias se realizaron con una aguja en acero inoxidable y con la práctica respectiva para disminuir riesgos metodológicos.



Figura 4. Colmena criadora finalizadora de *Apis mellifera* utilizada en la cría de reinas, con excluidor y tabla divisoria para el aislamiento de la reina.

La colmena criadora finalizadora se utilizó con presencia de reina, separada por un excluidor y tabla divisoria con un pequeño orificio, y así se aisló la reina del sitio donde se realizaba la cría de reinas (Figura 4) y así favorecer su mayor efectividad.

Una vez operculadas las celdas reales se procedió a colocar una jaula a cada celda y finalmente al día 10 de realizada la transferencia de larvas, se extrajo el cuadro con las celdas reales (Figura 5) y se llevó al laboratorio para hacer las respectivas mediciones a las celdas con un Caliper, y luego se llevó a una incubadora (Figura 6) con una temperatura constante de 33°C y humedad sobre el 75 %. Se observaron y cuantificaron los nacimientos vivos, pesando cada reina al nacimiento con la ayuda de la balanza analítica.



Figura 5. Celdas reales de abejas *Apis mellifera*, al día 10 de realizada la transferencia de larvas, para hacer medición con caliper y trasladar a incubadora.



Figura 6. Celdas reales de abejas *Apis mellifera*, enjauladas y puestas en la incubadora para observar nacimientos.

Método Nicot:

El sistema Nicot se utilizó haciendo transferencia de celdas con larvas puestas directamente por la reina en copa celdas plásticas (Figura 7) , para lo cual se utiliza

la jaula Nicot, donde es introducida la reina para que realice la postura (Santos, 2012). Previamente se realizó alimentación estimulante, 72 horas antes de introducir la reina dentro del sistema Nicot. Una vez que se observó postura de la reina, 72 horas después se procedió a liberar la reina y retirar las larvas de un día de edad al marco porta celdas.



Figura 7. Sistema de cría de reinas Nicot, realizando el procedimiento de transferencia de celdas con larvas de abejas *Apis mellifera*.

Fueron 20 transferencias que se llevaron a núcleos de aceptación en orfanda y posteriormente a colmenas finalizadoras (Figura 4) al igual que el método Doolittle.

La colmena criadora finalizadora se utilizó con presencia de reina, separada por un excluidor y tabla divisoria con un pequeño orificio, y así se aisló la reina del sitio donde se realizaba cría de reinas y así favorecer su mayor efectividad.

Una vez operculadas las celdas reales se procedió a colocar una jaula a cada celda y finalmente al día 10 de realizada la transferencia de larvas, se extrajo el cuadro con las celdas reales y se llevó al laboratorio para hacer las respectivas mediciones a las celdas con un Caliper, y luego se llevó a una incubadora (Figura 6) con una temperatura constante de 33°C y humedad sobre el 75 %. Se observaron y

cuantificaron los nacimientos vivos, pesando cada reina al nacimiento con la ayuda de la balanza analítica (Figura 8).



Figura 8. Nacimiento de Reina *Apis mellifera* y posterior pesaje.

Los métodos fueron replicados dos veces, y cada repetición fue simultánea para los dos métodos, a partir de dos colmenas madres producto de la selección de mejor comportamiento higiénico y baja defensividad y dos colmenas finalizadoras. La alimentación suplementaria se realizó en una proporción 1 a 1 (agua y azúcar) cada vez que fuera necesario.

XII. MATERIALES

Tabla 1. Material y Equipo utilizado

Material	Cantidad
Colmenas con desarrollo a dos cajas	10
Alfiler caja	1
Chinches caja	1
Trozos de gamuza negra 10 x 8 cm	10
Bolsas ziploc	10
Copaceldas plásticas para realizar trasferencias	20
Sistema Nicot completo	1
Marcos de madera para trasferencias con 2 reglillas	2
Aguja de trasferencias en acero inoxidable	1
Base para colocar el marco de Trasferencias	1
Toallas para cubrir trasferencias y panales donadores	2
Jaulas para reinas	40
azúcar	40kg
Equipos	
Equipo de protección básico del apicultor completo	1
Equipo de manejo básico (ahumador , palanca y cepillo)	1
Alimentadores (alimentación suplementaria)	10
Incubadora	1
Balanza analítica	1
Computador	1

Análisis Estadísticos

Los métodos estadísticos utilizados fueron paramétricos, utilizando análisis inferencial con las pruebas de normalidad (Ryan - Joiner), distribución, de intervalos (ANOVA), evaluación de proporciones (correlación de Pearson) y graficas de dispersión, barras y circulares, utilizando el paquete del Minitab 18.

Estas pruebas permitieron interpretar estadísticamente los datos obtenidos en campo, y así dar interpretación a lo que sucede con los comportamientos y métodos evaluados.

XIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Comportamiento Higiénico y Defensivo

El comportamiento higiénico es una conducta realizada por las abejas como respuesta a los procesos o condiciones no normales dentro de la colonia, se considera que esta conducta es colectiva y completamente hereditaria (Guzmán, 2012). Es considerada como la habilidad que tienen las abejas obreras para detectar, desopercular y remover crías enfermas y sacarlas afuera de la colonia (Nates, 2011), este comportamiento es considerado imprescindible en los programas de mejoramiento genético apícola como un indicador del estado de salud de las abejas (MINAG, 2014).

Como resultado, 42.9% de los datos indican un comportamiento higiénico Alto y el 57.1% restante, presentó un comportamiento moderadamente higiénico, no se obtuvieron datos de comportamiento higiénico bajos. (Figura 9)

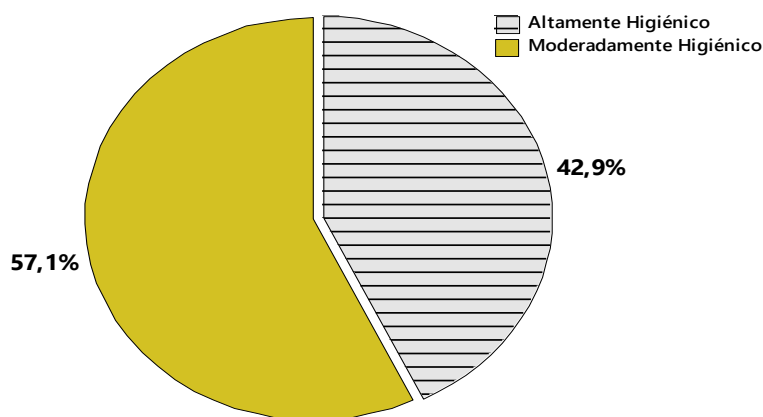


Figura 9. Clasificación del comportamiento Higiénico en colmenas de abejas *Apis mellifera*

Los resultados nos indican que 3 de las colmenas pueden ser utilizadas en un programa de cría de reinas y mejoramiento genético, ya que la remoción de larvas en un periodo de 24 horas fue superior al 95% para estas 3 colmenas, también se destaca que el apiario obtuvo un promedio de 93.38 %, indicando un moderado comportamiento higiénico según se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2. Resultados de las pruebas de comportamiento Higiénico en colmenas de abejas *Apis mellifera*.

Número de colmena	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio por colmena
1	92%	94%	100%	95,33%
3	88%	86%	99%	91,00%
4	84%	89%	94%	89,00%
5	96%	78%	94%	89,33%
6	95%	81%	98%	91,33%
9	99%	100%	97%	98,67%
10	98%	99%	100%	99,00%

El comportamiento defensivo de las abejas, es un mecanismo de respuesta genético producido por un estímulo, provocando en las abejas responder con la utilización del aguijón, respuesta que está dentro de las tareas que desempeñan las abejas de la colonia (Nates, 2011). Los resultados obtenidos en campo nos indican que el 42.9% de los datos presentan una defensividad baja, el 28.6 % defensividad moderada y el restante 28.6 % presentan un comportamiento defensivo alto tal como se muestra en la Figura 10.

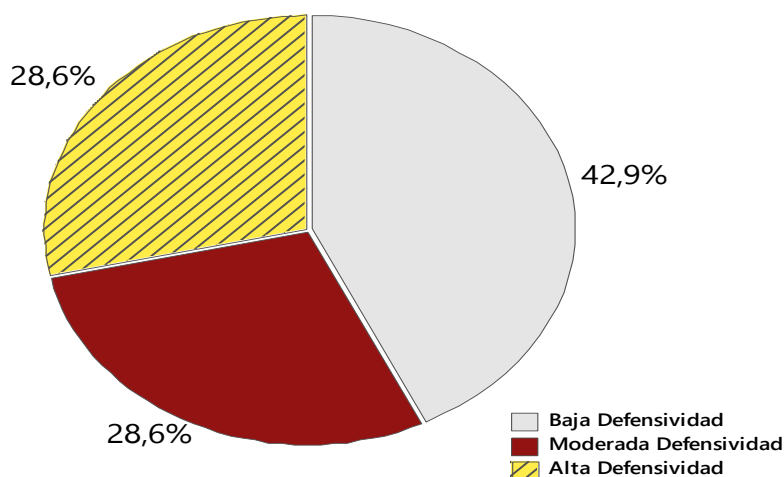


Figura 10. Clasificación del comportamiento defensivo en colmenas de abejas *Apis mellifera*, según la cantidad de aguijones obtenidos en las pruebas.

Los resultados indican que tres colmenas tienen un comportamiento defensivo bajo, que pueden ser contempladas dentro de un programa de selección, siendo la colmena 01 con un resultado de 0.09 % de defensividad, la más baja como se muestra en la siguiente la tabla 4.

Tabla 3. Resultados de las pruebas de comportamiento defensivo, en colmenas de abejas *Apis mellifera*.

Número de colmena	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Suma total de Agujones	Promedio Agujones	Porcentaje de comportamiento defensivo
1	1	0	0	1	0,33	0,09%
3	16	13	2	31	10,33	2,71%
4	186	140	148	474	158,00	41,51%
5	58	11	4	73	24,33	6,39%
6	15	12	12	39	13,00	3,42%
9	136	42	34	212	70,67	18,56%
10	134	25	153	312	104,00	27,32%

Al analizar estadísticamente los resultados, el comportamiento de defensa, no está correlacionado significativamente con el comportamiento higiénico. Así lo indica la correlación de Pearson no significativa con valor $P > 0.05$.

En la Figura 11, se observa que cada uno de los datos presenta una gran dispersión, con un comportamiento higiénico entre 78% y 100% y una variación en el número de agujones de 0 a 186 en las pruebas aplicadas (Tabla 4).

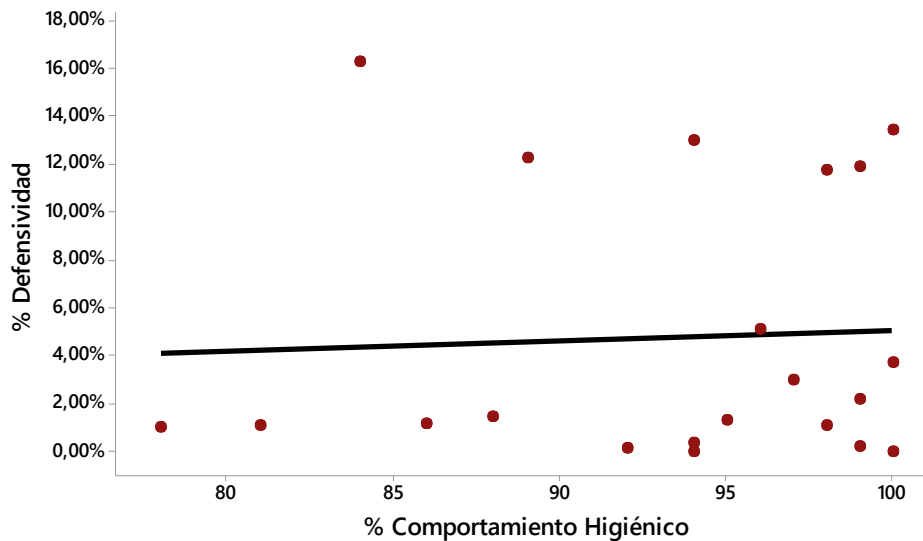


Figura 11. Dispersión de datos en porcentaje de comportamiento higiénico y defensivo en colmenas de abejas *Apis mellifera*.

La utilización de los métodos de punción con alfiler entomológico (Espinosa et al, 2007) y de comportamiento defensivo con la prueba de gamuza (Guzmán et al, 2003) y sus modificaciones, son pruebas que en la práctica se deben aplicar con un manejo adecuado de los instrumentos, el seleccionar y asegurar que las pupas punzadas estén entre el día 16 y 17 y garantizar su muerte, al igual que manejar adecuadamente el tiempo y tipo de estímulo en la prueba de comportamiento defensivo, son pequeños detalles que pueden inferir en el resultado final de una prueba.

El aplicar un método sencillo, eficaz, económico, rápido y práctico, es decisivo para la obtención de datos confiables y rápidos (Espinosa 2008), por lo que la aplicación de los métodos no se relaciona con la dispersión de los datos.

La diversidad de los datos observados por colmena en la Figura 12, puede deberse a que la reina en el vuelo nupcial realiza cópula con varios zánganos, el semen de cada macho es almacenado en paquetes y utilizado alternamente por la reina, lo que puede aportar o no la característica higiénica y defensiva sobre sus obreras (Palacio, et al, 2000). De igual manera puede deberse a la época en que se aplicaron las pruebas, pues el flujo de néctar puede llegar a disminuir el

comportamiento higiénico, ya que las abejas están también preocupadas por limpiar celdas para la recepción del néctar (Barrios, 2008).

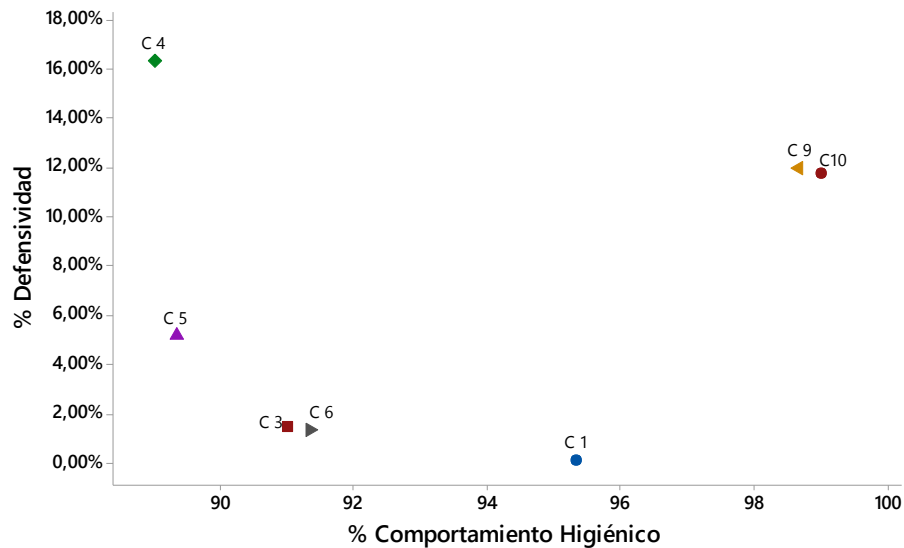


Figura 12. Dispersión porcentual del comportamiento higiénico y defensivo por colmena de abejas *Apis mellifera*.

De otro lado, los parámetros ambientales pueden jugar o no un papel importante en la dispersión de la defensividad, estudios de Esquivel, (2015) relacionan que existe una correlación baja entre el número de agujones, condiciones ambientales y de altura sobre el nivel del mar, lo que indica que no hay mucha relevancia de las condiciones ambientales con la expresión del comportamiento.

Factores como la africanización, la enjambrazón y la selección genética (Nates, 2011), pueden estar influyendo de manera significativa en la dispersión de los datos. El establecimiento del apiario se realizó con colmenas provenientes de apicultores que no realizan cambios de reinas y de otros que si lo hacen, por lo que existen colmenas con más o menos grado de africanización, enjambrazón y distintas fuentes genéticas que podrían explicar la dispersión de los datos, pero brindándonos datos suficientes para decir que es una zona con variabilidad genética, con presencia de un moderado grado de defensividad y comportamiento

higiénico, lo cual es bueno para el éxito de programas de selección de abejas con características deseables que mejoren su manejo y sanidad.

Al realizar una selección para futuras colmenas madres dentro de un programa de mejoramiento genético, se deben escoger las mejores colmenas según las características que se buscan dentro de un apiario y producción apícola, para el estudio, por bajo comportamiento Defensivo la colmena C1, por su parte la colmena número C10, fue la seleccionada por el mayor comportamiento higiénico. (Figura 13)

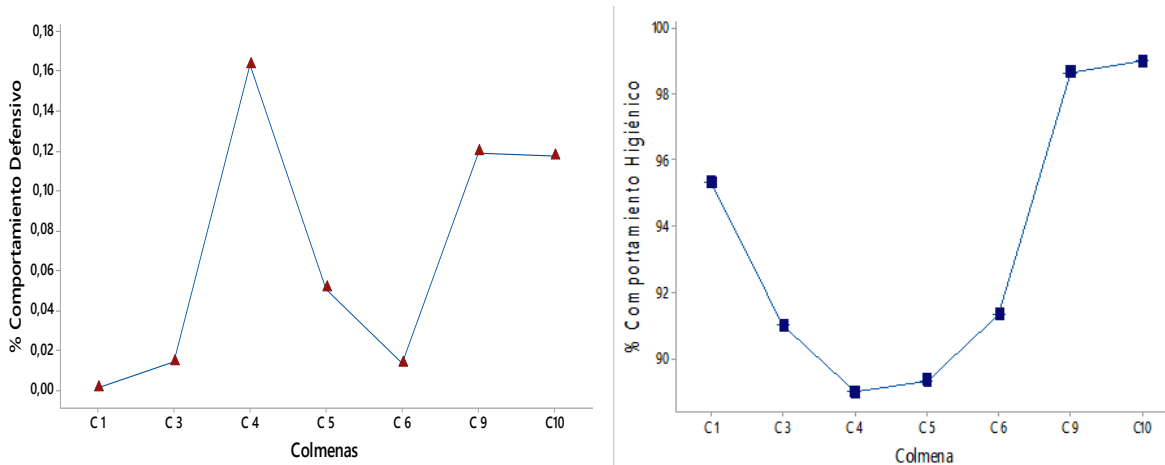


Figura 13. Promedios porcentuales del comportamiento defensivo e higiénico en cada una de las colmenas de estudio de abejas *Apis mellifera*.

La baja relación que puede existir entre el comportamiento defensivo y el higiénico, nos indica que es necesario seleccionar los dos comportamientos individualmente en un eventual programa de mejoramiento genético, la selección de cada comportamiento es importante en cualquier programa de cría de reinas y mejoramiento genético (Andere, 2001).

Dando respuesta a la hipótesis planteada en el presente trabajo, considerando la aplicación del coeficiente de relación de Pearson, se determina que no existe correlación entre ambas variables ya que $P > 0.05$, debido a la dispersión de los datos, ya que son comportamientos individuales transmitidos o no a las abejas (Palacio, *et al*, 2000).

Métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot.

Los porcentajes de éxito en procesos de cría de reinas se ve influenciado por factores ambientales, humanos y condiciones de la colmena al momento de realizar el procedimiento, en el estudio se obtuvieron datos producto de la cría de reinas simultáneos con los métodos Doolittle y Nicot, en colmenas con similares características.

Como resultado de las transferencias de larvas en el método Doolittle, el 92.5% correspondientes a 37 datos fue positivo a las 24 horas de realizada la transferencia. Por su parte en el método Nicot, el 70% de los datos correspondientes a 28 datos fue positivo a las 24 horas de realizada la transferencia, tal como se muestra en la Figura 14.

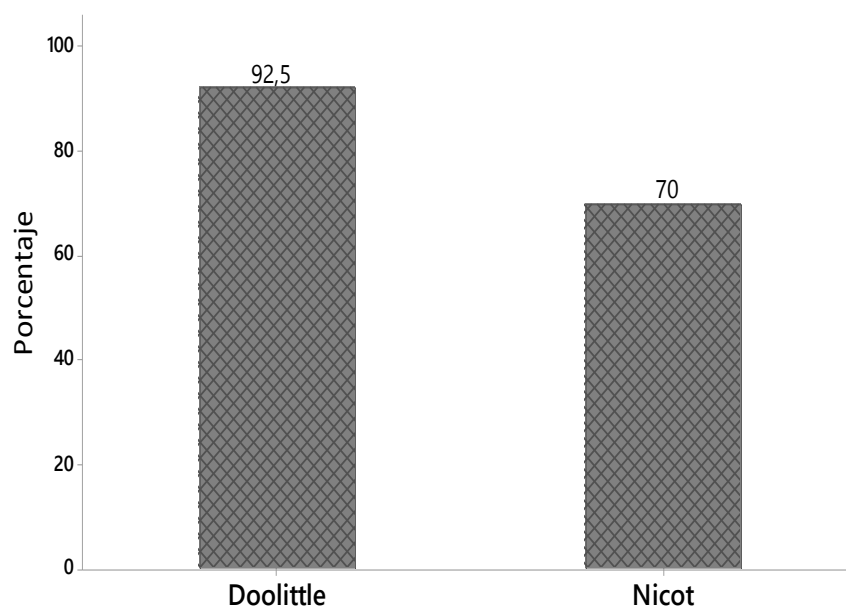


Figura 14. Porcentaje de aceptación a las 24 horas de realizada la transferencia de larvas en los métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot en colmenas de abejas *Apis mellifera*.

Realizando un análisis de proporciones de aceptación de las transferencias de larvas, se obtuvo un valor p de 0.007, lo que nos indica una diferencia altamente significativa entre los dos métodos evaluados.

En la evaluación de aceptación de larvas en el presente trabajo, es claro que existe una diferencia entre los métodos, donde el método Doolittle puede brindar un 22.5 % más de resultados. Las diferencias que se obtuvieron pueden decirnos que el método Doolittle es el mejor para obtener una buena aceptación, aunque el método Nicot con un 70 % de aceptación es bueno.

Estudios de Acuña (2010), sugieren que los porcentajes de aceptación en el método Doolittle, arriba del 85% son buenos y que estos resultados se ven influenciados directamente con una buena práctica en las transferencias de larvas por parte del apicultor.

Los datos obtenidos nos indican que se obtuvo un buen resultado de aceptación a las 24 horas de la transferencia de las larvas, según Weiss (1983), también la edad de la larva transferida, la edad de las abejas nodrizas, el estado de orfandad de la colmena, variables climáticas, disponibilidad de alimento y la habilidad del criador son factores que pueden afectar el éxito de las transferencias, factores que para este estudio fueron controlados en su mayoría.

Dando respuesta a la segunda hipótesis planteada en el presente trabajo, si existe una mayor aceptación en la transferencia de larvas, utilizando el método Doolittle.

El tamaño de la celda real se midió 24 horas antes del nacimiento de las reinas para cada método, obteniendo que el promedio para celdas reales en el sistema Doolittle fue de 20.92 mm, con datos desde 20.37 y hasta 21.48mm con intervalo de confianza del 95%. Para el sistema Nicot el promedio fue de 25.91 mm con datos desde 25.06mm hasta 26.75mm con intervalo de confianza del 95% como se muestra en la Figura 15.

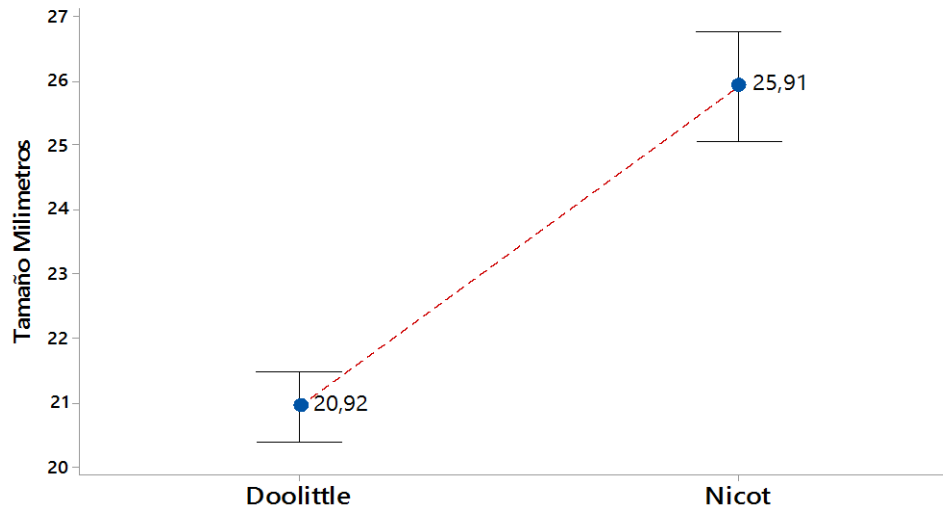


Figura 15. Media e intervalos de confianza del 95%, para el tamaño de celda real en los métodos Doolittle y Nicot, medidas 24 horas antes de su nacimiento en colmenas de abejas *Apis mellifera*.

Realizado un análisis estadístico de varianza entre los datos de los métodos nos indicó un valor $P < 0.0001$, indicándonos una diferencia altamente significativa entre las medias poblacionales, donde como se muestra en la Figura 15, los rangos de cada método no se traslapan en ningún momento.

Esta diferencia entre los tamaños de las celdas en el presente trabajo, indica que el sistema Nicot nos ofrece celdas reales operculadas más grandes, obteniendo en promedio de celdas reales 3.5mm más grandes frente al método de cría de reinas Doolittle.

Figini & Barreto (2017) indican que tamaños de celdas reales operculadas mayores de 20 mm, son celdas de buen tamaño para la obtención de reinas de buena calidad. Por lo que para el estudio los tamaños de cualquiera de los dos métodos evaluados son apropiados.

Es importante resaltar que a la hora de seleccionar las larvas para convertirlas en futuras reinas, estas determinan características deseables como edad, el buen estado de la larva, higiene de la celda y tipo de celda, siendo factores que pueden influir en la aceptación y el tamaño de la celda real, al igual que el estado óptimo de la colmena, donde debe presentarse orfandad y contar con gran cantidad de abejas

nodrizas para realizar la cría de reinas. Por lo que la falta o debilidad de algunos de estos factores, puede verse reflejado en el mayor éxito de los métodos.

Los nacimientos tuvieron lugar en una incubadora con una humedad sobre el 75% y una temperatura constante de 33 °C, durante un periodo de 48 horas se observaron los nacimientos, obteniendo para el método Doolittle el 82.5% de nacimientos exitosos vivos, correspondientes a 33 reinas. Por su parte, en el método Nicot, el 35 % fueron nacimientos exitosos vivos, correspondiente a 14 reinas como se muestra en la Figura 16.

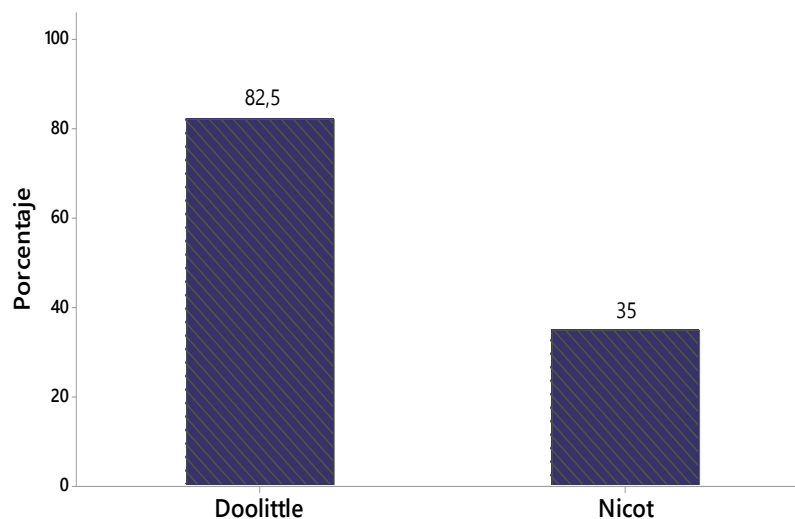


Figura 16. Porcentaje de reinas *Apis mellifera* nacidas vivas, para los métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot.

Realizando un análisis de proporciones de nacimientos, se obtuvo un valor $p < 0.0001$, lo que nos indica una diferencia altamente significativa de nacimientos en los métodos evaluados. El sistema Doolittle puede ser un 47.5% más eficiente en nacimientos de reinas vivas, frente al sistema Nicot.

Estudios de Sinbaña (2015) para nacimientos del sistema Doolittle indican promedios de 89.2%, resultados del presente trabajo presenta datos cercanos a ese valor. Estudios de Ramírez (2002) indican que en época de escasez y lluvia, los resultados van a ser más bajos en el éxito de la cría de reinas.

En cuanto al peso de las reinas se obtuvo un peso promedio de 0.210 g para el método Doolittle, con datos entre 0.201 g y 0.219 g, con un intervalo de confianza

del 95%, mientras que para el sistema Nicot el promedio fue de 0.216 g y con datos entre 0.202 g y 0.231 g con intervalos de confianza del 95%, tal como se muestra en la Figura 17.

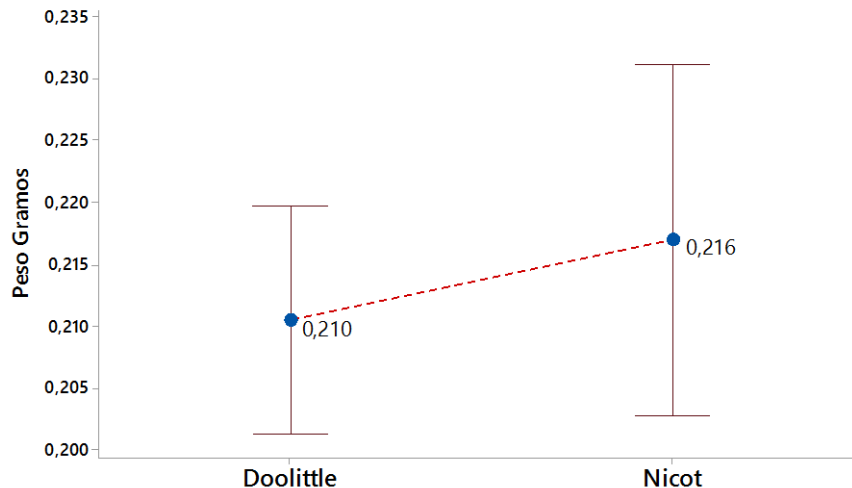


Figura 17. Media e intervalos de confianza al 95 % de los pesos, al nacimiento de las reinas de abejas *Apis mellifera*, obtenidas de los métodos Doolittle y Nicot.

Realizado un análisis estadístico de varianza entre los datos de ambos métodos, indicó un valor $P > 0.05$, lo cual indica que no hay diferencia estadística entre los pesos de las reinas obtenidas por los métodos analizados, además los rangos de cada método se traslapan siendo similares.

Estos resultados nos muestran, que los pesos al nacimiento de reinas en los dos métodos evaluados son similares, es decir que cualquiera de los métodos nos ofrecerá reinas de buen peso. Como lo indica Cruz (2013), para el método Doolittle obtuvo pesos al nacimiento entre 0.124 y 161 g, indicándonos que para el presente estudio los pesos fueron muy buenos con promedios superiores a 0.200 g.

Como se observa en la tabla 5, los resultados obtenidos muestran aspectos positivos y negativos de cada uno de los métodos evaluados. El sistema Doolittle es mejor en aceptación, reinas nacidas vivas y pesos al nacimiento, aunque el tamaño de la celda real sea menor frente al Nicot.

Por su parte, el sistema Nicot, muestra bajo rendimiento en aceptación de larvas, en el número de reinas nacidas, aunque obtiene pesos de las reinas muy similares al Doolittle y se obtienen celdas reales más grandes.

Tabla 4. Resumen de resultados de evaluación de los métodos de cría de reinas Doolittle y Nicot en colmenas de abejas *Apis mellifera*.

Parámetros evaluados	Método Doolittle	Método Nicot	Método que presento el mejor Resultado
Aceptación	92.5 %	70%	Doolittle
Tamaño celda real	20.928 mm	25.910mm	Nicot
Nacimientos vivos	82.5 %	35%	Doolittle
Peso al nacimiento	0.210 gr	0.216gr	Doolittle y Nicot

Al realizar la evaluación, lo que se busca es que se obtenga el mayor número de reinas nacidas y con un buen peso, indicándonos que el sistema Doolittle es mejor frente a esas características deseables. También nos indica que aunque el tamaño de la celda real es mayor en el sistema Nicot, esto no significa que las reinas nacidas sean de mayor peso.

El estudio mostró también que la cría de reinas con abejas africanizadas puede incidir en los resultados con comportamientos como el pillaje y la enjambrazón, además que los resultados obtenidos corresponden a la época de lluvias y escasez en donde resultados de Ramírez (2002), indican que los resultados disminuyen en esta época

Dados los resultados del estudio sobre la cría de reinas con el método Doolittle y Nicot y respondiendo a la pregunta de si ¿el sistema Nicot es el mejor método para la producción de cantidad y calidad de reinas?, se puede afirmar que el mejor método es el Doolittle, ya que presenta mejores resultados (tabla 5) y durante el desarrollo de la metodología el sistema Doolittle resulta ser más práctico y económico frente al sistema Nicot.

Es de resaltar, que a pesar de la época de escasez en que se desarrolló la cría de reinas, y que no se recomienda hacer reinas debido a las dificultades climáticas, comportamientos de las abejas y de más demanda de trabajo por parte del apicultor, se pudieron obtener resultados para esta época, pero que es importante que el apicultor sepa que para obtener buenos resultados se debe escoger condiciones ambientales favorables, con baja influencia de lluvia y presencia de un flujo de alimento, esto para beneficiar el desarrollo de la colmena que se trasmite en mayor aceptación y desarrollo de futuras reinas.

XIV. CONCLUSIONES

- Luego de evaluar estadísticamente el comportamiento Higiénico y Defensivo, se obtienen datos dispersos con una correlación de Pearson no significativa con valor $P > 0.05$, por lo que el comportamiento higiénico no se correlaciona significativamente con el comportamiento de defensa.
- Se puede establecer que el mejor método para la cría de reinas, es el Doolittle, ya que estadísticamente presenta mejores resultados en aceptación, en reinas nacidas vivas y pesos al nacimiento frente al Nicot.
- A pesar de que el sistema Nicot no fue mejor en el estudio, se puede decir que en aceptación es bueno, y que el tamaño de celda real fue el mejor, aunque se evidencia que no existe una relación, en que una celda real de mayor tamaño tenga diferencia significativa en peso al nacimiento.
- Se evidencio que factores como la enjambrazón, la africanización, manejo y época del año, se deben manejar de manera adecuada en la aplicación de las pruebas y métodos, esto para reducir alteraciones en los resultados.

XV. RECOMENDACIONES

- Al realizar selección de comportamientos favorables en una producción apícola , como lo son la baja defensividad y el alto comportamiento higiénico se recomienda hacer selección por separado , para obtener los mejores resultados en un eventual programa de mejoramiento genético
- Para la producción de abejas reinas (*Apis mellifera*), se recomienda la práctica de la transferencia de larvas adecuadas, preparar colmenas adecuadamente con gran cantidad de abejas nodrizas y alimentación estimulante, para que el método Doolittle presente buenos resultados, con la obtención de mayor número de reinas y de un peso adecuado, en beneficio del apicultor de la zona pacífico central, de Costa Rica.
- La cría de reinas es un proceso en el que influyen factores como: el estado de la colmena, el manejo, el tipo de abejas y la época del año, por lo que se recomienda escoger la época de abundancia de alimento y periodo seco, así como saber aplicar de manera adecuada el método.

XVI. BIBLIOGRAFÍA

- Andere, C. M, Palacio. P, Delgado. E, Figini. E, Rodriguez. M, Colombani. E. Bedascarrasbure. Universidad Nacional Del Centro. PROAPI. Pinto 399. Tandil (7000). Argentina.
- Acuña, R. 2010. Inseminación instrumental de abejas reinas en Chile.
- Barrios, P. D'Aubeterre R, Puzzar S, García de la Rosa SB, Fuselli SR. 2008. Comportamiento higiénico de las abejas africanizadas (*Apis mellifera scutellata* Lepeletier) en apiarios del estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 26(2):167-173.
- Büchler, R. S, Andonov. K, Bienefeld. C, Costa. F, Hatjina. N, Kezic. P, Kryger. M, Spivak. A, Uzunov. J, Wilde (2015) Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52:1,1-30, DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.07.
- Carrillo, F. 2013 Manual para la implementación de criadero de reinas (F1) mejoradas con certificación sagarpa. Quintana Roo. Diciembre 2013.
- Cruz, W. 2013. Evaluación del método Doolittle simplificado en la multiplicación de reinas, en tres razas de abejas (*Apis mellifera*) en la localidad de Sapecho del Municipio de Palos Blancos. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. La paz. Bolivia.
- Espinosa, L. E, Guzmán, A, Sánchez. H, Montaldo. A, Correa. 2007. Estudio comparativo de tres pruebas para evaluar comportamiento higiénico en colonias de abejas (*Apis mellifera* L). Departamento de Producción Animal: Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.
- Espinosa, M. L, Novoa. S, Albarrán. H, Montaldo , C, Benítez. 2008 Comparative study of three assays to evaluate hygienic behaviour in honey bee colonies (*Apis mellifera* L.). *Vet Mex.*;39(1):9-14.
- Esquivel, S. J, Macías. J, Tapia. F, Contreras. M, De León. A, Silva. (2015). Selección de abejas (*Apis mellifera* L) con baja defensividad y su relación con el medio ambiente en Jalisco, México. Universidad de Guadalajara. Publicado en *Abanico vet* vol 5 no.1 Típec ene/abr.
- Figini, J. & J, Barreto 2017. Producción de celdas reales, instituto nacional de tecnología agropecuaria INTA. Argentina.
- Gómez, J. 2002. Generalización en las interacciones entre planta y polinizadores. Grupo de Ecología terrestre, departamento de biología animal y ecología, facultad de ciencias, universidad de granada, E-18071 Granada, España. *Revista chilena de historia natural* 75: 105 – 116.
- Guzmán, N. 2012. Manual para la cría de abejas reinas. Programa Nacional de Apicultura del INIFAP, SAGARPA. pp. 1-18.

- Guzmán, N. L, Espinosa. A, Correa. G, Guzmán. 2011. Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. Veterinaria México, vol. 42, núm. 2, pp. 149-178. Universidad Nacional Autónoma de México D,F.
- Guzmán, E. M, Prieto. R, Uribe. G, Hunt. (2003) Relatively reliability of four field assays to test defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Apicultural Research. 2003; 42: 42-46. <https://doi.org/10.1080/00218839.2003.111101088>
- Guzmán, N. 1999. Breeding Honey Bees in Africanized Areas. In: HOOPINGARNER R, CONNOR L, editors. Apiculture for the 21st Century. Cheshire.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) 2009. Ministerio de Agricultura. Manual de apicultura básica para Honduras.
- Ministerio de la Agricultura de Cuba (MINAG). 2014. Programa de mejoramiento genético de la abeja *Apis mellifera* con abejas localmente adaptadas al ácaro Varroa destructor. CIAPI, Cuba.
- Muniorotina, 2019. Municipalidad de Orotina. Costa rica. Tomado de <http://muniorotina.go.cr/index.php/15-el-canton/datos-importantes>
- Nates, G. 2011. Genética del comportamiento: abejas como modelo. Laboratorio de Investigaciones en Abejas, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.
- Palacio M, Figini E, Ruffinengo S, Rodríguez E, Del Hoyo M, Bedascarrasbure E. 2000. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behavior and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie*; (31):471-478.
- Pérez, A. Lorenzo, J. 2014. Evaluación de la conducta higiénica en colmenas de abejas *Apis mellifera* L. con el método de pinchado con dos instrumentos. Universidad agraria de la Habana (UNAH). Rev. Salud Anim. Vol. 36 No. 3 (2014) 170 177. San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba.
- Ramírez, J. 2002. Producción de reinas africanizadas en Atenas, Costa Rica. Centro de investigaciones apícolas tropicales, universidad nacional. Heredia. Publicado en: Congreso nacional de apicultura. 2003
- Santos de Almeida, D. 2012. Avaliação de rainhas africanizadas *apis mellifera* selecionadas visando a produção de mel. Universidade Federal de Alagoas centro de ciências agrárias programa de pós-graduação em zootecnia. Rio Largo.
- Simbaña, H. 2015. Tesis. Evaluación de tres métodos de reproducción de abejas reinas de la especie (*Apis mellifera*) en el cantón Pedro Moncayo. Universidad politécnica salesiana. Quito. Ecuador.
- Spivak, M. 1996. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. Department of Entomology, 219 Hodson Hall, University of Minnesota, Saint Paul, MN 55108, USA.

- Uribe, J. E, Guzmán. G, Hunt. A, Correa. J, zozaya. (2002) Efecto de la africanización sobre la producción de miel, comportamiento defensivo y tamaño de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) en el altiplano mexicano. Vet. Méx.,34(1).
- Weiss, K.(1983) The influence of rearing condition on queen development. En: ruttner, F. (ed) Queen rearing: Biological basic and technical instruction. Bucharest, Apimondia publishing House. 83-148pp