



Actas del VI Congreso Nacional de Apicultura

Córdoba 12 y 13 de noviembre de 2010

Francisco Padilla Álvarez

Cofinanciado por el Instituto Nacional de
Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
Acción Complementaria AC2010-00024-00-00



© Francisco Padilla Álvarez.
Departamento de Zoología, Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km 396 – 14071 Córdoba

Ediciones DON FOLIO
Medina Azahara, 15
14005 Córdoba

Depósito Legal: CO 469-2011

ISBN: 978-84-15105-29-9

Imprime:
Copisterías Don Folio S. L.
Medina Azahara, 15
14005 Córdoba

Reservados todos los derechos.
Queda rigurosamente prohibida, sin autorización escrita de los autores, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción parcial o total de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo públicos.

Presentación.

Aunque el sector apícola represente solamente el 0,44% de la Producción Final Ganadera y el 0,17% de la Producción Final Agraria, su importancia como actividad económica se considera fundamental para el equilibrio ecológico de nuestros ecosistemas, así como para el desarrollo rural.

En nuestro país, según el Registro de Explotaciones Apícolas, en el año 2010 contábamos con 2.459.373 colmenas de las que el 80% pertenecían a apicultores profesionales. Además de ser la primera potencia apícola del la UE por número de colmenas, también lo somos por número de apicultores considerados profesionales.

Resulta al menos paradójico que la primera potencia apícola de la Unión Europea lleve 19 años sin celebrar ningún congreso. Este hecho debería de plantearse como una especie de reflexión colectiva, que nos permitiera buscar de forma individual y/o colectiva una o varias contestaciones a la siguiente pregunta: ¿Por qué?

El evento celebrado en Córdoba los días 12 y 13 de noviembre de 2010 representa la reanudación de la actividad congresual, y como organizador del mismo me gustaría que fuese el punto de partida de una nueva y larga serie de reuniones, que permitan la transferencia directa de los avances en investigación a este sector ganadero.

Este libro no contiene todos los trabajos valorados positivamente por los comités científicos y presentados al Congreso, pero los incluidos sí son representativos de los aspectos del mundo apícola debatidos en el evento. Este hecho también nos tendría que llevar a realizar otra reflexión y volver a preguntarnos: ¿Por qué?

Finalmente deseo expresar mi agradecimiento al Sr. Rector Magfco. de la Universidad de Córdoba, y por extensión a toda la institución, por permitirnos usar el incomparable marco del Rectorado para celebrar el Congreso. También agradezco al INIA el concedernos una Acción Complementaria que nos permitió sufragar una parte de los gastos originados y financiar la edición de este libro.

Francisco Padilla Álvarez

Índice

I. Biología y Flora Apícola.

1. De África a Europa pasando por Iberia: Historia evolutiva de la abeja ibérica. J. Serrano, F. Cánovas, R. Hernández-García, J. Galián, P. De La Rúa.....7
2. Patrón espacial de la variación molecular de *Apis mellifera* en Gran Canaria y La Gomera (Islas Canarias). I. Muñoz, M. A. Pinto y P. De La Rúa.....23
3. Puesta a punto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (q-PCR) en *Apis mellifera iberiensis*. L. Jara, P. De La Rúa, J. Galián.....31
4. El potencial valor económico de los polinizadores en cultivos. Reflexión tras comparación con otros países. J. Gil Gómez.....37

II. Economía, Tecnología y Percepción Social de la Apicultura.

5. La apicultura como herramienta de desarrollo. Proyecto *Bee Honey*. J. Rovira.....41
6. Actividades de apicultura con escolares en los *Camps D'Aprenentage de Les Isles Balears*. Bibiloni Canyelles A., J. Ferrer Ferrer, P. Villa Álvarez, P. Bibiloni Jaume, V. Torres Marí, J. Gornes Ametller, A. Isern Amengual.....47
7. Estudio de la interacción de *Apis mellifera* L. con el paisaje vegetal mediante SIG en un apiario de Valldemossa (Baleares). J. M. Vergara; G. Lladó; M. Taltavull; L. Gil; M. Boi; L. Llorens.....53
8. Empleo de *Apis mellifera* como bioindicador para evaluar la seguridad agroalimentaria y medioambiental. M. Gutiérrez, J. A. Ruiz, C. Porrini, M. Lodesani.....59

III. Productos Apícolas.

9. Evaluación de la contaminación ambiental por venzo(a)pireno en mieles de Zaragoza. L. Corredera Martín, S. Bayarri Fernández, C. Pérez-Arquillué, R. Lázaro Gistau, A. Herrera Marteache.....67
10. Empleo de componentes del aroma para la caracterización de mieles monoflorales. S. Serrano Jiménez, M. Jodral Villarejo, F. Lafont Deniz, M^a Concepción Gallardo Madueño.....71
11. Clasificación de mieles monoflorales de Sierra Morena en base a parámetros fisicoquímicos, sensoriales y polínicos. S. Serrano, I. Rodríguez, H. Galán, J. L. Ubera, M. Jodral.....81
12. Propiedades funcionales y nutricionales de polen de abeja: Influencia de su origen floral. D. Domínguez Valhondo, D. González Gómez, D. Bohoyo Gil, T. Hernández.....87
13. Aportación a las características de producción de la miel de Barrilla. A. Falcón, Millán R., Sanjuán E., Pérez E., Millán M., Mauricio C., Carrascosa C.....91

14. Ácidos D-Glucónico, Cítrico y L-Málico en las mieles de Barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) de Gran Canaria. A Jiménez-Pulido, E Sanjuán, R. Millán, M. A. Fernández-Muiño, M. T. Sancho.....95

IV. Sanidad Apícola.

15. Determinação do teor de polifenóis totais por FTIR-ATR. O. Anjos, A. Fernandes, C. Gouveia, F. Peres J. C. Rodrigues..... 101
16. Probióticos en apicultura. M. R. Benítez Ahrendts, M. C. Audisio, H. Quinteros.....109
17. Estudio del polen como posible vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas entre las abejas melíferas. I. Fernández, J. R. Díaz, M^a. Aller, M^a L. Ortiz, A. M^a Pedregosa, A. González, R. Martín, M. Higes.....115
18. Diagnóstico laboratorial de enfermedades de la cría de abejas en el noreste de Portugal. S., Pires, K. Paulos, V. Cadavez, M^a J. Valério..... 123
19. Actividad acaricida frente a *Varroa destructor* de aceites esenciales obtenidos de *Thymus* sp. M^a J. Gracia, S. Bayarri, R. Lázaro, L. Corredera, J. Burillo, M. A. Peribáñez, A. Sanz, A. Herrera, C. Pérez-Arquillué.....129
20. Reducción de la población de *Varroa destructor* en colmenas dotadas de fondos de rejilla. S. León, S. Gil, J. M. Flores, F. Padilla, F. Campano.....133
21. Prevalencia y estacionalidad de diferentes patógenos de importancia apícola en Uruguay. K. Antúnez, M. Anido, B. Branchiccela, C. Invernizzi, J. Harriet, J. Campá, P. Zunino.....139
22. Primer diagnóstico de *Aethina tumida* en la Unión Europea. M. J. Valério da Silva.....145
- Índice de Autores.....147

De África a Europa pasando por Iberia: Historia evolutiva de la abeja ibérica

J. Serrano¹, F. Cánovas², R. Hernández-García¹, J. Galián¹, P. De La Rúa¹.

¹Área de Biología Animal, Dpto. de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia (España).

²Marine Ecology and Evolution Team, Centro de Ciências do Mar (CCMAR, CIMAR-Laboratório Associado) Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

Resumen.

La historia evolutiva de la abeja ibérica se ha podido reconstruir basándose en datos obtenidos durante las últimas décadas, merced al estudio de caracteres morfométricos, etológicos y moleculares de los organismos actuales, así como de los fósiles y la biogeografía. A continuación figuran las inferencias sobre dicha historia evolutiva, junto con los datos que las apoyan.

Abstract.

The evolutionary history of the Iberian honeybee has been reconstructed based on data obtained during the last few decades, thanks to the study of morphometric, ethologic and molecular characters of present organisms, as well as from fossil and biogeography data. We present in this article the inferences on this evolutionary history together with the main supporting data.

El origen de *Apis mellifera*.

Los datos disponibles en 1988 llevaron a Ruttner a proponer un origen asiático de *Apis mellifera* y su posterior expansión a finales del Plioceno o comienzos del Pleistoceno hacia África y Europa.

Con la aparición de los primeros datos moleculares esta hipótesis se modificó para situar el origen de *A. mellifera* en Oriente Medio (Garnery et al. 1992). Actualmente la hipótesis más aceptada es la propuesta por Whitfield et al. (2006), basada en el análisis de 1500 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) de numerosas subespecies de *A. mellifera*. Según esta hipótesis la abeja doméstica se originó en África y desde allí colonizó Europa y Asia occidental siguiendo varias rutas de dispersión.

La colonización de Europa.

De acuerdo con estos datos, podemos hoy postular que partiendo del continente africano, la abeja doméstica ya había colonizado Europa occidental durante el periodo interglaciar Mindel-Riss, hace 390.000 años, pasando a través de la Península Ibérica y quizás de la Península Italiana. Seguramente esta colonización fue incluso más temprana, al comienzo del Pleistoceno, dada

la distancia molecular tan notable que existe entre las abejas europeas occidentales (linaje M) y las del Mediterráneo oriental, como la carniola y la italiana (linaje C); Garnery et al. (1992) estimaron que la separación entre ambos grupos de poblaciones data de hace un millón de años.

Los últimos periodos glaciares (Riss y Würm) debieron provocar sucesivas retiradas de las poblaciones hacia el sur, seguidas de nuevas oleadas de colonización hacia el norte durante los periodos interglaciares. Estos movimientos faunísticos han sido bien documentados para todo tipo de organismos, siendo un tópico clásico de la biogeografía de la región paleártica occidental durante el Plioceno y el Pleistoceno (Taberlet et al.1998; Hewitt 1999, 2004).

Durante la última glaciación del Würm las poblaciones de abejas domésticas de Europa occidental sobrevivieron en refugios localizados en las penínsulas Ibérica e Italiana, aunque hubieron posiblemente algunas conexiones entre las poblaciones de ambas penínsulas, ya que comparten algunos haplotipos mitocondriales particulares. Esta posibilidad fue propuesta por Franck et al. (2000) tras el análisis molecular de numerosas poblaciones de abejas domésticas italianas.

Al finalizar el último periodo glacial, las poblaciones ibéricas se hallaron en disposición de colonizar nuevamente Europa occidental. Los datos antes citados de Franck et al. (2000) indican que las abejas de Italia no participaron en este proceso de recolonización, probablemente porque no pudieron salvar la barrera ecofisiológica que suponen los Alpes.

Miguel et al. (2007) obtuvieron datos ilustrativos del proceso de recolonización de Europa occidental que está teniendo lugar desde el final de la última glaciación. Estos autores encontraron que las abejas que sobrevivieron en la península Ibérica, en poblaciones localizadas entre los Pirineos y el Sistema Ibérico, han sido la fuente principal de recolonización, siendo el extremo occidental de los Pirineos la vía más activa de migración de los colonizadores.

Dos conjuntos de poblaciones de *Apis mellifera* en la península Ibérica.

Desde los primeros datos de Garnery et al. (1992, 1995) se puso de manifiesto que los haplotipos del linaje africano A eran más abundantes en el sur peninsular, mientras que los del linaje europeo occidental M predominaban en el norte. La existencia de un gradiente entre ambos linajes haplotípicos se corroboró en estudios posteriores. Así, Cánovas et al. (2002) encontraron que dicho gradiente era abrupto en Galicia, mientras que era muy gradual en el litoral mediterráneo (De la Rúa et al. 1999; 2004a; 2005; Cánovas et al. 2008). Por su parte, Miguel et al. (2007) encontraron que dicho gradiente era también abrupto alrededor del Sistema Ibérico. Arias et al. (2006) apuntaron esta división de las poblaciones de *A. mellifera* de la península Ibérica en dos grupos principales, basándose en datos propios y otros previos de carácter morfológico, haplotípico y alozímico, obtenidos a lo largo de un transecto que

va desde el norte de Marruecos hasta Francia meridional. Cánovas et al. (2008) hallaron una relación entre la distribución de los haplotipos mitocondriales de los linajes A y M en la Península y el clima, resultando que las abejas con haplotipo del linaje A se distribuyen en zonas con un clima más cálido y seco, mientras que las portadoras de un haplotipo M viven en zonas con clima más lluvioso y frío. Ello sugiere que el haplotipo mitocondrial no es un carácter selectivamente neutro.

Si a estos trabajos se añaden otros realizados por nuestro grupo de investigación, que incluyen tanto datos de haplotipos mitocondriales como de microsatélites, y que abarcan la práctica totalidad de la península Ibérica y las Baleares (Cánovas et al. 2011; De la Rúa et al. 2001, 2002, 2003, 2004b, 2007a; Hernández-García et al. 2002, 2009), así como los del grupo de Garnery (Garnery et al. 1995, 1998a; Franck et al. 1998), podemos postular que antes de que comenzara a realizarse la trashumancia a gran escala durante la década de los 80, las poblaciones de abejas domésticas ibéricas estaban divididas en dos grupos principales, cuya distribución natural es la que se indica tentativamente en el mapa (Figura 1).

En la parte meridional de la Península se hallan las poblaciones más afines a las abejas norteafricanas (*A. m. intermissa*), debido a la proximidad geográfica de ambas zonas geográficas. Las abejas de dichas poblaciones muestran por ello un pelo más corto, una respuesta defensiva muy rápida, movimientos vivaces sobre el cuadro, tendencia manifiesta a enjambrar y una fuerte capacidad de propolizar, como ya apuntó Ruttner (1988). Por el contrario, las abejas del tercio norte peninsular serían más afines a *A. m. mellifera*, mostrando un incremento del tamaño corporal y de la longitud del pelo, una disminución del índice cubital y una mayor capacidad de resistir el frío durante el periodo invernal (Ruttner 1988).

Según lo anterior, la conjunción de factores históricos como las colonizaciones y las extinciones, junto otros adaptativos como la relación entre haplotipo mitocondrial y clima, explicaría la distribución de las poblaciones de abejas ibéricas en dos conjuntos ancestrales. Desde el punto de vista molecular, la separación entre ambos tipos de poblaciones quedaría bien delimitada por la distribución del haplotipo mitocondrial, que es un marcador que tiene una estabilidad geográfica muy notable. Por el contrario, es más difícil deducirla del análisis de marcadores nucleares como los microsatélites. Aunque la diversidad genética de éstos disminuye claramente a lo largo de un transecto que va desde Sudáfrica hasta Suecia (Franck et al. 2001), los datos obtenidos en diversas poblaciones peninsulares (Garnery et al. 1998b; Franck et al. 2001; De la Rúa et al. 2002, 2004b, Hernández-García et al. 2009; Cánovas et al. 2011) no se pueden comparar debido a la heterogeneidad de marcadores estudiados y, sobre todo, a la dificultad de estudiar poblaciones que hayan escapado a los efectos homogeneizadores que ha inducido la trashumancia a escala peninsular.

Por su parte, los caracteres morfométricos proporcionan un panorama igualmente complejo de las poblaciones ibéricas, que apenas se puede interpretar en un contexto geográfico a escala peninsular. No obstante, Arias et al. (2006) hallaron que las poblaciones del noreste ibérico eran afines a una población francesa de referencia y distinguibles del resto de poblaciones ibéricas analizadas, a pesar de la notable heterogeneidad de estas últimas. Ello concuerda con la hipótesis de la existencia de dos grupos principales de poblaciones de *A. m. iberiensis*.

Desde el punto de vista taxonómico, esta dualidad no sustenta la existencia de una sola subespecie en la península Ibérica, *Apis mellifera iberiensis* Engel 1999, a la que Goetze (1964) comenzó a referirse como *A. mellifera iberica*. De hecho, algunos autores se han referido a las abejas del norte como “*mellifera-like*” y a las del sur como “*intermissa-like*” (Smith et al. 1991; Arias et al. 2006). No obstante, el proceso de homogeneización antes citado ha borrado probablemente buena parte de las diferencias que pudiera haber entre dichos grupos, dando como resultado unas abejas que presentan rasgos raciales distintivos, aún dentro de la notable diversidad que presentan con respecto a varios caracteres. Este hecho y la existencia de un flujo génico limitado entre *A. m. iberiensis* y las subespecies contiguas (*intermissa* y *mellifera*) debido a las barreras geográficas, justifican que se hable de una subespecie propia de la península Ibérica.

Historia evolutiva de las poblaciones ibéricas meridionales: colonizaciones recientes y diversificación in situ.

Si bien el proceso de recolonización de Europa occidental por parte de las poblaciones de abejas que sobrevivieron en la península Ibérica, ha merecido varios estudios (sintetizados en el trabajo de Miguel et al. 2007), apenas se ha debatido la historia evolutiva reciente de las poblaciones que ocupaban los dos tercios más meridionales de la Península. La pervivencia de tales poblaciones durante los periodos glaciares es probable porque, salvo en las zonas de montaña con mayor altitud, las abejas estaban adaptadas a condiciones climáticas rigurosas aunque no extremas. Dicha adaptación se infiere de la supervivencia de las colonias actuales en zonas con inviernos duros, tanto de la Península de otras zonas de Europa occidental. Esto hace suponer que la distribución de *A. mellifera* en la parte más meridional de la Península era casi continua, quizás fragmentada en varios núcleos principales, incluso durante los periodos glaciares.

La proximidad al norte de África posibilitó la llegada de nuevas poblaciones colonizadoras a la parte más meridional de la Península. Con respecto a esta hipótesis, cabe preguntarse acerca de la frecuencia con que han llegado oleadas de colonización a la Península. Para resolver esta cuestión hay que basarse en los datos del haplotipo mitocondrial, dada la tendencia de este marcador a estabilizarse sobre una zona una vez que la población que migra ha colonizado con éxito.

Surge aquí una primera sorpresa: la diversidad de haplotipos mitocondriales es muy elevada en la península Ibérica, mayor incluso que la encontrada en África. Este hecho ya fue puesto de manifiesto por Franck et al. (1998) y desde entonces ha venido siendo corroborado por resultados posteriores: actualmente se conocen 17 haplotipos del linaje A en la Península, si bien es cierto que es una zona mucho mejor estudiada que el transecto que va desde Sudáfrica al norte de África.

Esta diferencia se acentúa todavía más si se considera que en el norte de África predominan los haplotipos del denominado sublinaje A_{ii}, A8 y A9, mientras que en la Península los haplotipos más frecuentes son los del sublinaje A_i, siendo el más abundante el A2 (76%), seguido del A1 (11,5%) y el A3 (7,2%) (Tabla 1).

El tercer sublinaje de haplotipos africanos, el A_{iii} es predominante en las islas macaronésicas y la costa atlántica peninsular (Huelva, Portugal), y escaso en el litoral africano (Franck et al.2001; De la Rúa et al. 2007b).

Tomando en consideración la distribución actual de los haplotipos del linaje en Iberia, cabe postular que:

1. Las colonizaciones más antiguas que pueden ser detectadas atendiendo a este marcador, corresponderían a abejas con haplotipos del sublinaje A_i, pues estos los más frecuentes y los de más amplia distribución peninsular. Entre tales haplotipos figuran el A1 y el A4, que son comunes en África. No obstante, entre los colonizadores no estaría presente el más abundante de la Península, el A2, ya que es raro en el norte de África. Es posible que este haplotipo tenga un origen autóctono, es decir, se habría formado in situ, al igual que otros haplotipos exclusivos de Iberia. En favor de esta hipótesis cabe citar la diversidad bioclimática de la Península y los procesos de fragmentación poblacional que pudieron ocurrir en el ámbito peninsular durante las épocas geológicas más desfavorables.
2. Una oleada de colonización más reciente estaría representada por abejas portadoras de haplotipos del sublinaje A_{ii}, el A8 y el A9, que son los predominantes en las poblaciones actuales norteafricanas. Este sublinaje también tiene una distribución peninsular amplia y habría llegado igualmente a las dos islas más septentrionales de las Baleares, Mallorca y Menorca.
3. Igualmente reciente sería la llegada de abejas con haplotipos del sublinaje A_{iii}. Mientras que la presencia de estos haplotipos en la costa atlántica de Iberia y las Canarias se debe posiblemente a factores naturales (no se puede descartar que fueran llevadas a Canarias por los guanches), no está claro si su presencia en Madeira y Azores es igualmente debida a procesos naturales o se debe a introducciones durante los últimos siete siglos. Hay que tener en cuenta que ambos archipiélagos estaban deshabitados hasta el siglo XV y que las Azores están a unos 1.400 km de las costas europeas más cercanas.

Presente y futuro de las poblaciones de *Apis mellifera iberiensis*.

En el momento presente la existencia de dos grandes conjuntos de poblaciones de abejas ibéricas se ha visto considerablemente alterada por el intenso dinamismo que caracteriza a las explotaciones apícolas españolas:

1. La trashumancia ha ido adquiriendo importancia desde la década de los 80, hasta afectar a más del 80% de la cabaña apícola nacional. Ello posibilita la reproducción, y por tanto el flujo génico entre los colmenares más meridionales y los septentrionales.

2. La pérdida de colmenas por parásitos como Varroa y Nosema, así como la acción de otros patógenos, pesticidas y factores ambientales no bien precisados, han sido cuantiosas durante las últimas décadas. Ello ha impulsado a numerosos apicultores a adquirir colmenas de diversas procedencias geográficas. Además, el apicultor puede reponer pérdidas comprando enjambres y núcleos, todo lo cual no presenta en la actualidad las dificultades de antaño. Se facilita así el incremento en la diversidad genética de los colmenares.

La consecuencia de este dinamismo es que la cabaña apícola nacional está experimentando un proceso de homogeneización genética de magnitud aún no bien precisada, pero que parece ser considerable. Esta intensidad se pone de manifiesto al analizar el mapa actual de distribución de haplotipos mitocondriales: vemos que los haplotipos del linaje M pueden ser localmente abundantes en zonas muy meridionales como Huelva o Formentera, y que igualmente los haplotipos del linaje A se hallan de forma inesperada en zonas del País Vasco, Cataluña, Cantabria o Asturias. Estos resultados sólo pueden ser explicables atendiendo al dinamismo antes citado.

Es igualmente llamativo que las zonas que se han visto menos afectadas por este proceso de homogeneización, son las que albergan los haplotipos que cabe esperar según la hipótesis de la historia evolutiva de la abeja ibérica antes citada: así, en los valles más aislados de Asturias o del norte de Galicia (Cánovas et al. 2002) sólo hay haplotipos M; en las localidades más aisladas de Murcia sólo hay haplotipos A, a pesar de la relativa frecuencia de haplotipos M en esta última provincia (Hernández-García et al. 2009) (Tabla 2).

En cuanto a los microsatélites, su naturaleza de marcadores genéticos nucleares y trasmisibles por reinas y zánganos simultáneamente, hace posible que la incorporación de colmenas con procedencia diversa se traduzca en un flujo rápido de los genes recién llegados dentro y entre colmenares, siendo estos genes un buen exponente de lo que ocurre con el resto del genoma nuclear. El análisis que han llevado a cabo Cánovas et al. (2011) a escala peninsular, ha corroborado la ausencia de una estructura genética a escala local o regional, como cabría esperar del notable trasiego de colmenas que ha generado la trashumancia en España.

Dada la situación actual cabe preguntarse por las consecuencias que pudiera tener esta dinámica sobre las cualidades de la abeja ibérica. La más obvia es la desaparición progresiva de los dos conjuntos de poblaciones que

probablemente existían durante los años 50 y 60, el de las parecidas a *A. m. intermissa* en el sur y las afines a *A. m. mellifera* en el norte. La homogeneización genética acabará eventualmente con tal distinción. El incremento de la variabilidad genética que experimenta todo colmenar por este proceso homogeneizador es considerado como positivo, pues es bien sabido mediante estudios realizados en otras subespecies de abejas domésticas, que una mayor diversidad genética está asociada al incremento de varias características productivas y a una mayor resistencia frente a parásitos y patógenos, entre otros efectos favorables (Keller y Reeve 1994; Tarpy y Page 2001, Mattila y Seeley 2007: Oldroyd y Fewer 2007).

En el polo opuesto, el trasiego de colmenas, enjambres y núcleos facilita la propagación de patógenos, incluso a escala planetaria, estando admitido que la propagación de *Varroa* en España se aceleró por el incremento de la trashumancia.

Es también obvio que el proceso homogeneizador provocará la desaparición de los ecotipos, es decir, conjuntos enteros de genotipos que muestran una adaptación fina a las condiciones locales y regionales, y que se han originado merced a la intervención de factores selectivos naturales y del propio apicultor durante generaciones seculares. Esta cuestión no está bien estudiada todavía, por lo que se desconoce si las poblaciones más aisladas preservan genes singulares o conjuntos co-adaptados de genes de especial relevancia. Como se indicó anteriormente, parece haber una relación adaptativa entre haplotipo mitocondrial y clima, que se vería afectada de inmediato al ubicar a las colmenas en zonas distantes con una climatología muy diferente. Esta posible pérdida de adaptabilidad de las colmenas es un aspecto igualmente poco estudiado y merece su consideración en estudios futuros.

Referencias.

- Arias M. C., Rinderer T.E., Sheppard W.S. 2006. Further characterization of honey bees from the Iberian Peninsula by allozyme, morphometric and mtDNA haplotype analyses. *J. Apic. Res.* 45: 188-196.
- Cánovas F., De la Rúa P., Serrano J., Galián J. 2002. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de *Apis mellifera iberica* de Galicia (NW España). *Arch. Zootec.* 51: 441- 448.
- Cánovas F., De La Rúa P., Serrano J., Galián J. 2008. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 46: 24–30.
- Cánovas F., de la Rúa P., Serrano J., Galián J. 2011. Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie*, en prensa
- De la Rúa P., Galián J., Serrano J. 1999. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de abejas de la miel (*Apis mellifera* L.) de la Región de Murcia. *Inv. Agrar. Prod. San. Anim.* 14: 41- 50.

- De la Rúa P., J. Galián, J. Serrano, R. F. A. Moritz. 2001. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain). *Apidologie* 32: 417- 427.
- De la Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R.F.A. 2002. Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 40: 164- 168.
- De la Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R.F.A. 2003. Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genet. Sel. Evol.* 35: 1-12.
- De la Rúa P., Jiménez Y., Galián J., Serrano J. 2004a. Evaluation of the biodiversity of honey bee (*Apis mellifera*) populations from eastern Spain. *J. Apic. Res.* 43: 162-166.
- De la Rúa P., Hernández-García R., Pedersen B.V., Galián J., Serrano J. 2004b. Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from western Andalusia. *Arch. Zootec.* 53: 195-203.
- De la Rúa P., Hernández-García R., Jiménez Y., Galián J., Serrano J. 2005. Biodiversity of *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae) from northeastern Spain assessed by mitochondrial analysis. *Insect Syst. Evol.* 36 (1): 21-28.
- De la Rúa P., Fuchs S., Serrano J. 2007a. A scientific note on the ITS-1 region of *Apis mellifera* subspecies. *Apidologie* 38: 378-379.
- De la Rúa P., Radloff S., Hepburn R., Serrano J. 2007b. Do molecular markers support morphometric and pheromone analyses? A preliminary case study in *Apis mellifera* populations of Morocco. *Arch. Zootec.* 56: 33-42.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.-M. 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52: 1119-1998.
- Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J.-M. 2000. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Mol. Ecol.* 9: 907-921.
- Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B.P., Hepburn H.R., Solignac M., Cornuet J.M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86: 420-430.
- Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M. 1992. Evolutionary history of the honey bee (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1:145-154.
- Garnery L., Mosshine E.H., Oldroyd B.P., Cornuet J.M. 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Mol. Ecol.* 4: 465-471.
- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.-M., Solignac M. 1998a. Genetic biodiversity of the west European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. *Genet. Selec. Evol.* 30: 31-47.

- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.-M., Solignac M. 1998b. Genetic biodiversity of the west European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite DNA. *Genet. Selec. Evol.* 30: 49-74.
- Goetze G.K.L. 1964. Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese. Teil I: Systematik, Zeugung und Vererbung. Monographien zur angewandten Entomologie, Bd. 19. Paul Parey Verlag, Hamburg.
- Hernández-García R., Fernández B., De la Rúa P., Galián J., Serrano J. 2002. The effect of trashumance on the genetic variability of *Apis mellifera iberica* from Murcia (Southeast Spain). In: *Bees without frontiers*. R. Jones ed. pp. 96-103. International Bee Research Association, Cardiff.
- Hernández-García R., De la Rúa P., Serrano J. 2009. Mating frequency in *Apis mellifera iberiensis* queens. *J. Apic. Res.* 48: 121-125.
- Hewitt G. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linnean Soc.* 68: 87-112.
- Hewitt G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. B (Biol. Sci.)* 359: 183-195.
- Keller L., Reeve H.K. 1994. Genetic variability, queen number, and polyandry in social Hymenoptera. *Evolution* 48: 694- 704.
- Mattila H.R., Seeley T.D. 2007. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science* 317: 362-364.
- Miguel I., Garnery L., Sheppard W.S., Estonba A. 2007. Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial re-colonization routes in the western Europe. *Apidologie* 38: 141-155.
- Miguel I., Baylac M., Iriondo M., Manzano C., Garnery L., Estonba A. 2011. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie* DOI 10.1051/apido/2010048
- Oldroyd B.P., Fewell J.H. 2007. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. *Trends Ecol. Evol.* 22: 408-413.
- Ruttner F. 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 284 pp
- Smith D.R., Palopoli M.F., Taylor B.R., Garnery L., Cornuet J.-M., Solignac M., Brown M. 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *J. Hered.* 82: 96-100.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* 7: 453-464.
- Tarry D.R., Page R.E. 2001. The curious promiscuity of honey bees (*Apis mellifera*): evolutionary and behavioural mechanisms. *Ann. Zool. Fenn.* 38: 255-265.
- Whitfield, C.W., Behura S.K., Berlocher S.H., Clark A.G., Johnston J.S., Sheppard W S., Smith D.R., Suarez A.V., Weaver D., Tsutsui N.D. 2006. Thrice

out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*.
Science 314: 642-645.

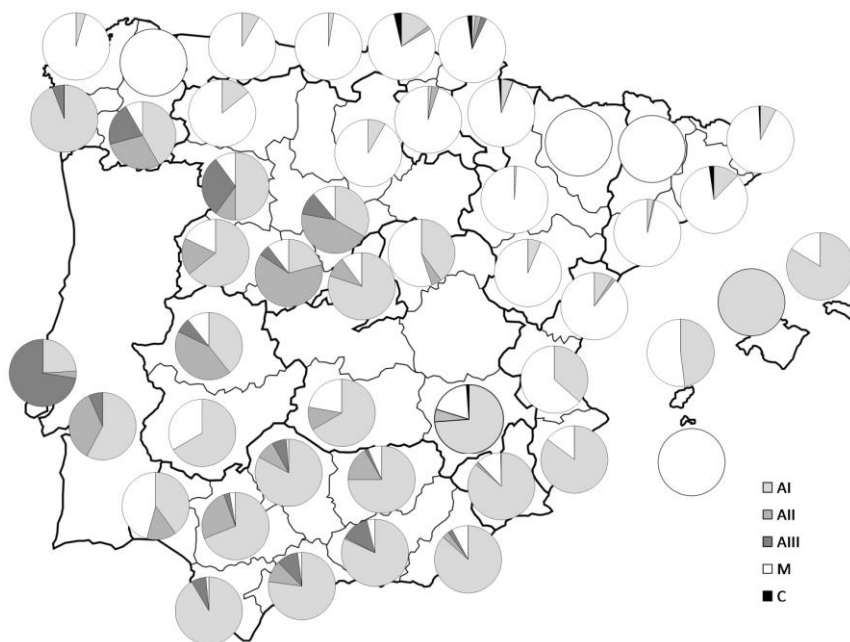


Figura 1. Mapa de la península Ibérica mostrando los diagramas de frecuencias y la distribución de los sublinajes y linajes evolutivos observados en *A. m. iberiensis*.

Localidad	A1	A2	A3	A4	A4'	A6	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A20	A21	A28	Total
Álava		2					3	1											6
Albacete	1	53	2	6			5												67
Alicante	10	73	5	2	1													13	104
Almería	9	68					3						2						82
Asturias	4	5	1																10
Ávila		1	3				8	4		1									17
Badajoz	1	2	1																4
Barcelona	1	9	1																11
Burgos	1	3																	4
Cáceres		1	6				5	3							2				17
Cádiz	1	77		3		1				7									89
Castellón		11					1	1											13
Ciudad Real		6				1													7
Córdoba	16	54	2			5	3			4			2						86
Évora	19	14	5	4			12	11				2			3				70
Gerona	2																	2	10
Granada	4	84	9	7				1					17						122
Guadalajara		9	6	1			2												18
Guipúzcoa		3					5								5				13
Huelva	4	10					2	3											19
Huesca																			0
Jaén	5	39	1				6	4					1						56
La Coruña		1																	1

Tabla 1a. Distribución de haplotipos africanos en las colmenas muestreadas en diferentes provincias.

Localidad	A1	A2	A3	A4	A4'	A6	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A20	A21	A28	Total
León	1																		1
Lérida																			0
Lisboa	3		4				1							2	19				29
Lugo								6											6
Madrid		7	1					1											9
Málaga	1	20	13	3				5					5						47
Murcia	40	322	2	11			3	3						1				1	383
Navarra		7	8					1											16
Orense		1	6	3			3	4		5									22
Pontevedra	2		7	13						1									23
Porto	1	2	2				1	2		11	1				27	1	1		49
Salamanca	2	13	3				3	2											23
Santander	1																		1
Segovia		9	2				7	2							1				21
Sevilla	17	71	2	2		1	14	7		1	3		2						120
Tarragona		4					1												5
Teruel		3																	3
Toledo	1	7					1	1		1									11
Valencia	3	27	2		3														35
Vizcaya	1	5	2				1												9
Zamora	1	2	2						1	1					2				9
Zaragoza		1																	1

Tabla 1b. Distribución de haplotipos africanos en las colmenas muestreadas en diferentes provincias.

Localidad	M1	M2	M3	M4	M4'	M4''	M5	M6	M7	M7'	M8	M8'	M9	M10	M11	M11'
Álava				67	16	4		1	11	1	5	1			1	
Albacete									16							
Alicante			1	9	1	2	2	3								
Almería				6				1								
Asturias				67	13	1	5	8	7		19		5			
Ávila				1					1							
Badajoz				1												
Barcelona				39	2		4		3		24	2				
Burgos				6			16	11	8		3					
Cáceres				1												
Cádiz									1							
Castellón				85	10		2		8	1	1					
Ciudad Real			1				1									
Córdoba				1												
Gerona			1	73	4		3		3	3	26	3				
Granada				5												
Guadalajara				14			5	1			2					
Guipúzcoa				114	25	1			14	1		1				
Huelva				1					15							
Huesca				37	1				3		2					
Jaén		1		2	1											
La Coruña							18	3								

Tabla 2a. Distribución de haplotipos europeos occidentales en las colmenas muestreadas en las provincias de España.

Localidad	M12	M13	M14	M17	M17'	M19	M20'	M26	M27	M27'	M29	M32	M36	M37	M38	Total
Álava	3						1									111
Albacete																16
Alicante																18
Almería																7
Asturias	4														2	131
Ávila																2
Badajoz																1
Barcelona																74
Burgos																44
Cáceres																1
Cádiz																1
Castellón																107
Ciudad Real																2
Córdoba																1
Gerona			3					1			1					121
Granada																5
Guadalajara																22
Guipúzcoa													1	1		158
Huelva																16
Huesca																43
Jaén																4
La Coruña																21

Tabla 2b. Distribución de haplotipos europeos occidentales en las colmenas muestreadas en las provincias de España.

Localidad	M1	M2	M3	M4	M4'	M4''	M5	M6	M7	M7'	M8	M8'	M9	M10	M11	M11'
León				4												
Lérida				47					3		4					
Lugo				4	24		13									
Madrid								1								
Málaga									1							
Murcia			1	30	7		5		6				2			
Navarra				128	7			5	40	7	2	2				
Orense							2									
Pontevedra							4									
Salamanca				1	1			1	2							
Santander				6	21				7							
Segovia				5	1				4	2	2					
Sevilla			1	5				1	3							
Tarragona				71	22			4	18		15	2				
Teruel				32	3				8							
Toledo				2					2	1						
Valencia			1	14	8				16	3	19					
Vizcaya				21	12	1			2			1		1	2	1
Zamora																
Zaragoza			1	51	3				32	8	1	2				

Tabla 2c. Distribución de haplotipos europeos occidentales en las colmenas muestreadas en las provincias de España.

Localidad	M12	M13	M14	M17	M17'	M19	M20'	M26	M27	M27'	M29	M32	M36	M37	M38	Total
León	2															6
Lérida																54
Lugo																41
Madrid																1
Málaga																1
Murcia					1											52
Navarra	6					49			2			3	3			254
Orense																2
Pontevedra																4
Salamanca																5
Santander	4															38
Segovia																14
Sevilla																10
Tarragona			1													133
Teruel	1															44
Toledo																5
Valencia																61
Vizcaya	1					1				1						44
Zamora																0
Zaragoza	5															103

Tabla 2d. Distribución de haplotipos europeos occidentales en las colmenas muestreadas en las provincias de España.

Patrón espacial de la variación molecular de *Apis mellifera* en Gran Canaria y La Gomera (Islas Canarias).

I. Muñoz¹, M. A. Pinto² y P. De La Rúa¹

¹Área de Biología Animal, Dpto. de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia (España).

²Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança (Portugal).

Abstract.

The Canary Islands have environmental conditions according to altitude, latitude and longitude, which influence in the distribution of organisms. Previous studies suggest the existence of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations on the Canary Islands that have evolved relatively isolated and, therefore adapted to particular environmental conditions. Canarian honeybees were included in the African sublineage with Atlantic distribution (A_{III}), in which honeybee populations from the Macaronesian archipelagos (Azores, Madeira, the Savage Islands, Canary Islands and Cape Verde) and Portugal, are also included. In this paper we present the results of the molecular variation at mitochondrial DNA level of honeybee populations from Gran Canaria and La Gomera (Canary Islands). This marker is suitable for estimating genetic diversity and patterns of spatial differentiation in connection with the existing environmental variety on the islands of Gran Canaria and La Gomera.

Introducción.

Los archipiélagos atlánticos de origen volcánico de Azores, Madeira, Salvajes, Canarias y Cabo Verde conforman la región biogeográfica de la Macaronesia. Su situación geográfica, la singularidad de sus diversas condiciones ecológicas y el aislamiento, han propiciado la existencia de especies y comunidades únicas en el mundo. Este hecho convierte a estos archipiélagos en uno de los centros de biodiversidad insular más importantes del Planeta, cuya tasa de endemismos es también la más alta de Europa (Gillespie y Clague 2009).

Las Islas Canarias constituyen uno de los archipiélagos de mayor tamaño de la Macaronesia y cubren una superficie total de 7.242 kilómetros cuadrados. Además, desde una perspectiva biológica, son las islas de mayor riqueza y diversidad de la región, con 3.672 especies exclusivas y la mayor proporción de endemismos (27,55%).

La abeja de la miel (*Apis mellifera* L.) posee una gran capacidad adaptativa a multitud de ecosistemas en su rango de distribución natural (África, Europa, Asia central y Asia occidental), existiendo unas 29 subespecies y numerosos

ecotipos descritos en función de su comportamiento, morfología y datos moleculares (Ruttner 1988; Sheppard et al. 1997; Sheppard y Meixner 2003). Las poblaciones de la *A. mellifera* de las Islas Canarias han sufrido procesos de adaptación al medio ambiente insular por lo que su protección es de gran valor para el mantenimiento de la flora endémica canaria. Estas poblaciones pertenecen a una rama del linaje evolutivo africano con distribución atlántica (A_{III}) y están caracterizadas por la presencia de haplotipos mitocondriales particulares (De la Rúa et al. 1998). Estos factores y el hecho de que se encuentren adaptadas a la flora endémica canaria hacen que su conservación sea de particular interés.

La geografía de las características del paisaje puede ejercer una fuerza estructuradora importante sobre la probabilidad de dispersión individual y la distribución de las especies (Avisé 2004). La estructura genética de las poblaciones puede ser el resultado tanto del paisaje como de las características biológicas de cada especie. En el caso de *A. mellifera*, desde principios del siglo XX, la introducción de reinas de otras razas ha sido una práctica muy utilizada en la apicultura moderna, y entre las principales consecuencias se encuentra el reemplazamiento, el aumento del flujo genético entre poblaciones de abejas nativas e introducidas (Jensen et al. 2005) y cambios en la distribución de las poblaciones locales.

En el estudio realizado por De la Rúa et al. (2001) se constató la existencia de introgresión genética en las abejas de las Islas Canarias, la cual provenía de abejas pertenecientes a otras razas europeas como *A. m. ligustica* o abeja italiana y *A. m. carnica* o abeja carniola. El nivel de introgresión genética fue acusado en Tenerife y El Hierro, se observó una intensidad media en Gran Canaria y La Gomera y era nulo en La Palma. La introducción de abejas reinas pertenecientes a otras razas puede alterar potencialmente la diversidad de las poblaciones locales mediante la hibridación de reinas locales con zánganos procedentes de las colmenas introducidas, por ello en 2001 el Gobierno de Canarias inició el plan de conservación y protección de la abeja negra canaria (BOC 49, 20/04/2001).

En este trabajo se pretende examinar los patrones espaciales de la variación genética de la población de *A. mellifera* de las islas de Gran Canaria y La Gomera, ya que la combinación de los factores del paisaje, la biología de la especie y la práctica de introducción de reinas foráneas podría estar alterando la distribución de los haplotipos mitocondriales y poniendo en riesgo a las poblaciones locales de abejas canarias.

Material y Métodos.

Muestreo.

Las muestras de abejas obreras adultas fueron recolectadas del interior de las colmenas en las islas de Gran Canaria y La Gomera en abril de 2010. Se muestrearon un total de 130 colmenas distribuidas en 9 apiarios de Gran Canaria y 5 de La Gomera (las localidades de muestreo se muestran en la

Tabla 1 y Figura 1). Las abejas se introdujeron directamente en etanol 100% y se conservaron en el laboratorio a -20 °C hasta su procesamiento.

Análisis molecular

El ADN total fue extraído de una abeja obrera adulta por colmena mediante una solución de Chelex® al 5% siguiendo un protocolo modificado a partir de Walsh *et al.* (1991). El análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) se llevó a cabo según el método descrito por Garnery *et al.* (1992), el cual se basa en la amplificación de la región intergénica comprendida entre el ARN transferente de la leucina (ARNt^{leu}) y la subunidad II de la citocromo oxidasa (cox2), mediante los cebadores E2 (5'-GGCAGAATAAGTGACATTG-3') y H2 (5'-CAATATCATTGAT GAACC-3'). El tamaño de los fragmentos de amplificación se determinó tras examinar los productos de PCR en gel de agarosa al 1,5%, tinción con bromuro de etidio y visualización con UV. Posteriormente los productos de PCR fueron digeridos con la enzima *DraI*, generando patrones de bandas identificables por sus diferencias de tamaño (RFLP), las cuales fueron separadas con gel de agarosa Nusieve al 4%. Los haplotipos fueron determinados de acuerdo a los patrones descritos por Garnery *et al.* (1993).

Análisis estadístico.

Las frecuencias haplotípicas y la diversidad genética por localidad e isla, fueron calculadas mediante el programa GenAlex (Peakall y Smouse, 2006). El análisis de la estructura genética fue realizado a través del cálculo del estadístico F_{ST} , de acuerdo con la metodología de Weir y Cockerham (1984), y del análisis de la varianza molecular (AMOVA) mediante el programa Arlequin (Excoffier *et al.* 2005).

Resultados y Discusión.

La amplificación de las muestras produjo fragmentos de cinco tamaños diferentes que se correspondieron con 9 patrones de RFLP diferentes (A1, A3, A9, A11, A14, A15, A_n, M7 y C). Las frecuencias haplotípicas y la distribución de los haplotipos en las islas de Gran Canaria y La Gomera puede observarse en la Figura 1. Los haplotipos más frecuentes en Gran Canaria fueron el A14 (31,1%), A11 (21,1%), A1 (20,0%) y A15 (17,8%), mientras que en La Gomera fueron los pertenecientes al linaje C de Europa del este (47,5%), A11 (22,5%) y A15 (17,5%). Se cuantificó la proporción de linajes y sublinajes, y se observó que el sublinaje africano de distribución atlántica (A_{III}) típico de las Islas Canarias presentó una proporción del 70% en Gran Canaria y del 50% en La Gomera, sin embargo también se observaron haplotipos de los linajes de Europa occidental (M7) y del este (C), indicando introgresión genética a nivel mitocondrial en las islas de Gran Canaria y La Gomera.

La diversidad haplotípica fue mayor en Gran Canaria (0,792) que en La Gomera (0,704), y en ambos casos fue superior a la detectada en el estudio realizado por De la Rúa *et al.* (2001). Los detalles por localidad se muestran en la Tabla 1. Estos cambios en la diversidad haplotípica pueden deberse a las fluctuaciones del censo apícola, debidas entre otras causas al aumento de la

incidencia de enfermedades (varroa, síndrome del colapso de las colmenas,...), y a la práctica apícola de introducir reinas foráneas.

Los valores de FST fueron de 0,49795 y 0,55536 para Gran Canaria y La Gomera respectivamente, lo cual indica que existe una estructuración de las poblaciones de abejas con un grado de significación superior al 0,1%. Se realizaron grupos en función de la situación geográfica de los apiarios y los resultados del test AMOVA indicaron que el 24,47 y el 45,41% de la variación genética se debían a la localización geográfica de los apiarios.

Conclusiones.

La identificación de la relación entre las características del paisaje y la estructura genética de las poblaciones de abejas de la miel es compleja debido a la multitud de factores que interactúan. Nuestros resultados muestran subdivisión poblacional, siendo más acusada en La Gomera que en Gran Canaria, posiblemente debidos a dos factores principales: la geografía del paisaje y el manejo apícola. Estos resultados podrían ser aplicados para diseñar, desarrollar y monitorizar a las poblaciones de abejas de las Islas Canarias en futuros programas de conservación en Gran Canaria y La Gomera.

Referencias.

- Avise J.C. (2004) Molecular markers, natural history and evolution, 2nd edition, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- De la Rúa P., Galián J., Serrano J. (1998) Mitochondrial variability of honeybees populations from the Canary Islands, Mol. Ecol. 7, 1543–1547.
- De la Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R.F.A. (2001) Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands, Mol. Ecol. 10, 1733–1742.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis, Evol. Bioinform. Online 1, 47–50.
- Garnery L., Cornuet J.-M., Solignac M. (1992) Evolutionary history of the honey bee (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA analysis, Mol. Ecol. 1, 145–154.
- Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.-M. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L, Experientia 49, 1016–1021.
- Jensen A.B., Palmer K.A., Boomsma J.J., Pedersen B.V. (2005) Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe, Mol. Ecol. 14, 93–106.
- Peakall R., Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, Mol. Ecol. Notes 6, 288–295.

- Gillespie R.G., Clague D.A. (2009) *Encyclopedia of Islands*, Berkeley, CA and London, University of California Press, ISBN: 978-0-520-25649-1.
- Ruttner F. (1988) *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*, Springer Verlag, Berlin
- Sheppard W.S., Arias M.C., Grech A., Meixner M.D. (1997) *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta, *Apidologie* 28, 287–293.
- Sheppard W.S., Meixner M.D. (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia, *Apidologie* 34, 367–375.
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Biotechniques* 10, 506–512.
- Weir B. S., Cockerham C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution Int. J. Org. Evol.* 38, 1358–1370.

	Localidad (N)	Na	D_h	A1	A3	A9	A11	A14	A15	A_n	M7	C
1	San Lorenzo (10)	4	0,778	0,20		0,40		0,10	0,30			
2	Las Vegas (10)	1	0,000	1,00								
3	Tenteniguada (10)	4	0,644		0,10		0,20	0,10	0,60			
4	Bco de los Cernícalos (10)	3	0,689	0,50			0,30	0,20				
5	Cazadores (10)	5	0,844	0,10			0,30	0,20	0,30			0,10
6	El Espinillo (10)	1	0,000				1,00					
7	La Aldea (10)	5	0,844			0,10	0,10	0,30	0,30		0,20	
8	Cuermeja (10)	1	0,000					1,00				

Tabla 1a. Localidades de muestreo, número total de colmenas (N), número de haplotipos detectados (Na), diversidad haplotípica (D_h) y frecuencias haplotípicas por localidad e isla.

	Localidad (N)	Na	D_h	A1	A3	A9	A11	A14	A15	A_n	M7	C
9	Artejevez (10)	2	0,200					0,90	0,10			
10	El Moralito (10)	5	0,756	0,10			0,50	0,10	0,20	0,10		
11	Los Barranquillos (3)	1	0,000				1,00					
12	Las Casetas (10)	2	0,200						0,10			0,90
13	Los Tiles (7)	3	0,667				0,14	0,29	0,57			
14	Benchijigua (10)	1	0,000									1,00
15	Gran Canaria (90)	8	0,792	0,20	0,01	0,06	0,21	0,31	0,18		0,02	0,01
16	La Gomera (40)	6	0,704	0,03			0,23	0,08	0,18	0,03		0,48

Tabla 1a. Localidades de muestreo, número total de colmenas (N), número de haplotipos detectados (Na), diversidad haplotípica (D_h) y frecuencias haplotípicas por localidad e isla.

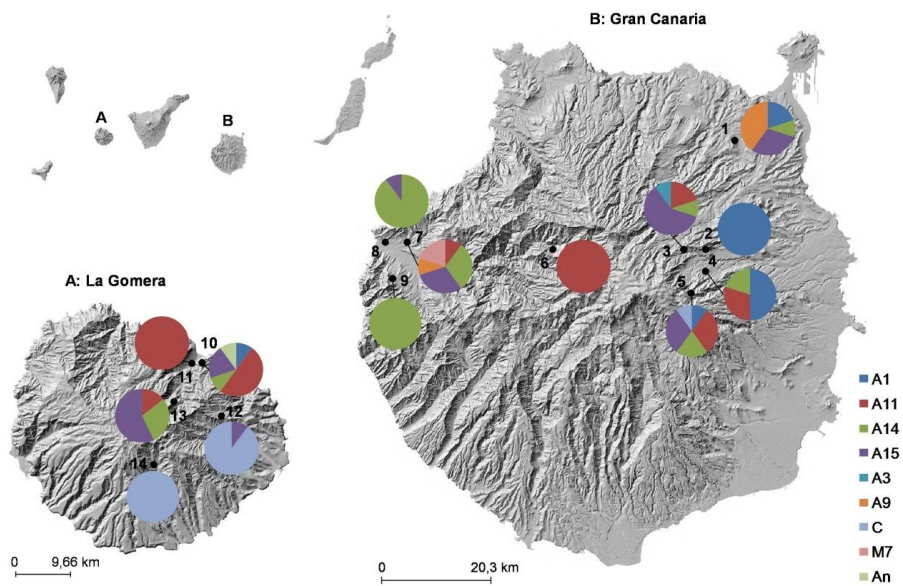


Figura 1. Distribución espacial de los haplotipos y frecuencias haplotípicas por localidad de muestreo en las islas de La Gomera (A) y Gran Canaria (B). Los números se corresponden con las descripciones de la Tabla 1.

Puesta a punto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (q-PCR) en *Apis mellifera iberiensis*.

L. Jara, P. De La Rúa, J. Galián

Área de Biología Animal, Dpto. de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100 Murcia (España).

Resumen.

La expresión diferencial de genes relacionados con la tolerancia de la abeja de la miel *Apis mellifera* a la varroasis está siendo estudiada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o q-PCR. En este trabajo se ha realizado una puesta a punto de dicha técnica, en cuanto a los métodos de conservación del ARNm en poblaciones de abejas ibéricas. De los dos tipos de muestras que se han usado (conservadas en el reactivo RNA-*later* y congeladas en nitrógeno líquido) han funcionado mejor éstas últimas. De los cinco genes que han sido probados sólo tres han dado resultado positivo, probablemente debido a diferencias en la secuencia respecto a la subespecie *A. m. mellifera* con la que se inició este tipo de estudios.

Abstract.

The differential gene expression related to the tolerance of the honeybee *Apis mellifera* to the varroasis is being studied through the quantitative polymerase chain reaction or q-PCR technique. In this work, this technique has been set up in relation to the RNAm conservation methods in Iberian honeybees populations. Two types of samples have been used (preserved with the reagent RNA-*later* and frozen in liquid nitrogen), being the last ones those that worked better. Three out of the five tested genes have given positive results, probably due to differences in the sequence with respect to the subspecies *A. m. mellifera* with which the technique was established.

Introducción.

Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) es uno de los insectos económicamente más importantes para el hombre, por tratarse del principal polinizador de cultivos y plantas silvestres a nivel mundial, así como del principal productor de miel (Burguett *et al.* 2004). La industria apícola se encuentra gravemente amenazada en la actualidad, debido principalmente a la incidencia del ácaro parasítico *Varroa destructor* (Anderson y Trueman 2000) (Sammataro *et al.* 2000).

V. destructor es un ectoparásito forético obligado de *A. mellifera* y *A. cerana* que se alimenta de las abejas en todos sus estadios de desarrollo y se reproduce en las celdillas de cría cuando ésta se encuentra presente en la

colmena. Su acción expoliadora debilita y reduce la vida productiva de las abejas, afectando a su sistema inmune (Gregory *et al.* 2005) y favoreciendo además la transmisión de numerosos virus y bacterias, lo que lleva en la mayoría de los casos a la desaparición final de la colmena.

Sin embargo, no todas las poblaciones de abejas presentan la misma tolerancia al parásito, como es el caso de su hospedador original, la abeja asiática de la miel *A. cerana*, cuyas poblaciones se encuentran en equilibrio con las del ácaro (Fries *et al.* 1994; Wood *et al.* 1999; Seeley, 2007; Le Conte *et al.* 2007). Entre los caracteres que se creen relacionados con estas diferencias de resistencia a *Varroa*, se encuentran: el comportamiento de despiojado (*grooming*) y el higiénico de las abejas (Sammataro *et al.* 2000), y el bajo éxito reproductivo del ácaro en ciertas colmenas (Moritz 1985).

Tradicionalmente, la lucha contra *V. destructor* se ha centrado en el uso de acaricidas y otros productos químicos para su eliminación. Pero la utilización de estos tratamientos lleva asociados una serie de inconvenientes, siendo los más citados: la aparición de resistencias por parte de *Varroa*, la persistencia de residuos químicos en los productos de las abejas, y la inexistencia de un tratamiento capaz de erradicar al parásito de las colmenas (revisión de Milani 1999; Wallner 1999; Bogdanov 2006). Por todo ello han surgido recientemente nuevas líneas de investigación encaminadas hacia la selección de colonias de abejas resistentes al parásito, al tiempo que se intentan caracterizar los genes relacionados con esta mayor tolerancia a *Varroa*.

La tolerancia de *A. mellifera* a la varroosis está siendo estudiada actualmente mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o q-PCR, siendo el antecedente más reciente a este trabajo el realizado por Navajas *et al.* (2008), en el cual se analizaban diferencias de expresión génica, relacionadas con la infestación por *V. destructor* en la subespecie de abeja *A. m. mellifera*. El resultado de este estudio fue una lista de 148 genes cuya expresión variaba de forma significativa bien por el parasitismo de *Varroa*, que causaba cambios de expresión en genes relacionados con el desarrollo embrionario, metabolismo de la célula e inmunidad, o bien por el genotipo (sensible-tolerante) de la abeja, que se caracterizaba por presentar expresión diferencial en genes relacionados con el desarrollo neuronal, sensibilidad neuronal y olfato. Estos datos apuntan hacia la importancia de los aspectos relativos al comportamiento en la tolerancia de *A. mellifera* a *Varroa*, y sugieren el interés de un estudio centrado en el cerebro de la abeja.

De todos los genes que presentaron expresión diferencial, cuatro y un control endógeno fueron seleccionados por Navajas *et al.* por su conveniencia para la cuantificación de niveles de expresión mediante qPCR en *A. m. mellifera*. En el presente trabajo, partiendo de la hipótesis de que los genes seleccionados por Navajas *et al.* (2008) por presentar expresión diferencial en *A. m. mellifera* presentarán también expresión diferencial en *A. m. iberiensis*, se ha diseñado una puesta a punto de la técnica de qPCR para la realización de futuros

estudios de cuantificación relativa de la expresión en la abeja ibérica de la miel.

Material y Métodos.

Material biológico: Para este estudio fueron colectadas muestras de abejas de la subespecie *A. m. iberiensis* de dos tipos de colonias diferentes: colonias tolerantes a *Varroa*, pertenecientes a las colmenas seleccionadas en la Universidad de Córdoba por presentar resistencia al parásito, sobreviviendo a éste sin tratamiento, y colmenas sensibles o no seleccionadas tratadas con Checkmite® pertenecientes al grupo de investigación “Filogenia y Evolución Animal” de la Universidad de Murcia. En ambos casos, las muestras consistieron en pupas blancas de ojos azules, parasitadas y no-parasitadas. Sin embargo el método de conservación fue distinto, consistiendo en inmersión directa de las muestras vivas en solución de *RNA-later* para el primer grupo, e inmersión en nitrógeno líquido y mantenimiento a -80°C, sin romper la cadena de frío, para el segundo.

Metodología: La metodología seguida consistió, en primer lugar, en la extracción de ARN a partir de *pools* de tejido cerebral de hasta 8 pupas, siguiendo el protocolo de extracción de ARN de tejidos del *RNeasy Protect Mini Kit* (QIAGEN). La pureza y concentración del ARN extraído fue determinada mediante Nanodrop, y su calidad verificada por electroforesis en 1,2% gel de agarosa. Las soluciones de ARN total obtenidas de este proceso fueron tratadas entonces con la enzima *TURBO DNase* del *Kit TURBO DNA-free™* (Applied Biosystems) para la eliminación de posible contaminación remanente por ADN genómico. A partir del ARN ya purificado, se pasó a la síntesis de la cadena complementaria de ADN mediante enzima transcriptasa inversa del *Kit* comercial *QuantiTect® Reverse Transcription*. Y finalmente, utilizando como molde las moléculas de ADNc obtenidas en el proceso anterior, se realizó el análisis para la cuantificación de la expresión genes en el equipo de qPCR, *7500 Real Time PCR System* de Applied Biosystems. Para dicho análisis fueron utilizados los cuatro cebadores específicos y el control endógeno descritos en Navajas *et al.* (2008).

En cada análisis se realizaron diluciones seriadas de las muestras de ADNc y dos réplicas de cada reacción, incluyendo controles o NTCs (pocillos sin ADN). Las concentraciones del ADN de partida y de los cebadores fueron variadas en cada ocasión, con el fin de poder establecer el rango dinámico óptimo de trabajo. El volumen total de reacción fue de 20 µl, consistiendo la mezcla en: 10 µl del marcador fluorescente *SYBR® Green I*, 2 µl del par de cebadores, *forward* y *reverse* (entre 50nM y 500nM), 1 µl a 4 µl de ADNc y H₂O libre de nucleasas. Con los datos resultantes del análisis, fueron obtenidas las curvas estándar de cada gen estudiado, y calculadas sus eficiencias de reacción a partir de las pendientes de dichas curva, según la fórmula $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$.

Resultados y discusión.

De los dos grupos de muestras analizadas, abejas conservadas en el reactivo *RNA-later* y abejas congeladas en nitrógeno líquido, el primero de ellos dio peores resultados en los análisis de qPCR, no pudiendo finalmente servir para la optimización de la técnica debido al alto grado de degradación que presentaban las moléculas de ARN extraído, resultado probablemente, de una incorrecta fijación del material mediante este reactivo y a la elevada sensibilidad de la molécula de ARN a la degradación por nucleasas.

Las dificultades detectadas en el primer bloque de experimentos, fueron subsanadas en el segundo con muestras tratadas directamente con nitrógeno líquido para su conservación. Los resultados obtenidos en las distintas pruebas de qPCR han confirmado la validez de los genes Hr78, GB 18554 y Alh para estudios de expresión génica en *A. m. iberiensis*, habiendo sido optimizadas las condiciones de PCR de los mismos y obteniéndose eficiencias de reacción para cada uno de ellos de 99,6%, 99,9% y 98% respectivamente.

Para la optimización del control endógeno propuesto por Navajas (Krh I) se encontraron dificultades por la continua formación de dímeros entre sus cebadores, lo cual nos lleva a recomendar el uso de un endógeno diferente para estudios de este tipo, proponiendo la proteína ribosomal 49 (rp49), citada por su idoneidad, como gen para la normalización de análisis de qPCR en *A. mellifera* (Lourenço *et al.* 2008) y para la que se han obtenido eficiencias superiores al 98% en este estudio. El gen baz (GB 10346), por su parte, no presentó amplificación en ninguna de las pruebas realizadas, lo que sugiere la existencia de diferencias genéticas para este gen entre las dos subespecies de abeja melífera.

Conclusiones.

En este estudio ha podido ser testada la idoneidad y optimizada las condiciones de qPCR de tres de los genes usados por Navajas *et al.* (2008), para la realización de futuros estudios de cuantificación relativa de la expresión diferencial en *A. m. iberiensis*. También se ha sugerido en base a los resultados, el uso del gen rp49 como alternativa más apropiada de control endógeno en experimentos de PCR cuantitativa, frente al gen Krh I propuesto en el estudio de Navajas *et al.* (2008). Entre los dos métodos utilizados para la fijación y conservación del ARN en las muestras, reactivo *RNA-later* y congelación por nitrógeno líquido, se ha comprobado que el segundo es un método más adecuado para este fin. Este estudio supone el primer paso hacia el análisis de la expresión diferencial de genes involucrados en procesos de tolerancia a *Varroa* en poblaciones de abeja melífera de la península Ibérica.

Referencias.

- Anderson D. y Trueman J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. App. Acarology*, 24: 165-189.
- Bogdanov S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37: 1-18.

- Burgett M, Rucker R.R, Thurman W.N. (2004). Economics and honey bee pollination markets. *Am. Bee J.*, 144: 269-271.
- Consortium HGS. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443: 931-949.
- Delaplane K.S., Mayer D.F. (2000). Crop pollination by bees. CAB, New York.
- Fries I., Camazine S. y Sneyd J. (1994). Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World*, 75: 5-28.
- Gregory P.G, Evans J.D, Rinderer T.E, De Gruzman L. (2005). Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *J. Insect Scien.*, 5: 1-5.
- Le Conte Y., De Vaublanc G., Crauser D., Jeanne F., Rousselle J. C. y Bécard JM. (2007). Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie*, 38: 566–572.
- Lourenço A. P., Mackert A., Cristino A., Simoes Z.L.P. (2008). Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39: 372-385.
- Milani N. (1999). The resistance of *Varroa Jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*, 30: 229-234.
- Moritz F. A. (1985). Heritability of the postcapping stage in *Apis mellifera* and its relation to varroaosis resistance. *J. Heredity*, 76: 267-270.
- Navajas M., Migeon A., Alaux C., Martin-Magniette M. L., Robinson G. E., Evans J. D., Cros- Arteil S., Crauser D. y Le Conte Y. (2008). Differential gene expression of the Money bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics*, 9: 301.
- Potts S.G., Roberts S.P.M., Dean R., Marris G., Brown M., Jones R., Neumann P., Settele J. (2010). Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.*, 49: 15–22.
- Sammataro D., Gerson U. y Needham G. (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 519-548.
- Seeley T. D. (2007). Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies resisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie*, 38: 19-29.
- Wallner K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30: 235-248.
- Wood M., Hardin B. y Lee J. (1999). *Varroa*-tolerant bees keep hives buzzing. *Agr. Res. Mag.*, 47: 10-12.

El potencial valor económico de los polinizadores en cultivos. Reflexión tras comparación con otros países.

J. Gil Gómez. Málaga. Correo electrónico: apimieles@gmail.com

Abstract.

Honey bees (*Apis mellifera*) and other pollinators make vital contributions to agriculture and the environment through the pollination of cultivated crops and wild plants. The decline of pollinator populations, has now been clearly documented in several areas of the world, due to several factors, mainly is due to excessive use of pesticide. So it is necessary the introduction of pollinators, it has great impact on other countries, but it has still a minority interest in Spain.

Introducción.

Tras un análisis de diversos artículos y estudios sobre la polinización, la razón principal de este trabajo es realizar algunas reflexiones acerca de la importancia de los polinizadores en el medio ambiente, en especial de la especie *Apis mellifera* y definir posibles estrategias para su difusión. Además se indica una aproximación del potencial mercado de la polinización en los distintos cultivos del sur de España, comparándolo a su vez con otras regiones del mundo, donde el valor de una colmena de polinización llega a superar los 100 €, como es el caso de la introducción de colmenas en los cultivos de almendras de EEUU. También es de destacar que España siendo el segundo productor mundial de almendra, por detrás de EEUU, no tiene esa importancia, y en raras ocasiones se llega a pagar 10-15 €, siendo el incremento por algunos investigadores considerados de 1000 euros (Egea Caballero, J., 2010).

Material y Métodos.

Se ha consultado la bibliografía citada en el apartado de Referencias perteneciente a asociaciones de apicultores, investigadores y apicultores de diversas nacionalidades.

Resultados y Discusión.

El valor económico de la polinización en el mundo alcanza los 153 mil millones de euros y representa el 9,5 % del valor del valor de producción agrícola para la alimentación humana del 2005.

La importancia de la abeja melífera dentro de los polinizadores es fundamental ya que el 80% de las plantas cultivadas son polinizadas por la abeja melífera, a ella se suma cooperación de 20000 especies de abejas silvestres en todo el mundo.

Como ejemplo de cultivo importante para su polinización mediante abejas, cabe destacar el valor de la abeja en el cultivo del almendro, mostrando la

diferencia entre EEUU y España. Lo primero mencionar que para una buena polinización los científicos recomiendan de 5 a 8 colmenas por hectáreas, siendo el incremento del rendimiento sobre la producción considerado de 1000 € por cada colmena introducida.

Caso de EEUU

Es el 1º productor de almendras, con el 80 % de la producción mundial.

En California existe aproximadamente una superficie de 300.000 hectáreas, siendo necesarias según recomendaciones 1 millón y medio de colmenas

El valor del alquiler de una colmena en EEUU (Trayner, J. 2007) es:

- En 1973, aproximadamente 10 €
- En 2007, el valor del alquiler ha sido superior a 100 €

Caso de España

Es la 2º productora con aproximadamente 550.000 hectáreas, siendo necesarias según recomendaciones 2.750.000 colmenas.

En Málaga 20.000 Has., siendo necesarias según recomendación, 100.000 colmenas.

Actualmente, en España en las raras ocasiones que el agricultor pague por el alquiler, el valor de una colmena es de 10-15 € (Egea, J. 2010).

También es destacable la situación en otros países, actualmente las polinizaciones en Chile constituyen más del 50% de los ingresos de los apicultores, todos los años la demanda supera la oferta. En el año 2006 se generaron entre 9 y 15 millones de dólares de ganancia en polinización con abejas, utilizándose ese año cerca de 250 mil colmenas. Solo en la Región de Valparaíso, en el año 2007 se usaron 169 mil colmenas para polinización, sobre una superficie de 17 mil hectáreas de almendros, arándanos, cerezos, ciruelos, manzanos, perales, aguacates, kiwis y frambuesas.

En Nueva Zelanda se ha incrementado en 15 años su demanda de colmenas de abejas para kiwi, en un 5.000%, las cuales son administradas por servicios profesionales de polinización.

Como podemos apreciar la polinización es una actividad rentable y en crecimiento, no solo en los países anteriores, cada vez la importancia de la polinización se expande por distintas regiones. El aumento en el número de colmenas rentadas para polinizar cultivos, está supeditado en buena medida a la promoción y concienciación de los agricultores sobre las ventajas que ello representa, inducción que puede ser impulsada por los propios apicultores con el apoyo del sector oficial y un mayor número de estudios científicos sobre la materia que demuestren aún más claro su importancia.

Algunas posibles prácticas para incrementar la percepción social de la importancia de la abeja se indican a continuación:

- Crear un registro de polinizadores, similar al del continente americano (<http://pollinators.iabin.net/>), que en un futuro pueda poner en contacto a los agricultores que lo demanden con los apicultores que se oferten.

- Mayor investigación sobre polinización. Abriendo líneas de investigación que den lugar a mayor información sobre el tema, destacan en este aspecto los países de Iberoamérica y EEUU, donde además de diversas tesis sobre la materia, existen congresos de polinización. También fue de gran importancia el Congreso Mundial de Apicultura celebrado en Montpellier (Francia) en 2009, donde el lema fue, “La abeja: Centinela del Medio Ambiente”.

- Difusión de la apicultura en jornadas, ferias, colegios o museos, resaltando la labor de las distintas asociaciones de apicultores, próximamente destaca por su nivel de interactividad el futuro Museo de la Miel de Málaga.

- Acercamiento de la apicultura en la ciudad, destaca la ciudad de Londres, donde la Asociación de Apicultores de Londres agrupa a más de 500 miembros, incrementándose cada año el número debido a su labor de difusión y al apoyo de la administración.

A continuación se describen posibles estrategias a tomar por parte de la administración para aumentar la percepción social sobre la importancia de los polinizadores, aumentando el apoyo al sector apícola:

- Mayor soporte a la Iniciativa Internacional sobre Polinizadores, cuyo página web es, www.internationalpollinatorsinitiative.org. Iniciativa creada en el año 2000, en la Convención sobre Diversidad Biológica de la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (F.A.O.).

- Legalización de la apicultura urbana en España, al igual que existe en otras regiones de Europa, como Reino Unido, Francia y Alemania. En EEUU, destaca las colmenas en Nueva York en la Casa Blanca, propiedad de Michelle Obama, que ha difundido a través de los medios de comunicación, la apicultura urbana a nivel mundial.

- Aumento del número de asentamientos en los montes públicos de los existentes, minoritarios en Andalucía en comparación con la superficie existente, con lo que beneficiaría al mantenimiento de la vegetación y a su vez disminuiría la competencia de los apicultores por los asentamientos, provocando que las colmenas no se instalen gratis o a bajo precio, afectando negativamente a los apicultores dedicados a la polinización

- Recuperar la declaración de un día de la abeja a nivel nacional, como ocurre en EEUU (<http://www.nhbad.com/>) y tal como existió en España.

Conclusiones.

Es necesaria una mayor difusión de los beneficios generados por la apicultura, por los medios descritos anteriormente, tanto para aumentar la percepción social de dichos beneficios y posibilitar en un futuro la apicultura urbana, tal como ocurre en otras regiones como puede ser Reino Unido, Francia, o Alemania. También es necesario para que a nivel de la agricultura la polinización mediante colmenas sea demandada y genere unos beneficios al apicultor, hasta ahora no obtenidos o con pequeño margen por el apicultor en España, en comparación con otros países.

Referencias.

- A contribution to the International Initiative for the conservation and sustainable use of pollinators. F.A.O., 2008.
- Benjamin, A. and Mccallum, B. 2009. A world without bees. 304 pp.
- Bradbear, N. 2009. Bees and their role in forest livelihoods. F.A.O.
- Byrne, A. and Fitzpatrick, U. Bee conservation policy at the global, regional and national levels. 2009. Apidologie, 40.
- Egea Caballero, J. 2010. La polinización en el almendro. Jornadas técnicas de frutos secos.
- Gallai, N. et al. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecological Economics, 68, 3, 810-821.
- Trayner, J. 2007. The almond and the bee.
http://articles.sfgate.com/2007-10-14/living/17265958_1_california-almonds-almond-growers-almond-trees/2

Agradecimientos.

A mi familia por acercarme al mundo de las abejas. Este trabajo ha sido realizado como agradecimiento a los apicultores, que realizan una labor medioambiental, a veces poco reconocida. Agradezco también la colaboración del departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga y a la Asociación Malagueña de Apicultores por el acceso a las publicaciones de su biblioteca y también a la Asociación de Apicultores de Londres por su colaboración en el Reino Unido.



Figura 1. Colmenas en azotea de aparcamiento de Hotel 4* Lancaster London (Londres)

La apicultura como herramienta de desarrollo. Proyecto *Bee Honey*

J. Rovira. Correo electrónico: jorge@bee-honey.org.

Resumen.

La apicultura constituye una herramienta especialmente indicada para el desarrollo de comunidades desfavorecidas. En este sentido, existen diversas organizaciones en varios países europeos que se dedican específicamente a la implantación y seguimiento de proyectos de desarrollo basados en la apicultura en países del Sur. Especialmente interesantes son los proyectos que vienen desarrollándose en el África subsahariana. Algunas de estas organizaciones han constituido un grupo de trabajo, originado en Bruselas en marzo de 2010, y cuyo objetivo principal es la potenciación de la apicultura como herramienta de desarrollo a nivel mundial. La organización *Bee Honey* forma parte de este grupo de trabajo, que cuenta con el apoyo de organizaciones internacionales de primer orden, como Apimondia o la FAO.

Aunque estos proyectos cuentan con la comercialización de su producción apícola en el mercado local de la miel, cada vez más organizaciones piensan que la apertura a los mercados internacionales supondría, sin duda, un salto cualitativo en estos proyectos con una incidencia sensible en la capacidad de generación de ingresos de estas comunidades y, por tanto, en su calidad de vida. En este escenario, *Bee Honey* se plantea como un proyecto que pretende proporcionar un canal comercial en los países occidentales a estas iniciativas de desarrollo.

Aún basándose en la importación de miel, existen sinergias evidentes entre el proyecto *Bee Honey* y el sector apícola nacional. Su política de marketing y comunicación destaca el papel que representa la apicultura tanto en la conservación del medioambiente como en el desarrollo humano en general. Cualquier iniciativa enfocada en destacar el rol de las abejas y la apicultura en la naturaleza, así como las que subrayan los aspectos más saludables del consumo de la miel contribuyen, sin duda, a la consolidación de una imagen favorable de los productos apícolas y tienden a incrementar el consumo de los mismos.

Apicultura y desarrollo.

La apicultura constituye una herramienta especialmente indicada para el desarrollo de comunidades desfavorecidas en zonas rurales de países en vías de desarrollo. Existen una serie de motivos que corroboran este hecho:

- Permite generar ingresos a personas pobres, sin tierra, en entornos rurales, incluso dentro de reservas naturales.
- Proporciona importantes suplementos nutricionales a las dietas locales, mejorando la seguridad alimentaria.
- Es una actividad apta para hombres y mujeres por igual.

- Potencia el desarrollo rural, incluidas la creación de pequeñas empresas, dedicadas a la producción de equipo apícola (colmenas, trajes de apicultura, centrifugadoras, etc.) y la transformación de los productos apícolas (miel, bebidas, velas, cosméticos, etc.).
- Garantiza la disponibilidad permanente de remedios naturales requeridos para la atención sanitaria local (apiterapia).
- Puede disminuir las migraciones del campo a la ciudad, luchando contra la despoblación rural y mitigando la sobrepoblación urbana.
- Contribuye a aumentar la polinización y, de esta forma, mejorar la calidad y cantidad de producción de frutas y semillas.
- Contribuye al mantenimiento de la biodiversidad y preservación de hábitats naturales mediante políticas de ordenación del territorio que evitan la tala de árboles en los que anidan las abejas.

Experiencias existentes.

Existen diversas organizaciones que, conscientes de este potencial, trabajan desde hace varios años en la implantación y seguimiento de proyectos de desarrollo basados en la apicultura en países del Sur.

Algunas organizaciones ya consolidadas que desarrollan esta actividad de forma específica son:

- Miel Maya Honing (www.maya.be).
- Apiflordev (www.apiflordev.org).
- Bee Support (www.beesupport.com).
- Bees for Development (www.beesfordevelopment.org).
- Hives Save Lives (www.hivessavelifes.com).

En función de sus particularidades, desarrollan su actividad de apoyo a la apicultura de diferentes modos:

- Formación en técnicas apícolas.
- Asesoramiento a organizaciones locales.
- Gestión de proyectos de implantación de explotaciones apícolas
- Investigación.
- Gestión del conocimiento en la materia gestionando bases de datos en apicultura.
- Divulgación a través de publicaciones periódicas.
- Publicación de informes y estudios en la materia.

Algunos de estos proyectos han logrado resultados realmente alentadores. A nivel de ejemplo:

- Miel Maya Honing trabaja en México y Guatemala con 7 cooperativas locales, mediante el apoyo técnico y financiero en la implantación de explotaciones apícolas. El inicio de la actividad data de 1975, es decir, hace 35 años. Actualmente, varias de las mieles producidas en estas explotaciones disponen de la certificación FLO de Comercio Justo. Miel Maya Honing cuenta con una filial comercial que se dedica a la comercialización de la miel en diversos países europeos. Desde este mismo año 2010, esta miel ya está

disponible en España en diversos establecimientos de Comercio Justo. La cuota de mercado de estas mieles en Europa es pequeña, sin embargo, el impacto social de su comercialización es enorme: las 7 cooperativas productoras cuentan con un total de más de 400 pequeños apicultores, lo que significa que hay 400 familias que dependen de esta actividad.

- Apiflordev desarrolla su actividad, en países africanos, en base a la implantación de proyectos integrales, partiendo de la formación y capacitación en técnicas modernas de apicultura, organización del colectivo u asociación y el apoyo en los procesos de envasado y comercialización de la miel, ya sea en mercados locales, nacionales o internacionales.

- Bee Support, apoya financiera y técnicamente la implantación de proyectos locales de apicultura en países africanos. Actualmente cuenta con proyectos en Kenya y Zimbabwe.

- Bees for Development cuenta con una de las mayores bases de datos sobre estudios e informes en materia de apicultura y desarrollo, de libre acceso por internet. Además cuenta con una publicación trimestral especializada de la que ya ha publicado 95 números. Fundada en 1993.

En definitiva, el potencial de la apicultura como una herramienta de transformación económica y social de pequeñas comunidades en países en desarrollo es un hecho totalmente contrastado por la experiencia.

Iniciativa de asociación internacional.

Este mismo año, algunas de estas organizaciones y otras que comparten los mismos intereses han constituido un grupo de trabajo, cuyo objetivo principal es la potenciación de la apicultura como herramienta de desarrollo a nivel mundial. Este grupo se origina en Bruselas en marzo de 2010, dentro del Congreso “Beekeeping and Development”, organizado por Miel Maya y Apiflordev. Desde su origen cuenta con el apoyo de organizaciones internacionales de primer orden, como Apimondia. *Bee Honey* también forma parte de este grupo de trabajo y, como tal, es una organización signataria de su manifiesto de intenciones fundacional.

Los objetivos que se fija el grupo de trabajo de forma específica son:

a. Generar una mayor conciencia entre los gobiernos y las organizaciones no gubernamentales a fin de que la apicultura se convierta en una herramienta versátil en el desarrollo rural así como una actividad comercial seria y un medio de subsistencia.

b. Facilitar el intercambio de información e informar sobre el impacto de la apicultura en la calidad y la seguridad alimentaria y el desarrollo rural, mediante la generación de materiales de información y comunicados de prensa.

c. Facilitar el acceso al conocimiento de las capacidades, experiencias y recursos.

d. Construir una red abierta de iniciativas para el desarrollo de la apicultura, a nivel nacional e internacional, tanto en el hemisferio norte como en el sur.

La apertura a la exportación.

Dentro de las áreas de trabajo de este grupo, se trata de forma específica el estudio de los mercados y la comercialización de la miel producida. Aunque estos proyectos cuentan con la comercialización de su producción apícola en el mercado local de la miel, cada vez más organizaciones piensan que la apertura a los mercados internacionales supondría, sin duda, un salto cualitativo en estos proyectos con una incidencia sensible en la capacidad de generación de ingresos de estas comunidades y, por tanto, en su calidad de vida. Es un aspecto a analizar con cuidado y estudiando todos los impactos que una actividad de este tipo puede generar en las comunidades productoras, pero que, sin duda, abre un mundo de retos y oportunidades que conviene valorar:

- Necesidad de implantar procesos de mejora de la actividad apícola. Las exigencias de calidad y control de la seguridad alimentaria de los mercados internacionales suponen un reto de modernización de algunas de las prácticas actuales. Es altamente recomendable que este proceso no se realice a costa de aquellas técnicas o valores tradicionales que proporcionen un valor añadido al producto en cuestión.

- Organización comunitaria de la actividad. La apertura a mercados internacionales supone algunos costes asociados (certificados de calidad, costes de transporte, controles sanitarios, etc.) que sólo pueden hacerse frente de forma eficiente bajo formas colectivas de organización de la actividad: cooperativas, asociaciones, etc. Este hecho permite reforzar el tejido asociativo de la sociedad productora local.

- Adaptación a normativas internacionales. En el caso europeo, la miel, como producto de origen animal, debe cumplir con la normativa Comunitaria en relación con este tipo de productos. En este sentido, y en relación con la miel, los países productores deben desplegar un sistema de control que garantice, básicamente, la ausencia de residuos de antibióticos en la miel (Directiva 96/23/CE del Consejo Europeo). Esta normativa se está mostrando especialmente difícil de cumplir en los países africanos por la dificultad económica de desplegar el dispositivo de control. Paradójicamente, África es posiblemente el continente donde menor utilización de antibióticos para las abejas se utilizan, incompatibles con sus técnicas tradicionales de apicultura basadas en la recolección y no en su explotación en colmenas modernas.

- Conveniencia de ganar la confianza del mercado en base a la obtención de sellos de garantía de Comercio Justo. No todos los proyectos de

desarrollo disponen de una certificación del cumplimiento de los estándares de responsabilidad social y ambiental que están asociados al Comercio Justo. Ello no quiere decir siempre que no se trate de proyectos perfectamente sostenibles, tanto desde el punto de vista social como ambiental, sino que, en muchas ocasiones, los requerimientos administrativos suponen una barrera para la obtención de la certificación, aunque se cumplan buena parte de sus requisitos.

El proyecto *Bee Honey*.

En este escenario, *Bee Honey* se plantea como un emprendimiento social que pretende proporcionar un canal comercial en los países occidentales a estas iniciativas de desarrollo. El principal rasgo innovador del proyecto radica en abordar una misión de carácter totalmente social desde un modelo de negocio propio de la economía de mercado, pero sin ánimo de lucro.

La misión de *Bee Honey* es mejorar notablemente las condiciones de vida de comunidades y personas en situación de pobreza a través del comercio justo de la miel.

A futuro, vemos *Bee Honey* como una referencia social en la venta de miel en los mercados de los países desarrollados mediante una propuesta comercial atractiva, sofisticada y novedosa, cuyos beneficios estarán destinados íntegramente a la generación de oportunidades de desarrollo entre las comunidades más necesitadas.

A corto plazo *Bee Honey* pretende ser un canal de comercialización de miel de comunidades que ya la están produciendo y comercializando en la actualidad.

A medio y largo plazo, la propuesta consiste en la promoción directa de nuevos proyectos de desarrollo de la mano de las organizaciones que tienen la experiencia suficiente para implantarlos con éxito.

En la actualidad, *Bee Honey* se encuentra próxima a comercializar las primeras referencias de mieles (se espera el arranque de la actividad comercial antes de finalizar 2010). Las primeras referencias serán 4 tipos de miel procedentes de México y Guatemala.

Al margen de su actividad comercial, *Bee Honey* pretende desarrollar una actividad pedagógica importante sobre los beneficios de la apicultura y del consumo de miel. Para ello, dispone en la actualidad de un blog en internet donde publica informaciones, recetas, artículos y de un perfil en Facebook, referencia de las redes sociales, donde pretende establecer una comunidad de personas interesadas por el proyecto y por el mundo de la miel en general. Está previsto lanzar en breve un portal corporativo y una tienda online en la que poder adquirir los productos comercializados.

***Bee Honey* en el marco apícola nacional.**

Aún basándose en la importación de miel, existen sinergias importantes entre el proyecto *Bee Honey* y el sector apícola nacional. Su política de marketing y comunicación destaca el papel que representa la apicultura tanto en la

conservación del medioambiente como en el desarrollo humano en general. Cualquier iniciativa enfocada en destacar el rol de las abejas y la apicultura en la naturaleza, así como las que subrayan los aspectos más saludables del consumo de la miel contribuyen, sin duda, a la consolidación de una imagen favorable de los productos apícolas y tienden a incrementar el consumo de los mismos.

La tendencia actual de los consumidores hacia alimentos saludables, orgánicos y de cultivo sostenible posiciona a la miel como un producto atractivo y con un crecimiento de consumo potencial importante. Una buena gestión de la comunicación de estos factores ha de fomentar, sin duda, un crecimiento del mercado. El proyecto *Bee Honey* pretende aportar su grano de arena en este sentido tratando de poner en valor todos los aspectos sociales y ambientales vinculados al mundo de la miel.

En resumen, el proyecto *Bee Honey* pretende colaborar con organizaciones de desarrollo de sobrada y contrastada experiencia en el proceso de comercialización de la miel producida y, al mismo tiempo, jugar un papel pedagógico sobre los valores sociales y ambientales asociados a la apicultura como actividad y a la miel como producto alimentario.

Actividades de apicultura con escolares en los *Camps D'Aprenentatge de Les Illes Balears*.

A. Bibiloni Canyelles, J. Ferrer Ferrer, P. Villa Álvarez, P. Bibiloni Jaume, V. Torres Marí, J. Gornes Ametller, A. Isern Amengual.

Camps D'Aprenentatge Son Ferriol, Av. del Cid Km 1,4 Son Ferriol, Palma de Mallorca. CP 07198.

Summary.

This project describes the way in which three camps d'aprenentatge de les Illes Balears (school workshops), where activities only for schoolchildren are carried out, have introduced bee-keeping in their formative offer. The program of activities expects to make the world of bee-keeping known, working aspects related to environmental education and the knowledge of the surroundings, especially the agricultural and rural ones, and to make the children aware of the importance that bees have in the preservation of ecosystems. The educational approaches are presented, and also the activities which are made and the results obtained.

Introducción.

Los *camps d'aprenentatge (CdA) de les Illes Balears* son centros educativos públicos que dependen de la *Conselleria d'Educació i Cultura del Govern de les Illes Balears*. Forman una red integrada por 7 equipamientos (3 en Mallorca, 2 en Menorca, 1 en Ibiza y 1 en Formentera). En ellos se realizan actividades de conocimiento del entorno y de educación ambiental dirigidas a alumnos de centros educativos no universitarios.

En octubre del año 2001 la asociación de apicultores de Ibiza y Formentera, ante la situación precaria en que se encontraba la apicultura en la isla y la avanzada edad de los apicultores, propuso a los responsables del *CdA Sa Cala* incorporar la apicultura en su oferta de actividades. Se presentó la propuesta para grupos escolares a partir de quinto curso de educación primaria; la acogida fue muy buena y durante el primer año realizaron la actividad de apicultura 17 centros. El curso 2003-2004 el *CdA Son Ferriol* de Mallorca amplió su oferta de actividades con los talleres de apicultura, y el 2009-2010 lo hizo el *CdA es Pinaret* de Menorca.

Objetivos generales del programa de actividades de apicultura:

*Contribuir en la difusión de los conocimientos del mundo de las abejas y de la apicultura.

*Ofrecer a los centros escolares propuestas de trabajo referentes a educación ambiental que, partiendo del estudio de las abejas y la apicultura, ayuden a desarrollar habilidades y actitudes en favor del medio.

*Facilitar el conocimiento del entorno rural a través de la apicultura y de su relación con la agricultura, ganadería y alimentación humana.

*Sensibilizar a los usuarios, profesorado y alumnado, de la importante función que desarrollan las abejas en la sostenibilidad del ecosistema.

Las actividades que se realizan en cada uno de los CdA varía en función de sus características y las de su entorno. En Ibiza y Menorca se puede pernoctar en las instalaciones y realizar actividades de mañana y tarde por un periodo de más de un día, en cambio en Mallorca la estancia es de un solo día y en horario de mañana. Las plantillas únicamente están compuestas por personal docente (maestros de escuela pública) y realizan tanto las actividades con alumnos como las de gestión de las instalaciones.

	CdA sa Cala. Ibiza.	CdA Son Ferriol. Mallorca.	CdA es Pinaret. Menorca.
Plantilla.	2	3	2
Grupos* por día.	1.	2.	1.
Horario.	2 días.	1 día	2 días.
Equipamiento.	Aula apícola, 10 colmenas Langstroth, 2 colmenas de observación.	Aula apícola, 15 colmenas Langstroth, 2 colmenas de observación.	Aula apícola, 7 colmenas Langstroth, 1 colmena de observación.

* 25 alumnos aprox.

El funcionamiento coordinado de la red de *Camps d'aprenentatge de les Illes Balears* ha hecho posible que el desarrollo de las actividades de apicultura en cada una de las islas siga el mismo patrón. Entre los equipos docentes se han compartido objetivos, experiencias y material didáctico. Debido a esta coordinación también son similares el proceso de inscripción y la preparación de la visita. Como tarea previa a la visita se tiene una entrevista con el profesor o profesora del grupo, para acordar los contenidos y para proporcionarle material (un documental en DVD y material impreso).

Planteamiento didáctico.

Se pretende ayudar a los alumnos en su proceso de construcción de un modelo de abeja como ser vivo y de la idea de apicultura. Estas propuestas huyen de los enfoques tradicionales en la enseñanza de los seres vivos (Garrido y Martínez 2009) basados en actividades de exclusiva descripción morfológica y/o de clasificaciones sistemáticas. Las tareas propuestas abordan el estudio en base a la interrelación de las abejas con el medio, partiendo de siete ideas básicas:

a) Las abejas, como cualquier otro ser vivo, se adaptan al medio y evolucionan. Hablamos entonces de: coevolución, razas, longitud de la lengua, relación huésped y parásito, evolución de plantas entomófilas... .

b) Las abejas sufren cambios a lo largo de su vida. También el proceso evolutivo implica un cambio. Es importante transmitir esta idea y relacionarla con los cambios que provocan en el medio. Nos referimos entonces a la metamorfosis, a los efectos de la polinización... .

c) La actividad vital de las abejas les genera la necesidad de conseguir materia del entorno para obtener energía y para formar su propio cuerpo. En base a esta necesidad trabajamos la nutrición, la recolección de materias y la idea de sustancia recogida y de sustancia elaborada, la miel, el polen apícola... .

d) La reproducción de las abejas tiene por finalidad perpetuar la especie. Construimos la idea de la reproducción a partir del fenómeno de la enjambrazón y los factores condicionantes. De aquí surge la discusión de la transmisión genética, el papel de uno o dos progenitores, el fenómeno de la partenogénesis, la apicultura entendida como técnica de criar abejas, reina de enjambrazón y reina de emergencia... .

e) Las abejas se relacionan con el medio, reciben y transmiten información, tienen unas características y un comportamiento para dar respuesta a los distintos estímulos recibidos. Esto queda de manifiesto con el manejo de los enjambres, con la interpretación de la danza de las abejas, con el estudio de la flora melífera... .

f) Es muy importante no acudir al modelo social humano para explicar la vida de las abejas, deben superarse afirmaciones del tipo “las abejas trabajan para su reina”, o confundir al alumnado con valoraciones como las que tradicionalmente se hacen de los zánganos aludiendo a su vagancia.

g) El papel que las abejas juegan en el equilibrio de la naturaleza lo determina en gran parte la práctica de la apicultura. Es necesaria una reflexión sobre aspectos como el efecto de la concentración de abejas en una zona (Boi, Lladó, Llorens 2008), la introducción de razas y su posterior hibridación o bien la introducción de especies botánicas y su relación con los polinizadores (Bartomeus 2009), los efectos que provocan en el entorno la contaminación, el cambio climático y la actividad humana.

Las actividades:

- Visita al apiario: con el equipamiento de apicultor se visita el apiario, abriendo las colmenas y manipulando los panales. La observación es guiada con el fin de detectar todos aquellos fenómenos propios del enjambre en la época en que se realiza la visita: reconocimiento de las castas de individuos, de los distintos estadios del ciclo vital de las abejas, almacenamiento de miel y polen y su distribución en la colmena, los panales... Resulta imprescindible hacer observar las conductas del apicultor y su relación con la respuesta esperada en las abejas, así como los elementos de seguridad en el trabajo, el equipamiento y las herramientas. Se trata de una actividad muy rica en emociones y cargada de vivencias, entra más por la vía de los sentimientos que no por la vía de la razón. Con ella resulta fácil conseguir un grado de sensibilización positiva hacia las abejas y su mundo. También se experimentan

y valoran aspectos tan importantes en la apicultura como son la maestría en el manejo de las colmenas, los elementos técnicos y lo interesante que resulta la interacción insecto-ser humano.

- Sesión en el aula apícola: se ponen a disposición del alumnado las colmenas de observación, una guía de campo que facilita su interpretación y muestras de material apícola. Partiendo de las experiencias y conocimientos previos los alumnos van indagando en los aspectos que más interesan. La sesión gira en torno a dos ejes: en primer lugar la abeja desde el punto de vista de la entomología, profundizando en el estudio del insecto social, y en segundo lugar la apicultura como técnica de criar abejas para la obtención de distintos productos, los procesos de obtención y elaboración tanto por parte del apicultor como de las abejas. El trabajo en el aula apícola permite el completo y sistemático desarrollo de los distintos contenidos. Es una actividad a veces complementaria de la visita al apiario y casi siempre imprescindible puesto que durante la visita, con la colmena abierta y los alumnos vestidos de apicultores, se hace difícil prolongar las explicaciones.

- Cata de miel: Se realiza el análisis sensorial (Pajuelo 2004) de cuatro mieles monoflorales, aprendiendo a distinguir el color, la humedad, el tacto, el aroma y el gusto, como características determinadas por su origen botánico (Boi, Lladó, Llorens 2008), por la época de extracción y por los cambios que sufre en su elaboración y procesado. Se muestran las habilidades básicas de interpretación sensorial necesarias para poder apreciarlas. La humedad también se mide con un refractómetro, introduciendo así el análisis físico-químico. La actividad permite conocer el valor de los tipos de mieles en el placer del consumo y como complemento dietético y terapéutico.

- Polinización y anatomía de la abeja: Utilizando lupas binoculares y guiados por el profesor del CdA, los escolares van descubriendo particularidades del insecto (Boi 2006) y el papel que éstas desempeñan en la actividad de recogida del polen y de la polinización. El punto de partida es la polinización del almendro que permite desarrollar la idea de polinización cruzada y la de fidelidad botánica en los vuelos de las abejas, permite también trabajar la morfología de las flores: nectarios y anteras. El manejo de instrumental de laboratorio constituye por sí solo un contenido de la actividad.

	<i>CdA sa Cala</i>	<i>CdA Son Ferriol</i>	<i>CdA es Pinaret</i>
Visita al apiario.	Desde 2001	Desde 2003	Desde 2009
Colmenas de observación.	Desde 2001	Desde 2003	Desde 2009
Cata de mieles.		Desde 2005	Desde 2009
Polinización y anatomía.		Desde 2009	
Apicultura tradicional...	Desde 2001		

- La apicultura tradicional y taller de elaboración de velas: El CdA sa Cala se encuentra en una zona privilegiada para aprender el modo de vida tradicional de los habitantes. En esta actividad se presentan colmenas, objetos y

herramientas propios de la apicultura tradicional de Ibiza. Durante la sesión se habla a los alumnos de la práctica de la apicultura a lo largo de la historia y de su evolución hasta la situación actual. Elaboran una vela utilizando una lámina de cera estampada.

- Feria de la ciencia: De manera conjunta los tres CdA y el grupo del programa de calificación profesional inicial de operarios de viveros y jardines del IES Josep Sureda i Blanes de Palma de Mallorca, han participado en tres ediciones de la “*fira de la ciencia de les Illes Balears*”, el curso 2006-2007 en Menorca, visitada por 5.995 escolares (62% del total de la escolarización), el 2007-2008 en Ibiza a la que acudieron 4.468 alumnos (34%), y el 2009-2010 en Mallorca, que de todos los asistentes 5.625 eran escolares (6% de la población escolar). Los visitantes podían realizar actividades referentes al estudio de las abejas y a los productos apícolas, especialmente la miel. El CdA sa Cala ya había participado en la edición del curso 2004-2005. La asistencia a las distintas ediciones de esta feria de contenido científico-educativo (a pesar de que no se trate de una actividad realizada en los CdA), ha proporcionado un impulso cuantitativo y cualitativo en las actividades de apicultura, además de la promoción en el sector educativo, ha contribuido a la actualización técnica y didáctica del profesorado de los CdA.

Resultados.

Evolución de la demanda de actividades reflejada en la cantidad de alumnos que la realizan (ver iconografía).

En Ibiza y en Mallorca se reciben solicitudes para realizar actividades de apicultura que no pueden ser atendidas debido a la saturación de los equipamientos (hay que tener en cuenta que los CdA ofrecen otra actividades). Las evaluaciones realizadas por los profesores de los centros asistentes son positivas. Los profesores que han realizado las actividades solicitan repetirlos en cursos posteriores. La evolución de la cantidad de alumnos participantes es favorable y también lo es, el grado de satisfacción del personal docente de los CdA.

Referencias.

- Bartomeus, N. (2009): Invasive plants affecting native pollinators. Comunicación Apimondia 2009.
- Boi, M. (2006): “Las abejas al descubierto”. Rev. Vida apícola nº: 140-151. Barcelona. Montagud Editores.
- Boi, M., Lladó, G, Llorens, L. (2008): Estudio de la flora melífera, mieles y producción polínica de Mallorca. Palma de Mallorca.
- Garrido Portela, M. y Martínez Losada, C. (2009): “¿Qué enseñar sobre los seres vivos en los niveles educativos iniciales?” Rev. Aula nº 183-184.
- Gómez Pajuelo, A. (2004): Miel de España y Portugal. Conocimiento y cata. Barcelona. Montagud Editores.

- Societat Balear D'Educació Ambiental, SBEA. (1997): Coneixements bàsics en educació ambiental. Binissalem, Illes Balears. Di7.

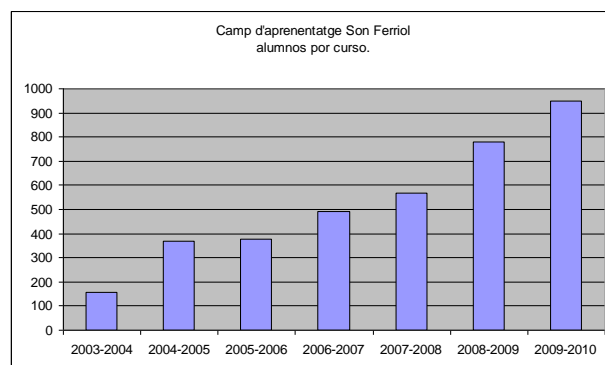
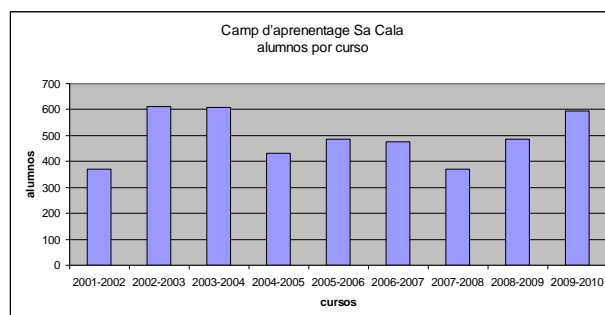


Tabla 1. Evolución de la demanda, alumnos por curso.

curso	<i>sa Cala</i>	<i>Son Ferriol</i>
2001-2002	370	
2002-2003	610	
2003-2004	607	157
2004-2005	430	367
2005-2006	485	376
2006-2007	475	491
2007-2008	369	569
2008-2009	486	778
2009-2010	593	951
Total	4425	3689

Tabla 2. Alumnos por curso que han realizado actividades.

Estudio de la interacción de *Apis mellifera* L. con el paisaje vegetal mediante SIG en un apiario de Valldemossa (Baleares)

J. M. Vergara¹; G. Lladó; M. Taltavull; L. Gil²; M. Boi²; L. Llorens²

1 *Universitat de les Illes Balears (UIB)*, Cra. de Valldemossa, km 7.5. 07122 Palma correo electrónico *juanma_vergara@yahoo.es*

2 Área de Botánica, *UIB*, Cra. de Valldemossa, km 7.5. 07122 - Palma

Summary.

The island of Mallorca (Balearic Islands) has a great geomorphologic and climatic diversity in few kilometres that has given as a result a landscape rich in vegetal communities, clearly influenced for the human activity. The pollen production of the flora, the distribution of this flora in the landscape or the period of flowering of each species are conditions of the yield of an apiary. The apiary of sampling of this study is located in the agricultural estate called Son Maixella, in the south of the municipal term of Valldemossa in the west of the island. This placement has been chosen because is surrounded of the three types of vegetal landscape (natural, semi natural or rural and urban) that can bring pollen resources to *Apis mellifera*.

The intention of the study is to analyze the vegetal landscape near to the beehives to know the vegetal communities that guarantee a good yield of the apiary. It has been done through the combination of studies about vegetation sociology and pollen samples with the information brought by geographical information systems (GIS).

Introducción.

La isla de Mallorca (Baleares) posee una gran diversidad geomorfológica y climática en pocos kilómetros que ha dado como resultado un paisaje rico en comunidades vegetales, claramente influido por la actividad humana. La producción polínica de la flora apícola, su distribución en el paisaje o el periodo de floración de cada especie son condicionantes del rendimiento de un colmenar. El colmenar de muestreo de este estudio se localiza en la finca agrícola Son Maixella, al sur del término municipal de Valldemossa (Baleares). Se ha elegido este emplazamiento por estar rodeado de los tres tipos de paisaje vegetal (natural, seminatural o rural y urbano) que pueden aportar recursos poliníferos a *Apis mellifera*.

El objetivo del estudio es analizar el paisaje vegetal próximo a las colmenas para conocer las comunidades vegetales que garanticen un buen rendimiento del colmenar, mediante la combinación de estudios fitosociológicos y palinológicos con la información aportada por sistemas de información geográfica (SIG).

Material y Métodos.

Se han utilizado los datos obtenidos en un estudio anterior en el que se habían analizado muestras polínicas de dos colmenas (C45 y C48) cada tres semanas desde octubre de 2009 hasta junio de 2010. A la vez, se había elaborado el mapa fitosociológico del área de dos kilómetros de radio alrededor del apiario. Se ha comparado la información de campo (fitosociología) y de muestreo en las colmenas (palinología) con la obtenida al analizar la fotografía aérea de la zona de estudio a través de sistemas de información geográfica (SIG). Para ello se ha utilizado el programa informático ArcGis versión 9.3.

Resultados.

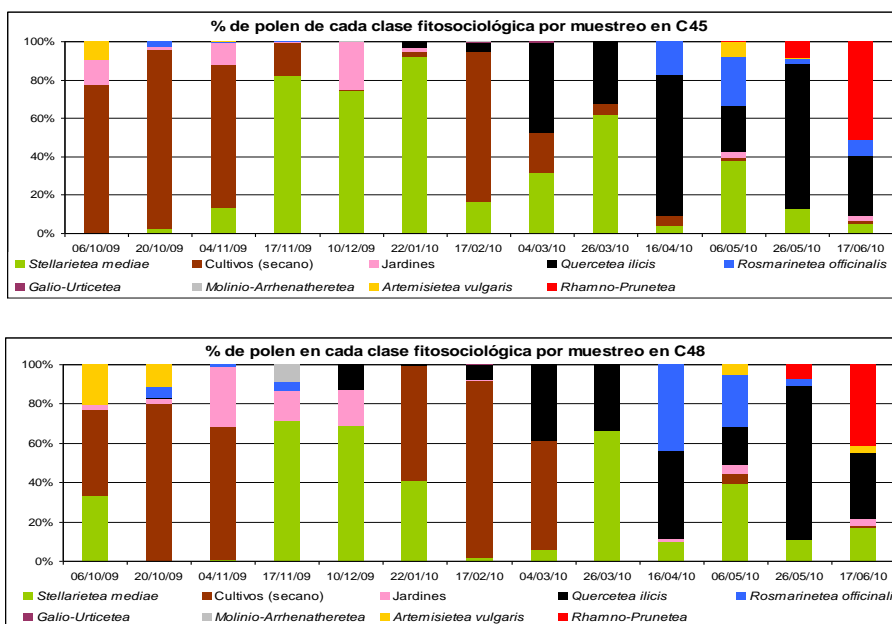


Figura 1. Porcentaje de polen de cada clase fitosociológica por muestreo en C45 (arriba) y C48 (abajo). Los cultivos son frutales de secano. Los jardines incluyen zonas ajardinadas residenciales y pequeños huertos en los que dominan plantas ornamentales foráneas y hortalizas.

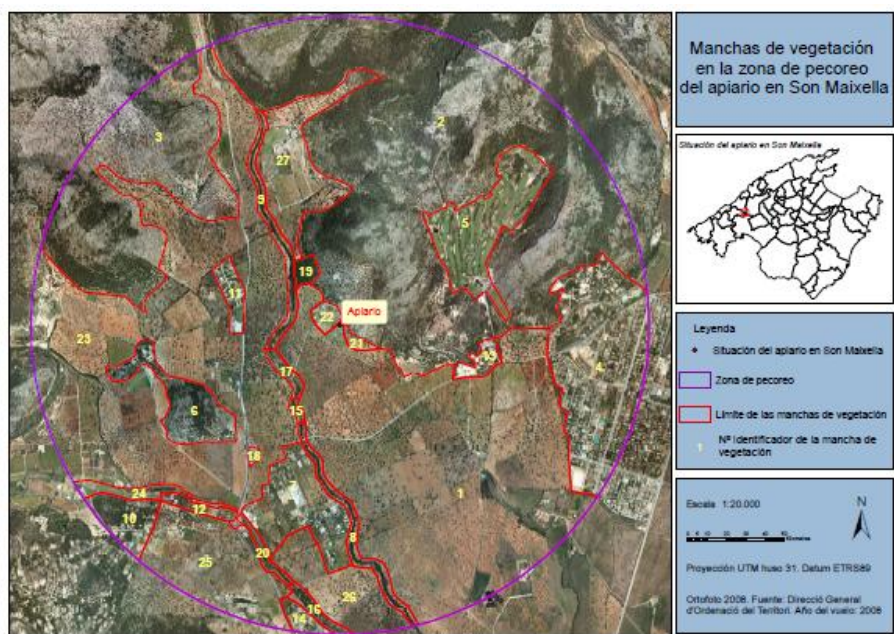


Figura 2. Mapa de vegetación de la zona de pecoreo de 2 km de radio (círculo lila) alrededor del apiario. Los números (en amarillo) corresponden a las manchas de vegetación (líneas rojas) identificadas en el campo.

SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA		FITOSOCIOLOGÍA		PALINOLOGÍA		
Hábitat	Superficie (%)	Clases fitosociológicas	Cobertura (%)	Interés polinífero	Época de aprovechamiento	Táxones poliníferos (diagnósticos de cada clase)
Acebuchal, encinar, pinar, bosque mixto, matorral	45,1	<i>Quercetea ilicis</i> (Clematidi cirrhosae- <i>Quercetum rotundifoliae</i>)	24	Alto	Primavera	<i>Osyris alba</i> , <i>Quercus rotundifoliae</i> ** , <i>Rhamnus alaternus</i> , <i>Viburnum tinus</i>
		<i>Quercetea ilicis</i> (<i>Oleo sylvestris</i> - <i>Ceratonion siliquae</i>)		Alto	Primavera	<i>Myrtus communis</i> * , <i>Olea europaea</i> , <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Smilax aspera</i>
		<i>Festuco-Brometea</i>	0,1	Bajo	Primavera	<i>Asphodelus aestivus</i> *
		<i>Helianthemetea-Guttati</i>	2,8	Bajo	Primavera	<i>Allium</i> sp., <i>Bellis annua</i> , <i>Plantago</i> spp., <i>T. Sonchus</i> sp.
		<i>Lygeo-Stipetea</i>	6,4	Bajo	Ninguna	Ninguno
		<i>Rosmarinetea officinalis</i> (<i>Anthyllido cytisoidis</i> - <i>Teucrietum majorici</i>)	5,5	Alto	Primavera	<i>Anthyllis cytisoides</i> *, <i>Cistus</i> spp., <i>Erica multiflora</i> *, <i>Lavandula dentata</i> *, <i>Rosmarinus officinalis</i> *
Algarrobal, almendral, olivar, praderas de anuales	46,1	Cultivos frutales de secano	18,6	Alto	Otoño-invierno	<i>Ceratonion siliqua</i> * , <i>Prunus dulcis</i> *
		<i>Stellarietea mediae</i>	31,5	Medio-alto	Todo el estudio	(1) <i>Allium</i> sp., <i>Bellis annua</i> , <i>Calendula arvensis</i> , <i>Convolvulus</i> sp., <i>Diploaxis erucoides</i> *, <i>Galactites tomentosa</i> *, <i>Papaver</i> sp., <i>Plantago</i> sp., <i>Oxalis pes-caprae</i> , <i>Sinapis</i> sp., <i>T. Bellardia</i> sp., <i>T. Carduus</i> sp.* , <i>T. Geranium</i> sp., <i>T. Raphanus</i> sp., <i>T. Sonchus</i> sp., <i>Verbascum sinuatum</i> , <i>Veronica</i> sp.
Cítricos	0,3	Cultivos frutales de regadío	1,5	Medio	Primavera	<i>Citrus</i> spp.* , <i>Vitis vinifera</i> , <i>T. Malus</i> sp.*
Erial (improductivo)	2,3	<i>Artemisietea vulgaris</i>	1,7	Medio-alto	Primavera-verano	<i>Cynara cardunculus</i> , <i>Dittrichia viscosa</i> , <i>Silybum marianum</i> , <i>T. Carduus</i> sp.
Herbáceo de secano	4,2	Cultivo de cereales	0	Ninguno	Ninguna	Ninguno
Jardines, huertos	1	Cultivos ornamentales, hortalizas...	7,6	Bajo-medio	Todo el estudio	<i>Aloe</i> sp., <i>Eriobotrya japonica</i> *, <i>Eucalyptus</i> sp.* , <i>Hedera helix</i> *, <i>Indeterminados</i> (x3), <i>Passiflora</i> sp., <i>Phoenix</i> sp., <i>Punica granatum</i> , <i>Pyracantha coccinea</i> , <i>Tecomaria capensis</i>
Vegetación de ribera	0,9	<i>Galio-Urticetea</i>	0,1	Bajo	Primavera	<i>Smyrnium olusatrum</i>
		<i>Molinio-Arrhenatheretea</i>	0,1	Bajo	Otoño	<i>Ranunculus</i> sp.
		<i>Rhamno-Prunetea</i> (<i>Rubo ulmifolii</i> - <i>Crataegum brevispiniae</i>)	0,1	Alto	Verano	<i>Rosa sempervirens</i> , <i>Rubus ulmifolius</i> * , <i>T. Crataegus</i> sp.*

(*) interés nectarífero (según bibliografía)

(**) interés por mielatos (según bibliografía)

Tabla 1. Características del paisaje vegetal próximo al colmenar (según SIG, fitosociología y palinología).

Conclusiones

- Cada tipo de hábitat identificado en fotografía aérea mediante SIG incluye una o varias comunidades vegetales diferentes identificadas en el campo. Sus coberturas pueden coincidir, solaparse o entremezclarse formando un mosaico en el paisaje vegetal.
- Los porcentajes de las superficies que ocupan los hábitats obtenidas mediante SIG se han aproximado, aunque con diferencias a tener en cuenta, a las coberturas de las comunidades vegetales identificadas en el campo.
- El uso de sistemas de información geográfica (SIG) ha resultado una buena aproximación para analizar la presencia de vegetación apícola cercana a un colmenar, en base a los hábitats existentes.
- Aún así, es aconsejable complementar el estudio de SIG con otro fitosociológico y palinológico. De esta forma se identifican las distintas comunidades vegetales del paisaje, con las respectivas especies poliníferas que puede aprovechar *Apis mellifera* y en qué época del año.

Bibliografía

- Boi, M.; Lladó, G.; Llorens, L. (2008). Estudio de la flora melífera, mieles y producción polínica de Mallorca. Mallorca Rural, Iniciativa Comunitària Leader +, Palma.
- Bucher, E.; Kofler, V.; Vorwohl, G.; Zieger, E. (2004). *Lo spettro pollinico dei mieli dell'Alto Adige. Laboratorio Biologico – Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente e la Tutela del Lavoro*, Stuttgart.
- Gil, L.; Llorens, L. (1999). *Claus de determinació de la Flora Balear*. Ed. El Gall, Palma.
- Llorens, L; Gil, L.; Tébar, F.J. (2007). *La Vegetació de l'illa de Mallorca. Bases per a la interpretació i gestió d'hàbitats. Associació Jardí Botànic de Palma*, Palma.
- Reille, M. (1999). *Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du nord. Seconde édition - Supplement 1-2. Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie*, Marsella.
- Vergara, J.M. (2010). *Aprofitament dels recursos pol·linífers del paisatge vegetal per Apis mellifera L. Practicum del màster en biologia de les plantes en condicions mediterrànies, Universitat de les Illes Balears*, Palma.

Empleo de *Apis mellifera* como bioindicador para evaluar la seguridad agroalimentaria y medioambiental.

M. Gutiérrez¹, J. A. Ruiz¹, C. Porrini², M. Lodesani³

¹Apoidea Soluciones Ambientales S.L. Font del Riego, 38. 14009 Córdoba (España).

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA). Università degli Studi di Bologna (Italy).

³Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Unitá de Ricerca de Apicoltura (Italy).

Introducción.

La finalidad de estudiar la contaminación es evitar que la salud del ser humano y de los demás seres vivos, en general, se vea perjudicada. Hasta ahora la contaminación se mide con parámetros físico-químicos. Estos parámetros pueden ser muy precisos pero no son suficientes porque realmente no nos ofrecen ninguna información sobre si la contaminación llega o no a los seres vivos, penetra o no en su interior y de qué manera actúa.

La cuestión fundamental radica en preguntarse si la finalidad es evitar que se dañen los seres vivos... entonces ¿por qué no usamos los propios seres vivos? O sea, bioindicadores, que son seres vivos que a través de modificaciones en su ciclo biológico, mortalidad, comportamiento o acúmulo de sustancias pueden indicarnos cambios importantes en el medioambiente.

Apis mellifera posee excepcionales cualidades como bioindicador ambiental. La principal ventaja que nos ofrecen es su sensibilidad a los productos químicos, de hecho es obligatorio llevar a cabo ensayos de ecotoxicidad sobre *Apis mellifera* para poder legalizar la comercialización de nuevos productos químicos o fitosanitarios. En segundo lugar, podemos considerar a esta especie como el bioindicador del territorio por excelencia, pues gracias a sus características morfológicas, biológicas y de comportamiento las hacen idóneas para recoger muestras de aire, vegetación, agua y suelo. En tercer lugar, las colonias de *Apis mellifera* son ubicuas y pueden localizarse en cualquier zona geográfica, posibilitando realizar protocolos reproducibles y estandarizables. En cuarto lugar, suponen un menor coste económico que los indicadores físico-químicos. Y finalmente, en quinto, llevan a cabo la polinización de la flora que se haya en los emplazamientos urbanos o rurales, donde se realizan los estudios.

Todas estas circunstancias están siendo aprovechadas desde hace años por investigadores de varios países para realizar estudios de evaluación de calidad medioambiental con resultados muy significativos en cuanto a la detección, seguimiento y repercusiones de agentes contaminantes.

APOIDEA, empresa de base tecnológica, viene desarrollando varios proyectos en este sentido. Sus objetivos se centran en evaluar la repercusión biológica

de los principales contaminantes (pesticidas, metales pesados, isótopos radiactivos...), conocer la biodiversidad, la sostenibilidad y el estado de conservación de diferentes áreas geográficas, y determinar zonas con distintos niveles de riesgo medioambiental, todo ello mediante la utilización de estaciones de monitoreo con abejas (*Apis mellifera*).

Los proyectos llevados a cabo hasta el momento se han centrado en el uso de *Apis mellifera* como método de control de la calidad medioambiental de fincas de frutas y hortalizas con Manejo Integrado de Plagas en la provincia de Badajoz y la seguridad de los alimentos producidos en ellas, así como en el establecimiento de una red de estaciones de biomonitoreo con colonias de esta especie para la evaluación de la contaminación urbana en el municipio de Córdoba. Estos proyectos han sido apoyados por el Gabinete de Iniciativa Joven de la Junta de Extremadura, el Ayuntamiento de Córdoba y el Ministerio de Medioambiente y Medio Rural y Marino.

La metodología empleada para llevar a cabo estos estudios requiere de tres fases. La primera de ellas consiste en la ubicación y georreferenciación de las estaciones de monitoreo, el estudio de las actividades de la zona, la anotación y seguimiento de parámetros biológicos y de comportamiento de las colonias, y la recogida de las muestras oportunas, las cuales varían en función del contaminante a estudiar.

En una segunda fase se realiza un análisis químico de dichas muestras para detectar los posibles agentes contaminantes y un análisis palinológico para conocer las plantas visitadas y por tanto el origen de la contaminación.

Finalmente y en la tercera fase, los datos obtenidos se vierten en un Mapa a través de los Sistemas de Información Geográfica en el que se indica el tipo de contaminación y el origen de la misma, interpretándose los resultados y señalando los diferentes niveles de riesgo ambiental. Estos Mapas pueden servir de referencia para mejorar la gestión, toma de decisiones y competitividad de empresas, industrias e instituciones de la Administración.

Si bien la tecnología apícola es la base o punto de arranque de esta metodología, cada una de estas fases se ven apoyadas por otras especialidades, dándole un carácter multidisciplinar. Así, se cuenta con la participación de la Unidad de Espectrometría de Masas y Cromatografía del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) y con el Departamento de Botánica, ambos de la Universidad de Córdoba, para realizar los análisis químicos y palinológicos respectivamente. También se trabaja con la EBT de la UCO Soluciones Agrícolas de Precisión (Agrosap S.L.), que colabora y asesora en la elaboración de los mapas de riesgos medioambientales a través de los programas del Sistema de Información Geográfica (SIG).

Por otra parte y desde el inicio se cuenta con el apoyo de científicos de Instituciones y Centros internacionales de investigación con acreditada experiencia en este tema, en especial con el Dipartimento di Scienze e Technologie Agroambientali (DiSTA) de la Universidad de Bolonia, con el

Instituto Nacional de Apicultura de Italia (CRA-Api) y con el IUT de Bourges de la Universidad de Orleans (Francia).

Resultados y Discusión.

Los resultados obtenidos hasta el momento se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Detección de sustancias específicas no catalogadas.

Mediante estaciones de biomonitoreo con abejas es posible encontrar sustancias específicas no catalogadas con los métodos físico-químicos empleados oficialmente para analizar la calidad del aire. La Consejería de Medioambiente, por ejemplo, analiza PM10, que son pequeñas partículas cuyo diámetro varía entre 2,5 y 10 μ m. En ellas no se distingue entre polvo suspendido y metales pesados, como Cr, Ni y Pb, estudiados en nuestro proyecto.

2. Variaciones significativas entre estaciones y periodos.

En los resultados obtenidos hasta la fecha (figura 1) se han hallado valores variables de Ni y Pb y valores preocupantes de Cr, tanto en el año 2007 como en el 2009. Se han podido precisar los periodos y estaciones donde dichos valores se alcanzaron.

3. Obtención e interpretación de Mapas de Riesgos Ambientales.

Los Sistemas de Información Geográfica (SIG) nos permiten elaborar Mapas con los resultados obtenidos (figura 2) y recabar información por interpolación de los puntos geográficos situados entre las estaciones de monitoreo que componen la red de la ciudad de Córdoba, cosa que no ocurre cuando hay una sola estación de análisis. Estos Mapas nos han permitido demostrar además un “efecto valle” en la contaminación de la ciudad, de modo que a más altitud encontramos menos contaminación de Cr en abejas y miel y viceversa.

4. Presencia de plaguicidas y pérdida de abejas.

En el proyecto llevado a cabo en fincas de producción integrada en la provincia de Badajoz se ha comprobado que el 40% de las muestras sobrepasaron el umbral de mortalidad de 250 abejas muertas por semana y estación, y en el 100% de ellas se halló la presencia de diferentes plaguicidas (figura 3), algunos de ellos de la familia de los neonicotinoides prohibidos en países como Francia e Italia.

Como los plaguicidas afectan al sistema nervioso de las abejas impidiendo su regreso a las colmenas hemos comenzado a utilizar un contador de abejas (figura 4) que complementa la información, indicándonos el número de ellas que no regresan a sus colmenas durante un día de pecoreo.

5. Información a tiempo real.

La incorporación de Apoidea en el proyecto “e-ruche” de la Universidad de Orleans está permitiendo además obtener información a tiempo real de importantes parámetros biológicos de las estaciones, como la observación del comportamiento, vuelo y mortalidad de las abejas, peso de las colmenas y parámetros de la temperatura y humedad del interior y exterior de las

mismas. Este tipo de biomonitoring será muy importante en futuros proyectos porque nos permitirá actuar con celeridad ante cualquier evidencia o signo de gravedad.

6. Repercusiones en la Biodiversidad.

En la última anualidad del proyecto que evalúa la contaminación urbana en la ciudad de Córdoba se ha empezado a hacer un censo sobre la biodiversidad de abejas presente en cada área geográfica donde están ubicadas las estaciones de biomonitoring. La presencia de distintas especies de abejas se va a relacionar con la contaminación de plaguicidas, el uso del suelo y las actividades del territorio.

En resumen, podemos decir que la utilización de colonias de *Apis mellifera* llevada a cabo por la empresa Apoidea es una herramienta útil en la evaluación de la calidad medioambiental del territorio, ya que proporciona información adicional y de suma importancia a tener en cuenta por todo tipo de entidades interesadas en la Bioseguridad Medioambiental, el Desarrollo Sostenible y la Biodiversidad.

De hecho el Ministerio de Ciencia e Innovación, a través del Subprograma de Acciones Complementarias del Plan Nacional de I+D+i 2008-2011, acaba de aprobar la realización de un Workshop Internacional que se llevará a cabo en otoño del 2011, sobre el Empleo de Abejas en estudios de Biodiversidad, Desarrollo Sostenible y Bioseguridad Ambiental, y al que está previsto que acudan investigadores del distintos países del mundo.

Referencias.

- Accorti, M. (1994). Influenza dell'ambiente sul comportamento e sulla biologia delle api nel monitoraggio ambientale. In: Atti del Convegno: "L'Ape come Insetto Test dell'Inquinamento Agricolo' P. F "Lotta Biologica e Integrata per la Difesa delle Colture Agrarie e delle Piante Forestali", March 28, 1992, Florence, Italy (D'Ambrosio, M. T. and Accorti, M., Eds). Ministero Agricoltura e Foreste, Rome, Italy, pp. 45– 57.
- Accorti, M., Luti, F. and Tarducci, F. (1991). Methods for collecting data on natural mortality in bee. Ethol. Ecol. Evol. special Issue 1, 123– 126.
- Ambrus, A., Lantos, J., Visi, E., Csatos, I. and Sarvari, L. (1981). General method for determination of pesticide residues in samples of plant origin, soil and water. I. Extraction and cleanup. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 733– 769.
- Anderson, L. D. and Atkins, A. L., Jr. (1958). Toxicity of pesticides to honeybee in laboratory and field test in Southern California, 1955– 1956. J. Econ. Entomol. 51, 103– 108.
- Di Giacomo, F., Franco, M. A., Giaccio, M., Prota, R., Floris, I., Chessa, M. and Sferlazzo, G. (1996). Valutazioni statistiche multivariate sul contenuto di metalli in mieli prodotti in prossimità di fonti di inquinamento. Riv. Merceol. 35, 296– 310.
- Illies, I., Mühlen, W., Dücker, G. and Sachser, N. (2000). A study of undertaking behaviour of honeybees (*Apis mellifera* L.) by use of different bee

traps. In: Hazards of Pesticides to Bees (Pélissier, C. and Belzunces, L. P., Eds), IOBC wprs Bull., 23, p. 24.

- Louveau, J., Maurizio, A. and Vorwhol, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World* 59, 139– 157.
- McIndoo, N. E. and Demuth, G. S. (1926). Effects on honeybees of spraying fruit trees with arsenicals. *US Dept. Agric. Bull.* 1364, 1– 32.
- Mercuri, A. M. and Porrini, C. (1991). Melissopalynological analysis applied to air pollution studies in urban areas of Modena and Reggio Emilia. *Aerobiologia* 7, 38– 48.
- Persano Oddo, L. and Ricciardelli D'Albore, G. (1989). Nomenclatura melissopalynologica. *Apicoltura* 5, 63– 72.
- Porrini, C., Colombo, V. and Celli, G. (1996). The honey bee (*Apis mellifera* L.) as pesticide bioindicator. Evaluation of the degree of pollution by means of environmental hazard indexes. In: *Proceedings XX International Congress of Entomology*, August 25– 31, 1996, Florence, Italy, p. 444.
- Porrini, C. (1999). Metodologia impiegata nei programmi di monitoraggio dei pesticidi con api. In: *Atti del Workshop "Biomonitoraggio della Qualità dell'Aria sul Territorio Nazionale,"* November 26– 27, 1998, Rome, Italy (Piccini, C. and Salvati, S., Eds). ANPA, Rome, Italy, Series 2/ 1999, pp. 311– 317.
- Porrini, C., Ghini, S., Girotti, S., Sabatini, A.G., Gatavecchia, E., and Celli, G. (2002). Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. Devillers, J (Editor). *Honey bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Florence, KY, USA: Taylor&Francis, Incorporated, 2002, p. 186-247.
- Raes, H., Cornelis, R and Rzenik, U. (1992). Distribution, accumulation and depuration of administered lead in adult honeybees. *Sci. Total Environmental* 113, 269-279.
- Rossi, S., Dalperio, A. P., Ghini, S., Colombo, R., Sabatini, A. G. and Girotti, S. (2001). Multi residual method for gas chromatography analysis of pesticides in honeybees cleaned by gel permeation chromatography. *J. Chromatogr. A* 905, 223– 232.
- Sasaki, K., Suzuki, T. and Saito, Y. (1987). Simplified cleanup and chromatographic determination of organophosphorus pesticides in crops. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70, 460– 464.
- Stefano, M. A. (1996). Impiego del polline come marker nel monitoraggio dell'inquinamento da pesticidi, tramite api. Degree Thesis, Biology, University of Bologna, Italy, p.171.
- Zander, E. (1935). Beiträge zur Herkunftsbestimmung bei Honig. I. Pollengestaltung und Herkunftsbestimmung bei Blütenhonig. *Reichsfachgruppe Imker*, Berlin, Germany, p. 349.

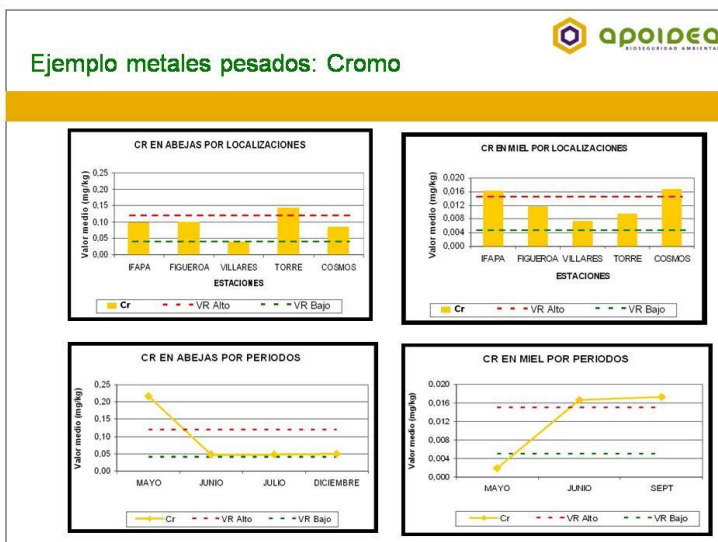


Figura 1. Niveles de metales pesados detectados.

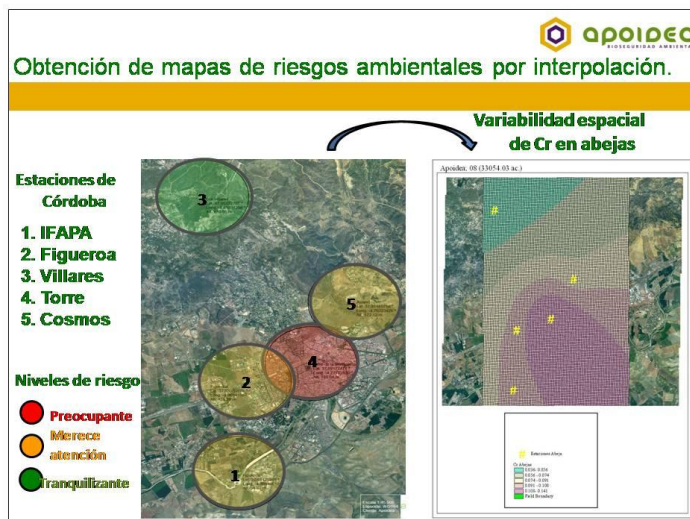


Figura 2. Mapa de riesgo ambiental.

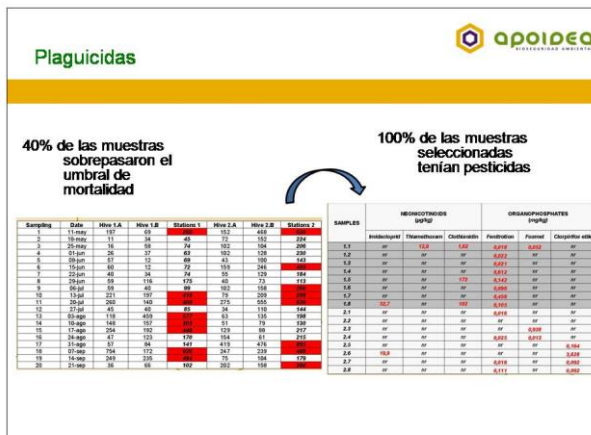


Figura 3. Plaguicidas detectados.



Figura 4. Sistema contador de abejas.

Evaluación de la contaminación ambiental por benzo(a)pireno en mieles de Zaragoza.

L. Corredera Martín, S. Bayarri Fernández, C. Pérez-Arquillué, R. Lázaro Gistau, A. Herrera Marteache. Correo electrónico: conperez@unizar.es

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177, 50013. Zaragoza.

Resumen.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de cien compuestos formados por moléculas de anillos aromáticos fusionados, generados tras procesos de combustión incompleta de materia orgánica. Están incluidos dentro del grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y pueden permanecer en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo sin alterarse sus propiedades tóxicas. Últimamente, este tipo de compuestos ha despertado una gran preocupación científica y sanitaria, debido al potencial genotóxico y carcinógeno que presentan muchos de ellos, siendo el benzo(a)pireno (BaP) uno de los HAPs más estudiados. En la actualidad este compuesto ha sido propuesto en varias ocasiones como marcador de la presencia y niveles de estos contaminantes en alimentos. En el Reglamento (CE) No 1881/2006 se establecen niveles máximos de BaP en determinados productos alimenticios, aunque la miel y otros productos apícolas no se encuentran hasta el momento contemplados en la legislación. La miel puede presentar contaminación por HAPs procedente de diversas fuentes ambientales, pudiendo actuar de esta manera como un importante indicador biológico de la contaminación existente en la zona. Pese a ello, la información sobre la presencia y niveles de HAPs en productos de la colmena es muy escasa. El objetivo de este trabajo ha sido la determinación de niveles de BaP en muestras de miel de colmenares ubicados en Zuera (Zaragoza), zona afectada por un importante incendio forestal durante el mes de agosto de 2008. Para ello se ha aplicado un método analítico, previamente desarrollado y validado en nuestro laboratorio, basado en una extracción en fase sólida (SPE) y una determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Summary.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of well known compounds consisting of two or more aromatic rings which are mainly the products of incomplete combustion of organic matter. They belong to the group of Persistent Organic Pollutants (POPs), so they can remain in the environment during long periods of time without changing their toxic properties. Lately, this group of contaminants have attracted most attention in the scientific field and

public health because of the carcinogenic potential of some of them, being benzo(a)pyrene (BaP) the most studied compound. BaP can be used as a marker for the occurrence and effect of carcinogenic PAHs in food, and Commission Regulation 2006/1881/EC has fixed maximum levels for BaP in various food products, but honey and other beekeeping products have not been included in this regulation yet. Honey can be contaminated with this kind of substances as a result of different kinds of environmental pollution, and it can be used as an important bioindicator of the pollution existing in the studied area. However, there is very little information on the levels of PAHs in honey. The aim of this study was the determination of BaP levels in honey samples from several apiaries located in Zuera (Zaragoza), a large area affected by an important forest fire in August 2008. In so doing, an analytical methodology based on solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC), previously developed and validated in our laboratory, was applied to the analysis of the samples.

Introducción.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de cien compuestos que se forman durante procesos de combustión incompleta de materia orgánica, incluyendo procesos industriales, uso de calefacciones, combustibles fósiles o incendios forestales.

Estos compuestos son considerados contaminantes orgánicos persistentes (COPs), por lo que pueden permanecer en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas. Los HAPs han sido ampliamente estudiados a lo largo de los últimos años, debido a que son compuestos que se encuentran en todos los medios y muestran una fuerte toxicidad. Han sido reconocidos como carcinógenos genotóxicos para el ser humano y además presentan un carácter mutagénico dependiendo de la estructura química de los metabolitos formados, pudiendo provocar también una disminución de la respuesta del sistema inmune y aumentar los riesgos de infección.

Entre los numerosos HAPs existentes, el benzo(a)pireno (BaP) es uno de los más estudiados, y ha sido propuesto en varias ocasiones como marcador de la presencia y niveles de estos contaminantes en alimentos.

La contaminación de los alimentos por HAPs tiene su origen en la contaminación medioambiental y su depósito a través del aire o agua, de la transferencia desde el suelo o de su formación en tecnologías de conservación, como el desecado, ahumado o cocinado. La contaminación de la miel por parte de HAPs puede ser el resultado de la contaminación ambiental procedente de vehículos, actividades domésticas e industriales, incendios o erupciones volcánicas, depositada sobre las flores y plantas. Debido a la acción polinizante de las abejas, éstas pueden contaminar toda la cera de la colmena y la miel a partir del polen o de las plantas en general. La utilización de ahumadores para el manejo de colmenas o algunos tratamientos acaricidas

son también prácticas muy extendidas que suelen acarrear contaminaciones indeseadas del producto final.

El objetivo de este trabajo ha sido la determinación de niveles de BaP en muestras de miel de colmenares ubicados en Zuera (Zaragoza), zona afectada por un importante incendio forestal durante el mes de agosto de 2008, aplicando un método analítico, previamente desarrollado y validado en nuestro laboratorio, basado en una extracción en fase sólida (SPE) y una determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Material y Métodos.

Se recogieron un total de 20 muestras de miel en colmenares cercanos al incendio producido en los alrededores de Zuera (provincia de Zaragoza) del 5 al 15 de agosto de 2008. Para su análisis se utilizó una metodología analítica desarrollada en nuestro laboratorio y validada conforme a los requisitos establecidos en el Reglamento (CE) No 333/2007. Se pesaron 12 gramos de la muestra de miel y se ajustaron a 50 ml con una mezcla agua: metanol (90:10). La solución así preparada se sometió a una fase de extracción y purificación utilizando un sistema de extracción en fase sólida (SPE) con columnas de C18. El extracto final se reconstituyó en 0,5 ml de acetonitrilo para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia. La fase móvil utilizada estaba compuesta por una mezcla de acetonitrilo: agua y las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 270 nm y 420 nm respectivamente. El tiempo de retención del BaP fue de 20,2 minutos.

Resultados y Discusión.

El método desarrollado en nuestro laboratorio permite la detección y cuantificación de manera fiable de BaP en muestras de miel, con un límite de detección de 0,08 µg/kg de miel y porcentajes de recuperación entre 60% y 95%. En las muestras analizadas no se detectaron niveles de BaP por encima del límite de detección de la técnica, lo que coincide con otros trabajos llevados a cabo en esta misma matriz alimentaria por autores españoles (Albero *et al.*, 2003), aunque en otros países se han determinado concentraciones de BaP de hasta 141 µg /kg (Dobrinas *et al.*, 2008).

Conclusiones.

El consumo de estas mieles no supone un riesgo derivado de la presencia de BaP para la salud humana. Sin embargo, es necesario continuar con la monitorización de muestras de miel y otros productos de la colmena, como la cera, que por sus características físico-químicas puedan acumular este tipo de sustancias y servir como bioindicadores de la contaminación ambiental.

Agradecimientos.

Gobierno de Aragón (Grupo Consolidado A 01) y Ayudas a los laboratorios apícolas, con financiación del Fondo Social Europeo.

Referencias.

- Albero, B., Sánchez-Brunete, C. & Tadeo, J.L. (2003). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 86 (3), 576-582.
- Dobrinás, S., Birghila, S. & Coatu, V. (2008). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (1), 71-77.
- Reglamento (CE) no 333/2007 de la Comisión, de 28 de marzo de 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios.

Empleo de componentes del aroma para la caracterización de mieles monoflorales.

S. Serrano Jiménez, M. Jodral Villarejo, F. Lafont Deniz, M^a. C. Gallardo Madueño.

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba.

Resumen.

Se analizaron 38 muestras de miel monofloral de distintos orígenes botánicos - 9 azahar, 10 tomillo, 10 eucalipto y 9 romero- procedentes de colmenares de Andalucía y correspondientes a las cosechas de los años 2002, 2003 y 2004; con el fin de llevar a cabo su caracterización en base al estudio de los compuestos volátiles responsables del aroma, y en especial de norisoprenoides, para poder establecer una posible diferenciación entre estas mieles monoflorales andaluzas. Con el objeto de autentificar el origen botánico, todas las muestras de miel fueron sometidas a análisis melissopalínológico, siguiendo el método descrito por Louveaux et al. (1978). Los resultados fueron tratados en un trabajo de investigación distinto a éste, pero a través de ellos se pudo confirmar el origen botánico de cada una de las muestras de miel tratadas en este trabajo.

Metodología analítica

Se sigue el procedimiento descrito por Guyot et al. (2000), quienes establecen un método optimizado para la extracción y cuantificación de norisoprenoides y otros compuestos volátiles en mieles monoflorales. Este método se basa en la extracción por adsorción a resinas no-iónicas Amberlite[®], empleando de forma separada, dos tipos diferentes de estas resinas, XAD-2 (tamaño de poro, 9 nm, superficie activa, 330 n2.g-1) y XAD-16 (tamaño de poro, 10 nm, superficie activa, 650 n2.g-1).

La elución de los compuestos extraídos se realiza con solvente orgánico (diclorometano). Posteriormente se realiza la concentración del extracto obtenido y se lleva a cabo la separación de los distintos compuestos volátiles a través de cromatografía gaseosa (GC, Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890, equipado con un inyector automático Hewlett-Packard modelo 7673, un detector de ionización de llama y un integrador 61512A). La identificación de cada uno de los compuestos se realiza por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS, Cromatógrafo de gases VARIAN CP-3800, Espectrómetro de masas VARIAN, Saturn 2200) y la cuantificación de los mismos por cromatografía gaseosa (GC-FID).

Condiciones cromatográficas CG-FID

El volumen de inyección de la muestra es de 2 µl y el modo de inyección fue en split-less. La temperatura del inyector de 265 °C. La rampa de temperatura

del horno fue programada con elevación de la temperatura de 60 a 300 °C a una velocidad de 6 °C/minuto y mantenimiento de la temperatura de 300 °C durante 30 minutos. La temperatura del detector se mantiene a 310 °C.

La fase móvil gaseosa empleada es el helio y a un flujo constante de 1,5 ml/minuto. Columna capilar de 50 x 0.32 mm (espesor de película de 1,2 µm) (WCOT) CP-SIL GB (Chrompack®, Antwerp, Belgium).

Condiciones cromatográficas CG-MS.

Las condiciones cromatográficas son las mismas que las señaladas en el apartado anterior para CG-FID. La columna fue directamente conectada al espectrómetro de masas. En el espectrómetro de masas se llevó a cabo la adquisición en masas de barrido desde 42 °C hasta 450 °C en modo impacto electrónico. Tiempo de barrido de 1 scan/segundo.

Análisis cualitativo y cuantitativo

Los índices de retención se calculados por interpolación de los tiempos de retención de los n-alcános (C5 – C24) que son analizados bajo las mismas condiciones. El análisis cuantitativo de cada uno de los compuestos identificados y que resultaron de interés para este estudio se realizó en función del patrón interno, 1-cloroheptano y teniendo en cuenta un factor de recuperación del 100%.

Resultados y Discusión.

Mieles de azahar

En las mieles de azahar se identifican un total de 43 compuestos volátiles diferentes. De todo ellos sólo 9 fueron considerados como posibles marcadores del origen botánico y/o geográfico para estas mieles (Tabla 1)

Cis-limonene, oxide ha sido aislado por diversos autores en aceites esenciales de cítricos (Dellacassa, et al., 1997; Verzera, et al., 1997; Verzera et al., 1998). Sin embargo, tal y como señala D'arcy et al. (1997), terpenos del tipo limonene, eucaliptol, timol, entre otros, no pueden ser considerados como marcadores botánicos para ninguna miel, puesto que se trata de compuestos que están presentes todos ellos en la mayoría de los aceites esenciales de las plantas.

Son muchos los autores que señalan que las mieles de cítricos se caracterizan por su alto contenido en derivados del linalool. Así por ejemplo podemos citar a Pérez et al. (2002) que establece que los compuestos que mejor caracterizan a las mieles de cítricos españolas son los lilac aldehídos que proceden de la degradación del linalool. También se han encontrado derivados del linalool en miel *Cardus nutans*, concretamente se han encontrado linalool hidroxilados y lilac alcoholes y aldehídos, (Wilkins et al., 1993), en mieles de eucalipto (D'arcy et al., 1997), en mieles de leatherwood (Rowland et al., 1995) y en miel asiática longam (Ichimura, 1994).

El fenol, 2,4-bis (1-1-dimetiletil) aparece en todas las mieles monoflorales en este estudio. Un compuesto muy similar a este fenol, el 4-tert-butilfenol, es el identificado por Guyot et al. (1998) en mieles de "lime tree". Steeg & Montag

(1988) también encontraron este mismo compuesto en mieles de bosque, de coníferas, de brezo, entre otras; señalando que tras su estudio olfatométrico, detectaron que este compuesto presentaba un olor con notas fenólicas.

Mieles de tomillo

Un total de 35 compuestos volátiles diferentes se obtienen para mieles de tomillo. Sólo 12 pueden ser considerados como posibles marcadores del origen botánico y/o geográfico (Tabla 2).

Según señala Broom et al. (1992) y Ede et al. (1993), los norisoprenoides que están presentes con mayor frecuencia en la miel son aquellos que presentan una estructura 3,5,5-trimetil-ciclohex-2-en-one. Así, el dehidrovomifoliol ha sido aislado en muchos otros tipos de mieles monoflorales por otros autores como en mieles de *Anacardium occidentale* y *Croton* sp. (Moreira et al., 2002). También ha sido identificado en mieles de *Calluna vulgaris* (Tan et al., 1989a, 1989b; Sun, 1995), *Euphoria longaza* (Ichimura, 1994), mieles australianas de *Eucryphia lucida* (Rowland et al., 1995), mieles de eucalipto, girasol y lavanda (Radovic, et al. 2001), mieles de eucalipto australianas (D'arcy et al., 1997). Incluso el dehidrovomifoliol es señalado por Guyot et al. (1999) como marcador botánico para las mieles de brezo.

La 4-oxo-isoforona también ha sido aislada en otros tipos de mieles monoflorales. Radovic et al. (2001) la aislaron e identificaron en muestras de miel de eucalipto, castaño, acacia, lima, colza. También ha sido detectado este norisoprenoide en mieles de brezo de Nueva Zelanda (Tan et al., 1989a) y en mieles australianas de *Eucryphia lucida* (Rowland et al., 1995) y en algunas de las muestras de miel australiana de eucalipto (*Eucalyptus melliodora*) analizadas por D'arcy et al. (1997). Este compuesto no ha sido aislado en ninguna de las muestras de miel de tomillo analizadas por otros autores (Pérez et al., 2002; Piasenzotto et al., 2003; Tan et al., 1990; Broom et al., 1992).

El limoneno (4-Isopropenil-1-metil-1-ciclohexene o (S)-Ciclohexene, 1-metil-4-(1-metil-etenil)-) es un terpeno que también ha sido aislado en aceites esenciales de tomillo (Hudaib et al., 2002) y en sus hojas y flores. Por lo tanto, podemos decir que este compuesto tiene un origen natural en la miel y que probablemente su origen sea el néctar de procedencia.

La eucarvona no ha sido referenciada, hasta el momento, en ningún de los estudios llevados a cabo en mieles de tomillo.

Los derivados de los bencenos constituyen el grupo de volátiles/semivolátiles más variado que ha sido aislado en las mieles de tomillo analizadas en este trabajo.

Un compuesto muy similar a *2,4-di-tert-butil-fenol*, el 4-tert-butil-fenol, ha sido identificado por Guyot et al. (1998) en mieles de lima. Steeg & Montag (1988a) también encontraron este mismo compuesto en mieles de bosque, de coníferas, de brezo, entre otras, y señalaron que tras su estudio olfatométrico, pudieron comprobar que este compuesto presentaba un olor con notas fenólicas.

El trimetilfenol es un compuesto constante en todos los cromatogramas de las mieles de tomillo analizadas y además es uno de los compuestos volátiles/semivolátiles de mayor concentración de entre todos los identificados en este trabajo. También ha sido aislado en mieles de brezo (Guyot *et al.*, 1989) y en mieles de eucalipto (Piasenzotto *et al.*, 2003). Sin embargo, no ha sido señalado en ninguno de los estudios realizados por otros autores en mieles de tomillo (Pérez *et al.*, 2002, Piasenzotto *et al.*, 2003).

Tal y como señalan Moreira *et al.* (2002), el ácido benzoico y sus derivados son los responsables del aroma dulce agradable característico de la miel y en consecuencia se puede decir que es muy posible que este compuesto participe favorablemente en el aroma de estas mieles.

Andrade *et al.* (1997) identificaron ácido cinámico en mieles monoflorales de *Erica spp.*, *Lavandula stoechas*, *Helianthus annuus L.*, *Thymus capitatus*, *Castanea sativa*, *Brassica napus*, *Robinia pseudo-acacia*, *Rhododendron ponticum* y *Calluna vulgaris*. Guyot *et al.* (1999) aislaron ácido cinámico en mieles de *Calluna vulgaris* y *Erica arborea*.

Mieles de romero

En mieles de romero se identifican 29 compuestos volátiles diferentes. De los cuales, 2,4-ditertbutilfenol y 3,5-dimetoxi-4-benzohidrazida se recuperan en el total de las muestras del tipo, así como en el resto de las mieles monoflorales analizadas en este trabajo. Tras el análisis, podemos decir que la miel de romero presenta muy pocos compuestos que pueden ser discutidos como probables marcadores de su origen botánico y/o geográfico.

Pérez *et al.* (2002) analizaron mediante microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) varias muestras de mieles españolas de diferentes orígenes botánicos –azahar, eucalipto, romero, lavanda y tomillo- y consiguieron identificar un total de 35 compuestos, señalando que los resultados obtenidos les permitían diferenciar entre los orígenes botánicos de los distintos tipos de mieles monoflorales sometidas a estudio. Sin embargo, para las mieles de romero señalan que los cromatogramas obtenidos se caracterizan por presentar muy pocos picos representativos.

Mieles de eucalipto

Un total de 23 compuestos volátiles diferentes se obtienen para mieles de eucalipto. Sólo 7 pueden ser considerados como posibles marcadores del origen botánico y/o geográfico (Tabla 3)

En los análisis de las mieles de eucalipto se han identificado fundamentalmente norisoprenoides con una estructura 3,5,5-trimetilciclohex-2-en-one. Según señala Broom *et al.* (1992) y Ede *et al.* (1993), estos norisoprenoides son los que se encuentran con mayor frecuencia en las muestras de miel.

D'arcy *et al.* (1997) analizaron 15 muestras de miel de eucalipto australianas (8 procedentes de *Eucalyptus melliodora* y 7 procedentes de *Eucalyptus leucoxydon*). Estos autores señalaron que de entre todos los grupos de volátiles identificados los norisoprenoides fueron el grupo predominante, tanto en número como en concentración. Y dentro de este grupo de compuestos volátiles, los norisoprenoides mayoritarios fueron los compuestos C₁₃, con concentraciones superiores a los 14,7 mg/kg de miel.

No existen referencias sobre la identificación de 4-Hidroxi-3,5,5-trimetilciclohex-2-enona. D'arcy *et al.* (1997) también identificaron 3-oxo- α -ionona en mieles de eucalipto australianas. Piasenzotto *et al.* (2003) analizaron los compuestos volátiles de varios tipos de mieles monoflorales – castaño, eucalipto, tomillo, limón, azahar y dandelion- y 3-oxo- α -ionona fue aislado solamente en las muestras de miel de eucalipto. También ha sido detectado en otras mieles como trébol procedentes de Nueva Zelanda (Sun, 1995), mieles australianas de *Eucryphia lucida* (Rowland *et al.*, 1995), mieles de *Calluna vulgaris* (Guyot *et al.*, 1998) y mieles de brezo procedentes de Nueva Zelanda (Tan *et al.* 1989a)

El dehidrovomifoliol ya había sido detectado por otros autores en mieles de eucalipto (D'arcy *et al.*, 1997; Piasenzotto *et al.*, 2003). Este compuesto ha sido identificado por otros autores en muchos otros tipos de mieles monoflorales. Está presente en mieles de *Anacardium occidentale* y *Croton sp.* (Moreira *et al.*, 2002). También ha sido identificado en mieles de *Calluna vulgaris* (Tan *et al.*, 1989a, 1989b; Sun, 1995), *Euphoria longaza* (Ichimura, 1994), mieles de tomillo (Tan *et al.*, 1990). Incluso niveles de dehidrovomifoliol de entre 56 y 264 mg/kg de miel son característicos en mieles de brezo (Häusler & Montag, 1989; 1991; Tan *et al.*, 1989a). Guyot *et al.* (1999) señalan a este compuesto como marcador botánico para las mieles de brezo.

D'arcy *et al.* (1997), cuantificaron dehidrovomifoliol en mieles de eucalipto australianas y encontraron niveles de concentración de entre 6,1 y 10,2 mg/kg de miel; no obstante, estos autores consideran que este compuesto no se trata de un descriptor de las mieles de eucalipto australianas, puesto que también ha sido identificado en otras mieles monoflorales y además a los mismos niveles de concentración a los encontrados en las mieles de eucalipto., Así, Rowland *et al.*, (1995) definieron unos niveles de dehidrovomifoliol 10,2 mg/kg de en mieles australianas de *Eucryphia lucida*.

D'arcy *et al.* (1997) también cuantificaron 3-oxo- α -ionona en mieles de eucalipto australianas y obtuvieron unos niveles de 1,4 mg/kg de miel en mieles de *Eucalyptus melliodora* y de 6,8 mg/kg en mieles de *Eucalyptus leucoxydon*. Tan *et al.* (1989a) obtuvieron concentraciones de 1,2 mg/kg de miel de 3-oxo- α -ionona en mieles de brezo procedentes de Nueva Zelanda.

Como se puede apreciar, los niveles de ambos norisoprenoides obtenidos en este trabajo son muy superiores a los señalados en la literatura. No obstante, es necesario señalar que estos autores han empleado técnicas de extracción y

cuantificación diferentes. Así, mientras que en este trabajo las concentraciones se expresan en ppm 1-cloroheptano equivalente, D'arcy *et al.* (1997) y Tan *et al.* (1989a) las expresan en mg de norisoprenoide/kg de miel y en sus análisis han empleado el patrón del compuesto a cuantificar (dehidrovomifoliol o 3-oxo- α -ionona, respectivamente).

Respecto a la etanona, este volátil tampoco ha sido identificado por ningún otro autor en mieles de eucalipto, ni en mieles de otro origen botánico diferente al de eucalipto. Sin embargo, Pérez *et al.* (2002) consideran a otro benzofurano (4,5,6,7-tetrahidro-3,6-dimetil benzofurano) como característico en las mieles de eucalipto españolas. Estos autores analizaron los compuestos volátiles de varias mieles monoflorales españolas -azahar, eucalipto, lavanda, romero y tomillo- empleando una técnica de microextracción en fase sólida y GC-EM; y para las mieles de eucalipto españolas consideraron que una concentración elevada ($117,6 \pm 11,1$ ppm) de 3-hidroxi-2-butanona y la presencia de dimetil disulfito, ácido 3-metilbutanoico y 4,5,6,7-tetrahidro-3,6-dimetil benzofurano podrían ser descriptores del origen botánico de estas mieles.

Referencias.

- ANDRADE, P.; FERRERES, F.; GIL, M.I.; TOMAS-BARBERAN, F.A. (1997). Determination of phenolic compounds in honey with different floral origin by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 60: 79-84.
- BROOM, S.J.; EDE, R.M.; WILKINS, A.L. (1992). Synthesis of (\pm)-E-4-(1, 2, 4, 6-Trihidroxi-2, 6, 6-trimethylcyclohexyl)-but-3-en-2-one: A novel Degraded Carotenoid Isolated from New Zealand Thyme Honey. *Tetrahedron Lett.*, 33: 3197-3200.
- D'ARCY, B.R.; RINTOUL, G.B.; ROWLAND C.Y.; BLACKMAN A.J. (1997). Composition of Australian Honey Extractives. 1. Norisoprenoids, Monoterpenes and Other Natural Volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) Honeys. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1834-1843.
- DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P.; VERZERA, A.; MONDELLO, L.; DUGO, P. Uruguayan Essential Oils. Part VI. Composition of lemon oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 247-255.
- EDE, R.M.; WILKINS, A.L.; LU, N.Y.; TAN, S.T. (1993). Novel Nor-Sesquiterpenoids in New Zealand Honeys. 2. Isolation and Structural Characterisation of Meliracemoic Acid. *Tetrahedron Lett.*, 34: 6795-6798.
- GUYOT, C.; BOUSETA, A.; SCHEIRMAN, V.; COLLIN, S. (1998). Floral origin markers of chestnut and lime tree honeys. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 625-633.
- GUYOT, C.; SCHEIRMAN, V.; COLLIN, S. (1999). Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chemistry*, 64: 3-11.
- GUYOT-DECKLER, C.; CHEVANCE, F.; LERMUSIEAU, G.; COLLIN, S. (2000). Optimized Extraction Procedure for Quantifying Norisoprenoids in Honey and Honey Food Products. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 5850-5855.

- HUDAIB, M.; SPERONI, E.; DI PIETRA, A.N.; CAVRINI, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29: 691-700.
- ICHIMURA, N. (1994). Volatile flavor components in longan honey. *Koryo*, 182, 133-138.
- MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C.; PIETROLUONGO, M.; DE MARIA, C.A.B. (2002). Flavor Composition of Cashew (*Anacardium occidentale*) and Marmeleiro (Croton Species) Honeys. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 7616-7621.
- PEREZ, R.A.; SANCHEZ-BRUNETE, C.; CALVO, R.M.; TADEO, J.L. (2002). Analysis of Volatiles from Spanish Honeys by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2633-2637.
- PIASENZOTTO, L.; GRACCO, L.; CONTE, L. Solid phase microextraction (SPME) to honey quality control. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 83: 1037-1044.
- RADOVIC, B.S.; CARERI, M.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; GERBOLES, M.; ANKLAM, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72: 511-520.
- ROWLAND, C.Y.; BLACKMAN, A.J.; D'ARCY, B.R.; RINTOUL, G.B. (1995). Comparison of Organic Extractives Found in Leatherwood (*Eurocypria lucida*) Honey and Leatherwood flowers and Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 753-763.
- STEEG, E. & MONTAG, A. (1988 a). Quantitative bestimmung aromatischer carboxysäuren in Honig. *Z. lebensm Untersuch Forsch*, 187: 115-120.
- SUN, Y.A. (1995). A chemical investigation of some New Zealand native honeys. M. Phil. Dissertation, University of Waikato, Hamilton, New Zealand.
- TAN, S.T.; WILKINS, A.L.; HOLLAND, P.T.; McGUIE, T.K. (1989a). Extractives from New Zealand Unifloral Honeys. 2. Degraded Carotenoids and Other Substances from Heather Honey. *J. Agric. Food Chem.*, 37: 1217-1221.
- VERZERA, A.; MONDELLO, L.; TROZZI, A., DUGO, P. (1997). On the genuineness of citrus essential oils. Part LII. Chemical characterization of essential oil of three cultivars of Citrus clementine Hort. *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 163-172.
- VERZERA, A.; TROZZI, A., MONDELLO, L.; DELLACASSA, E.; LORENZO, D. (1998). Uruguayan essential oils. Part X. Composition of the oil of Citrus clementine Hort. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 189-195.
- WILKINS, A.L.; LU, Y.; TAN, S.G. (1993). Extractives from New Zealand honeys. 4. Linalool derivatives and other components from nodding thistle (*Carduus nutans*) honeys. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 873-878.

Compuesto	IK	Concentración (extracción XAD 16)ppm	Concentración (extracción XAD 2)ppm
cis-limonene, oxide	1352	1,07±0,50	0,75±0,50
8-hidroxilinalool	1362	4,99±0,69	0,75±0,50
ethyl linalool	1331	0,28±0,10	n.d.
Lilac alcohol A	1241	0,40±0,10	0,20±0,07
Lilac alcohol D	1252	0,38±0,10	0,18±0,07
Fenol, 2,4-bis(1-1-dimetiletil)	1496	0,69±0,17	0,51±0,13
2-Cyclohexen-1-one,3,5,5- trimethyl-4-(3-oxo-butenyl	1655	1,22±0,34	1,66±0,23
2-Cyclohexen-1-one,4- hidroxi-3,5,5-4-(3-oxo-1- butenyl	1778	1,00±0,13	1,01±0,15
Benzoic acid, 1-hidroxy-3,5- dimethoxy, hidrazide	1745	2,72±0,47	0,46±0,14

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados en las mieles de azahar.

Compuesto	IK	Concentración (extracción XAD 16)ppm	Concentración (extracción XAD 2)ppm
4-hidroxi-3,5,5-trimetil-4-(3-oxo-1- butenil)ciclohex-2-en-1- one/dehydrovomifoliol	1778	3.81	2.65
4-oxo-isoforona	1223	0,26	0,31
Limoneno	1094	0.38	0.42
Eucarvona	1654	3.95	2.21
2,4-di-tert-butil-fenol	1496	1.16	1.16
Trimetilfenol	1359	3.04	2.21
Acido benzoico	1241	0.40	n.d.
Acido benceniácético	1286	0.32	0.36
Bencenetanol, α-(feniletil)-.	1396	1.39	1.62
1,2,3-trimetoxi-5-(metoximetil)- benceno	1744	2.67	2.86
P-hidroxifenil-acetonitrilo	1470	1.15	n.d.
ácido cinámico	1403	1.35	0.56

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados en las mieles de tomillo.

Compuesto	IK	Concentración (extracción XAD 16)ppm	Concentración (extracción XAD 2)ppm
4-Hidroxi-3,5,5-trimetilciclohex-2-enone	1336	0.91	0.80
2-Ciclohexen-1-one, 3,3,5-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil)-/ 3-oxo- α -ionona	1655	23.52	21.23
2-Ciclohexen-1-one-3,5,5-trimetil-4-(3-hidroxi-1-butenil)/ 3-oxo- α -ionol	1685	1.15	1.14
4-hidroxi-3,5,5-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil)ciclohex-2-en-1-one/dehydrovomifoliol	1778	30.10	17.22
2,4-di-tert-butil-fenol	1496	0.56	0.50
3,5-dimetoxi-4-benzohidracida	1745	1.86	1.93
Etanone, 1-(1a,2,3,5,6a,6b-hexahidro-3,3,6a-trimetiloxireno[g]benzofuran-5-il .	1593	1.12	1.19

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados en las mieles de eucalipto.

Clasificación de mieles monoflorales de Sierra Morena en base a parámetros físicoquímicos, sensoriales y polínicos.

S. Serrano¹, I. Rodríguez¹, H. Galán¹, J. L. Ubera², M. Jodral¹.

¹Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba.

²Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba.

Summary.

The Andalusian Sierra Morena has traditionally been a geographical area linked to the apicultural sector. Spanish honey production is prominent in the European Union, and Andalusia is one of the Autonomous Communities which occupies one of the first places on a national scale as a producer of honey and census of beekeepers. The honeys produced in this region are considered to be quality honeys appreciated by consumers. The apicultural sector of the Andalusian provinces of Huelva, Seville, Córdoba and Jaén, interested in protecting, promoting and typifying the honeys produced in the Andalusian Sierra Morena, instigated a search for the necessary means to develop and carry out this work. This characterization is directed towards the future achievement of a seal of quality protected by the European Union, i.e. Protected Designation of Origin (PDO) Sierra Morena Honey.

During the years 2006-2008 a study was made of 204 honey samples produced in the Andalusian area of Sierra Morena, made up of the provinces of Huelva, Seville, Córdoba and Jaén. The samples were collected directly from the beehives of beekeepers interested in participating in the study. In addition, a form or questionnaire was given to each one for them to fill in order to gather data on the type of honey (multifloral or unifloral), collection date, technique used in de-beeing the frames, honey extraction techniques, GPS coordinates of the geographic situation of the hives, etc.

Introducción.

La Sierra Morena andaluza ha sido tradicionalmente un enclave geográfico vinculado al sector apícola. En la Unión Europea destaca la producción de miel española, siendo Andalucía una de las Comunidades Autónomas que ocupa uno de los primeros lugares a escala nacional como productora de miel y censo apícola. Las mieles producidas en esta región son consideradas mieles de calidad y apreciadas por el consumidor.

El sector apícola de las provincias andaluzas de Huelva, Sevilla, Córdoba y Jaén, interesado en proteger, promocionar y tipificar las mieles producidas en la Sierra Morena andaluza promovió la búsqueda de los medios necesarios para desarrollar y llevar a cabo este trabajo. El gran interés despertado no sólo por este sector apícola, sino también por las Diputaciones Provinciales de las

provincias implicadas, nos ha llevado al estudio en profundidad de las mieles que aquí se producen con el fin de caracterizarlas y clasificarlas. La demanda de productos naturales diferenciados por su calidad ha ido en aumento y entre estos productos se incluye a la miel.

Este trabajo se enmarca dentro del campo de investigación científica botánico-alimentario y persigue estudiar y conocer los diversos tipos de miel que se encuentran en el mercado para posteriormente, establecer un perfil o perfiles distintivos, que caractericen al producto de un área geográfica concreta. Para ello, los análisis melissopalínológico, físico-químico y sensorial se complementan de tal modo, que proporcionan resultados sólidos que clasifican las mieles por su origen botánico y geográfico. Esta caracterización va dirigida a la futura consecución de un distintivo de calidad amparado por la Unión Europea, Denominación de Origen Protegida (DOP) Miel de Sierra Morena.

Durante los años 2006-2008 se han estudiado 204 muestras de mieles producidas en la zona andaluza de Sierra Morena conformada por las provincias de Huelva, Sevilla, Córdoba y Jaén. Las muestras fueron recogidas directamente de los colmenares de los apicultores interesados en participar en el estudio. Además, se entregaba a cada apicultor un formulario o encuesta que debía cumplimentar para recabar datos sobre tipo de miel (milflores o monofloral), fecha de recogida de la miel, técnica empleada en el desabejamiento de los cuadros, técnica empleada en la extracción de la miel, coordenadas GPS de la situación geográfica de las colmenas, etc.

Material y Métodos.

La metodología seguida para la obtención de los datos del análisis melissopalínológico y físico-químico ha sido la establecida por la International Honey Commission (IHC) o en su defecto por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC International). Para el análisis sensorial se ha utilizado un análisis descriptivo cualitativo junto con la adaptación de la metodología propuesta por la IHC.

En el análisis melissopalínológico se ha estudiado el polen contenido en la miel tanto de forma cuantitativa (se agrupan las muestras en base a su riqueza polínica en las 'Clases de Maurizio') como de forma cualitativa, estableciendo unos tipos polínicos concretos que darán lugar a mieles monoflorales y espectros polínicos característicos de la región de estudio.

En el análisis físico-químico se han evaluado los siguientes parámetros: acidez libre, acidez láctica, acidez total, actividad agua, actividad diastasa, conductividad eléctrica, color Pfund, hidroximetilfurfural, humedad y azúcares totales.

En el análisis sensorial han sido evaluados 27 atributos sensoriales: 3 para la apariencia (intensidad del color, fluidez para las mieles en estado líquido y tamaño de cristal para las mieles en estado sólido), 6 de olor (intensidad global del olor, olores: floral, frutal, vegetal, tostado y animal), 3 de textura en

boca (viscosidad para mieles en estado líquido y pastosidad y tamaño de cristal para mieles en estado sólido), 10 sensaciones olfato-gustativas (4 sabores básicos: dulce, salado ácido y amargo; 6 de aroma: intensidad global del aroma, aroma a flor, frutal, vegetal, tostado y animal), 3 sensaciones trigeminales (picor, frescor y astringencia), la persistencia y el retrogusto.

La segunda parte del estudio se ha entrado en la caracterización llevada a cabo mediante el estudio de los datos o resultados obtenidos con el fin de establecer criterios de caracterización para cada tipo de miel.

Resultados y Discusión

Para la DOP Miel de Sierra Morena se establecieron unos criterios analíticos físico-químicos generales. Así, el contenido en humedad de las mieles será $\leq 17,5\%$ excepto para las mieles de azahar que podrán presentar contenido en humedad hasta un $18,5\%$. El hidroximetilfurfural que contengan las mieles en ningún caso podrá superar el 28 mg/Kg y la acidez libre no podrá ser superior a 35 mEq/litro .

Respecto a las características melisopolinológicas generales para todo tipo de miel de Sierra Morena, se establece que las mieles deberán presentar el espectro polínico característico de la zona, definido mayoritariamente por los tipos polínicos *Myrtus*, *Echium*, *Lavandula*, *Reseda*, Leguminosa, *Quercus*, *Olea*, *Crataegus* y *Cistus*. Siempre condicionado a que el contenido de polen tipo *Helianthus* sea $< 10\%$ del espectro total de la muestra.

Las mieles de castaño (*Castanea sativa*) se caracterizan por los siguientes criterios: Contenido polínico de *Castanea sativa* $\geq 60\%$ y clase de Maurizio III; color Pfund $\geq 70\text{mm}$; Conductividad eléctrica $\geq 1,3 \text{ mS/cm}$; Actividad diastasa 19-25 grados Gothe. Sensorialmente las mieles de castaño de Sierra Morena son de color ámbar rojizo, destaca una alta intensidad olfativa y aromática con notas químicas, a madera y a resina. Poseen un sabor amargo y salado. Su persistencia es alta.

Las mieles de brezo (*Erica australis*, *Erica arborea*) se caracterizan por los siguientes criterios: Contenido polínico de *Erica australis* y/o *Erica arborea* $\geq 50\%$ y clase de Maurizio II; color Pfund $> 100 \text{ mm}$; Conductividad eléctrica $\geq 0,7 \text{ mS/cm}$; Actividad diastasa 12-26 grados Gothe. Las mieles de brezo de Sierra Morena son de color ámbar rojizo/naranja, tienen una intensidad olfativa y aromática media con notas balsámicas a regaliz, hinojo y anís. Tienen sabor medianamente amargo, son astringentes y su persistencia es alta.

Las mieles de azahar (*Citrus sp.*) se caracterizan por los siguientes criterios: Contenido polínico de *Citrus sp.* $\geq 5\%$ y clase de Maurizio I (II); color Pfund $\leq 20\text{mm}$; Conductividad eléctrica $\leq 0,25 \text{ mS/cm}$; Actividad diastasa 6-20 grados Gothe. Sensorialmente las mieles de azahar de Sierra Morena se caracterizan por ser de color blanco a amarillo muy claro, ser mieles fluidas, poseen una media-fuerte intensidad de olor y aroma con notas a azahar y en algunos

casos a jazmín y/o dama de noche. Son mieles de sabor dulce, y ligeramente ácidas, frescas, picantes y de persistencia media.

Las mieles de viborera (*Echium plantagineum*) se caracterizan por los siguientes criterios: Contenido polínico de *Echium plantagineum* $\geq 85\%$ y clase de Maurizio (II) III (II); color Pfund ≤ 20 mm; Conductividad eléctrica $\leq 0,25$ mS/cm; Actividad diastasa 6-20 grados Gothe. Las mieles de viborera de Sierra Morena son de color blanco-amarillo muy claro. Su intensidad olfativa y aromática es relativamente baja, claramente vegetal, con notas balsámicas a alcanfor y resina, también presentan notas a madera, vegetal cocido y a col. Su sabor es bastante dulce, su pastosidad es baja, su cristalización es muy fina y su persistencia es baja-media.

Las mieles de monte de Sierra Morena son un tipo de miel bifloral en las que los tipos polínicos *Echium* y *Myrtus* deben suponer $\geq 80\%$ del espectro polínico, siempre que el tipo *Myrtus* sea $\geq 50\%$ del espectro total. Pertenecen a la clase de Maurizio II (III); color Pfund 45-80 mm; Conductividad eléctrica 0,35-0,75 mS/cm; Actividad diastasa 9-32 grados Gothe. El análisis de resultados indica que las mieles de monte de Sierra Morena presentan un perfil sensorial definido por un color que varía del amarillo al ámbar, una fluidez que oscila entre media y espesa, junto con una intensidad olfativa y aromática medio-fuerte con notas en nariz a regaliz y madera, notas torrefactas y animal y en boca a fruta madura, higos pasos y naranja confitada. Su sabor es dulce, salino y ligeramente ácido. Su persistencia es media.

Las mieles de cantueso (*Lavandula stoechas*) se caracterizan por los siguientes criterios: Contenido polínico de *Lavandula stoechas* $\geq 12\%$ y clase de Maurizio II-III; color Pfund ≤ 55 mm; Conductividad eléctrica $\leq 0,45$ mS/cm; Actividad diastasa 13-25 grados Gothe. Sensorialmente las mieles de cantueso de Sierra Morena se caracterizan por tener un color amarillo, baja fluidez, baja intensidad olfativa y aromática con notas florales en nariz y florales y frutales en boca. Son medianamente dulces y su persistencia es baja.

Las mieles de eucalipto de nuestro estudio han dado lugar a dos perfiles sensoriales completamente distintos. Para buscar respuesta a este fenómeno se procedió a medir el tamaño de los granos de polen tipo *Myrtus*. La conclusión fue que los granos de menor tamaño correspondían a *Myrtus communis*, arbusto muy extendido por la zona, responsable de uno de los perfiles, mientras que los granos de polen de mayor tamaño procedían de *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus*. El análisis físico-químico determinó unos criterios comunes a estos dos perfiles, estableciendo un contenido polínico $\geq 85\%$ del espectro total de la miel, un color Pfund 40-60 mm, una conductividad eléctrica de 0,38-0,58 mS/cm; Actividad diastasa 8-29 grados Gothe. El perfil sensorial de las mieles de *Myrtus communis* se caracteriza por el color amarillo de las mieles y por una intensidad olfativa y aromática medio-alta con notas olfativas a regaliz, café y chocolate y en boca afrutadas a naranja confitada. Tienen una pastosidad media y su cristalización es gruesa. Presentan un sabor salado medio. Son mieles frescas

al igual que las mieles del perfil anterior, con una persistencia media y algo picantes. El perfil sensorial clásico de la miel de eucalipto se caracteriza por presentar color ámbar junto con una intensidad olfativa y aromática media con notas en nariz animal y notas a madera y vainilla en nariz y boca. Su pastosidad es baja y su cristalización es muy fina. Poseen un ligero sabor salado, son mieles frescas y medianamente persistentes

Finalmente para la miel milflores se establecieron rangos debido a su gran variabilidad. El espectro polínico presentado por la miel milflores de Sierra Morena será el característico de la zona geográfica (criterios generales descritos anteriormente) y corresponderán a la clase de Maurizio II. Su color Pfund variará entre 10-90 mm, su conductividad eléctrica oscilará entre 0,22-0,85 mS/cm, su actividad diastasa entre 8-34 grados Gothe. Sensorialmente las mieles de milflores de Sierra Morena presentan un perfil sensorial amplio. Así, el color varía desde el blanco al ámbar. Las texturas son líquidas o cristalizadas; el perfil olfativo incluye todas las familias de olor/aroma analizadas (floral, frutal, vegetal, torrefacto y animal) y el sabor es dulce y/o ácido, salado y amargo. Poseen un perfil olfativo con notas vegetales (regaliza, cera y resina) y tostadas en nariz y a fruta madura en boca. Su persistencia es medio-baja.

Conclusiones

Tras realizar el estudio estadístico de los resultados a través del Análisis de Componentes Principales, se comprueba que es posible autenticar 6 de los 8 tipos de miel estudiados. El porcentaje de explicación que aportan 4 factores principales es del 50%. Si bien este porcentaje es inferior a aquellos presentados por otros autores que han realizado el mismo tipo de análisis para diferentes mieles, no se encontró algún estudio similar a éste que aúne tres orígenes de variables (melissopalinológicas, físico-químicas y sensoriales), por lo que atribuimos tales porcentajes a la amplitud del ámbito del estudio estadístico. No obstante, los tipos florales resultan definidos y caracterizados salvo la miel de milflores por su extrema variabilidad y la miel de cantueso que no presentó un perfil consistente.

Referencias.

- Accorti, M., Persano Oddo, LP., Piazza, M.G.; Sabatini, A.G. 1986. Schede di caratterizzazione delle principali qualità di miele italiano. *Apicoltura* 2 (App.):5-35.
- Anklam, E. 1998. A review of the analytical methods to determination the honey. *Food Chemistry* 63: 549-562.
- Bogdanov, S.; Martín, P.; Lullmann, C. 1997. *Harmonized* methods of the European honey commission. *Apidologie*, 59.
- Bogdanov, S; Ruoff, K; Persano Oddo, L. 2004. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 35: 4-17.

- Ferrazzi, P. 1992. Caratterizzazione dei mieli: analisi melissopalino-logiche. *Apicolt.* Mod.83:1 29-138
- Galán-Soldevilla, H., Ruiz-Pérez-Cacho, M.P. Serrano, S., Jodral, M. 2005. Development of a Preliminary Sensory Lexicon of Floral Honey by Multivariate Statistical Procedures. *Food Quality and Preference*, 16: 71-77.
- Gómez Pajuelo, A. 2004. Mieles de España y Portugal. Montagud Editores. Barcelona. España.
- Gonnet, M., Vache, G. 1998. Analyse sensorielle descriptive de quelques miels monofloraux de France et d'Europe. Editions Abeille de France, Paris, France.
- Gonnet, M.; Vache, G. 1990. El sabor de la miel. Edizioni Apimondia, Bucarest.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. 1978. International Commission for Bee Botany of IUBS. Methods of Melissopalynology. *Bee World* 59 (4): 139-157.
- Mateo, R., Bosch-Reig, F. 1998. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *J. Agric. Food Chem.* 46:393-400.
- Persano Oddo, L., Piana, L., Sabattini, A.G. 1995. Conoscere il miele: Guida all'analisi sensoriale. Avenue Media. Bologne. Italia.
- Persano Oddo, L., Piro, R. 2004. Main European Unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 35 (Suppl. I), S38-S81.
- Soria, A.C.; González, M.; De Lorenzo, C.; Martínez-Castro, I.; Sanz, J. 2004. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry*, 85 (1): 121-130.

Propiedades funcionales y nutricionales de polen de abeja: Influencia de su origen floral.

D. Domínguez Valhondo, D. González Gómez, D. Bohoyo Gil, T. Hernández.

Instituto Tecnológico Agroalimentario (INTAEX). Ctra. San Vicente SN 06071 Badajoz.

Resumen.

El objeto de este estudio ha sido determinar la composición nutricional y funcional de dos tipos de polen de distinto origen floral. En concreto se estudió un polen tipo multifloral y otro monofloral de Jara (*Cistaceae C.*).

Abstract.

The aim of this work was the evaluation of the nutritional and the bioactive compounds composition of two type of honey-bee collected pollens of different floral origin; multifloral and monofloral type pollen (from *Cistaceae C.* flowers).

Introducción.

El polen de abeja es un producto apícola usado en la dieta humana debido a sus valores nutricionales. Supone una fuente importante de proteínas y aminoácidos para las abejas, así como de lípidos, ácidos grasos, esteroides, vitaminas, minerales y ciertos carbohidratos. El polen es almacenado en celdas y es mezclado con miel, néctar y secreciones glandulares de la abeja. Almacenado de esta manera sufre una fermentación láctica transformándose en lo que se conoce como *Pan de Abeja*, que además lleva asociado una flora bacteriana específica.

Material y Métodos.

Se dispone de dos muestras de polen: monofloral y multifloral en función de su origen floral.

Caracterización Nutricional: Humedad: determinación por calentamiento en estufa a 70 °C y aplicación de vacío, durante 24 horas. Actividad de agua: medida directa con el equipo Lab-Master Aw, Novasina. Fracción lipídica: extracción de la grasa del polen por el método Soxhlet, utilizando como disolvente hexano. Carbohidratos: mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con columna tipo amino de 4.6x250 mm, la elución fue modo isocrático con una composición acetonitrilo:agua, utilizando para su detección un detector refractométrico. Ácidos grasos: determinación cualitativa y cuantitativa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, obtenidos por reacción de transesterificación. Para la detección se emplea un detector de ionización de llama (FID). Minerales: espectroscopia atómica, ya

sea de absorción (Ca y Mg; Zn, Cu, Fe y Mn) o emisión (Na y K) previa digestión húmeda a alta presión en un digestor microondas en medio oxidante. Para la determinación de P, se utiliza el método colorimétrico del vanadato-molibdato amónico. Fibra dietética: método enzimático-gravimétrico, que consiste en el tratamiento de la muestra con α -amilasa termoestable, tras lo cual se somete a digestión enzimática con pancreatina y amiloglicosidasa para eliminar las proteínas y el almidón. A la solución resultante de la digestión se le añade etanol para precipitar la fibra alimentaria soluble que es determinada por gravimetría. Proteínas: la determinación de nitrógeno se lleva a cabo con el Método Kjeldahl y utilizando el factor 6.25 para su conversión a proteínas. Aminoácidos Libres: mediante el autoanalizador de aminoácidos Biochrom, con columna de intercambio iónico y detección fotométrica ultravioleta-visible, utilizando como reactivo derivatizante la ninhidrina.

Caracterización Funcional: Fenoles: para la determinación de fenoles totales se utiliza el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu. (Lima *et al.*,2005). Para la identificación de dichos compuestos se lleva a cabo el método descrito por González-Gómez *et al.*,(2010). Actividad antioxidante total: se utiliza el método desarrollado por Cano *et al.*,(1998). Carotenos: mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC),con columna C18 de 10 μ m de diámetro de partícula, fase móvil acetonitrilo/agua con elución en gradiente y detector Uv-Vis.

Resultados y Discusión.

Análisis estadístico de resultados. Para el estudio estadístico se realizó el test de Student, para detectar diferencias significativas entre la media de los valores (n=4). Letras diferentes dentro de una misma columna muestran la existencia de diferencias significativas entre las diferentes muestras ($p < 0.05$).

Análisis nutricional del polen.

Los valores de Humedad y Actividad de agua, Aw, (parámetro que nos indica la cantidad de agua libre para el crecimiento de microorganismos), están estrechamente relacionados entre sí y determinan la calidad microbiológica y organoléptica del polen, así como su vida útil (Serra Bonvehí y Escolá Jordá, 1997). Para comercializar el producto es necesario reducir el contenido de humedad por debajo del 8% (Tautz, 2010) y el valor de Aw por debajo de 0.62, evitando así el crecimiento de levaduras (Collin *et al.*, 1995). Esto se consigue con técnicas de secado, generalmente con aire caliente. Ambos valores son mayores para el polen monofloral tipo Jara.

El contenido de grasa se encuentra entre el 2.86 y 3.03 %, estos valores son inferiores a los determinados por Serra Bonvehi y Escolá Jordá, (1997) para pólenes españoles, que obtuvo un valor medio de 5.91%.

El contenido en carbohidratos para ambos tipos de polen es similar, siendo el contenido en el polen monofloral ligeramente superior al multifloral. Se ha estudiado fructosa y glucosa, que además de ser los mayoritarios, son los

afectados por los procesos de pardeamiento no enzimático que sufre el polen durante el secado y/o almacenamiento y sacarosa, siendo los niveles de éste, en ambas variedades de polen, el minoritario.

Con respecto al contenido de fibra dietética no existen diferencias significativas entre las muestras. En el caso de las proteínas sí existen diferencias significativas entre el origen floral del polen. Valores similares obtienen otros investigadores como Serra Bonvehí y Escolá Jordá, (1997) que encontraron valores medios de fibra dietética de 13.7 y de 15.3 % para el caso de las proteínas ó Almeida Muradian *et al*, (2005) con un valor medio de proteínas del 20%.

Los ácidos grasos mayoritarios presentes en el polen son: oleico (C18:1), palmítico (C16:0) y palmitoléico (C16:1). La relación de ácidos grasos insaturados/saturados es de 1.74 para el polen multifloral y de 2.33 para el polen monofloral. Las dietas actuales tienden a reducir la cantidad total de grasas y colesterol y alcanzar una relación de ácidos grasos insaturados/saturados mayor que 1.

Los minerales mayoritarios encontrados fueron potasio, fósforo, calcio y magnesio. Serra Bonvehí *et al*, (1997) encontraron que los elementos mayoritarios fueron potasio, magnesio, calcio y sodio. El contenido mineral del polen depende tanto del origen floral como de las condiciones de crecimiento (suelo, origen geográfico, etc.).

El aminoácido mayoritario en ambos tipos de polen es la prolina, aminoácido esencial para las abejas. Su contenido varía, aumentando durante el almacenamiento del polen, lo que es de interés en estudios de envejecimiento de este producto (Muniategui *et al*, 1990).

Análisis funcional del polen: Los compuestos funcionales son compuestos bioactivos que se caracterizan por su acción antioxidante, es decir, neutralizan la acción de los radicales libres evitando la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y desempeñan una función fundamental en la prevención de enfermedades. Además, tienen gran importancia a nivel farmacológico, nutricional y agroalimentario.

El polen multifloral fresco presenta contenidos significativamente superiores en fenoles totales y carotenos totales, al igual que un mayor valor de actividad antioxidante total.

Conclusiones.

El polen tiene un importante valor nutricional debido a su alto contenido en carbohidratos y minerales, así como un bajo porcentaje de grasas, siendo el ácido oleico (Omega-9) el ácido graso mayoritario. Supone también un aporte considerable de fibra, aminoácidos libres y proteínas.

De los análisis realizados podemos deducir que el polen multifloral fresco presenta contenidos superiores en fenoles y carotenos totales, así como un mayor valor de actividad antioxidante total que el polen monofloral fresco.

En general, existen diferencias significativas para los compuestos nutricionales y funcionales en función del origen floral del polen. Mencionar que ciertos aminoácidos aparecen en el polen multifloral y no en el monofloral, como son Asn, Glu, Tyr y Phe.

Agradecimientos.

Los autores agradecen a la Dirección General de Ciencia y Tecnología de la Junta de Extremadura y al Fondo Social Europeo (Proyecto PDT09B002) por su financiación. Las muestras evaluadas en este trabajo fueron proporcionadas por Euromiel Soc. Coop. Seg. Grado. de Extremadura (España).

Bibliografía.

- Almeida Muradian B., L. C. Pamplona, S. Coimbra, O. M. Barth. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 18: 105-111.
- Cano A., M. Acosta, M.B. Arnao. 2000. A method to measure antioxidant activity in organic media: Application to lipophilic vitamins". *Redox Report*. 5: 365-370.
- Collin S., T. Vanhavre, E. Bodart And A. Bouseta. 1995. Heat Treatment of Pollens: Impact on their Volatile Flavor Constituents. *J. Agric. Food Chem.* 43: 444-448.
- González-Gómez D., Mercedes Lozano, María F. Fernández-León, María J. Bernalte, María C. Ayuso y Ana B. Rodríguez. 2009. Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC/DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain)". *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Lima V. et al. 2005. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages". *Food Chemistry*, 90: 565-568.
- Muniategui S., M.T. Sancho, J.F. Huidobro y J. Simal. 1990. Estudio del contenido de proteína y prolina libre en muestras de polen apícola manufacturado". *Rev. Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*. 30: 545-550.
- Serra Bonvehí J., R. Escolá Jordá. 1997. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 45: 725-732.
- Tautz, Jürgen Abejas en un mundo biológicamente extraordinario. Acribia, Zaragoza.

Aportación a las características de producción de la miel de Barrilla.

A. Falcón, R. Millán, E. Sanjuán, E. Pérez, M. Millán, C. Mauricio, C. Carrascosa.

Higiene Inspección y Control Alimentario. Facultad de Veterinaria de la ULPGC.

Introducción.

En la actualidad existen en Canarias alrededor de 3000 especies de plantas superiores de las que 200 se introdujeron con fines ornamentales, forestales o agrícolas, siendo el resto plantas autóctonas. La evolución natural experimentada por numerosas plantas ha originado los más de 500 endemismos que se conocen destacando entre ellas las conocidas como Barrillas. Dos de ellas del género *Mesembryanthemum*: barrilla o escarchada (*M. crystallinum*) y cocobarrilla (*M. nodiflorum*).

Estas plantas son anuales, rampantes, con tallos carnosos, Son propias de la zona basal o de costa de cotas inferiores a 300 metros, que se caracteriza por la escasez de lluvia, temperaturas medias que superan los 20°C y alto grado de insolación.

La floración de ambas se produce en los meses de Marzo a Julio en los que aparecen unas flores características (grandes en *M. crystallinum* y más pequeñas en *M. nodiflorum*). Estas flores son nectíferas y poliníferas.

La miel que se obtiene a partir del néctar de las flores de las barrillas es una miel blanca cremosa debido a su tendencia a cristalizar rápidamente, de sabor dulce característico y toques débilmente ácidos.

Se considera una miel de gourmet, de una producción aproximada de 25.000 a 30.000 kg anuales en el Archipiélago, y toda ella se comercializa en las propias Islas, siendo muy apreciada y de gran demanda.

Este trabajo se centró en realizar una primera aproximación a la caracterización de la miel obtenida de estas plantas.

Material y Métodos.

Se analizaron muestras de miel de barrilla, facilitadas directamente por los apicultores, procedentes de distintos puntos de la isla de Gran Canaria (zonas de costa) obtenidas durante el año 2009. Las muestras llegaron envasadas en frascos de vidrio limpios, de 500 ml de capacidad con tapa metálica.

La preparación de las muestras se llevó a cabo de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis para la miel (AOAC, 2000). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado, siendo los resultados que se exponen en la Tabla, medias aritméticas de los mismos.

Determinación de parámetros físico-químicos: Los parámetros físico-químicos determinados fueron: pH y Actividad del agua.

Grado de envejecimiento de la miel: El grado de envejecimiento de la miel se obtuvo midiendo los siguientes parámetros: Actividad diastásica e Hidroximetilfurfural (HMF)

Resultados.

Los pH detectados en las muestras de miel de barrilla del presente estudio, mostraron valores que oscilaron entre 3,60 y 3,87, considerados como normales para mieles de origen floral.

Los resultados obtenidos de actividad del agua en las muestras de miel de barrilla del presente estudio, presentaron valores que oscilaron entre 0,513 y 0,594, considerados como normales para este tipo de alimento.

Los valores detectados en las muestras de miel de barrilla estudiadas en el presente trabajo estuvieron comprendidos entre 10,65º y 14,93º.

Las mieles de barrilla estudiadas en el presente trabajo, presentaron valores de HMF comprendidos entre 6,74 mg/kg y 31,88 mg/kg.

Es de importancia señalar que todas las muestras de miel de barrilla analizadas para el presente estudio cumplieron las exigencias legales en cuanto a los parámetros analizados, actualmente exigidas por el RD 1049/2003 por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel.

Bibliografía.

- Anónimo. (2003). Real Decreto 1049/2003 de 1 de agosto de 2003, por el que se aprueba la norma de calidad relativa a la miel. BOE, 186: 30181-30183.
- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17 th ed. Virginia. USA: Arlington.
- AOAC. (2003). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17 th ed. Revision 2. Volume II. Food composition; Aditives; Natural contaminants. Horwitz, William. Gaithersburg. Maryland. 20877-2417 USA.
- Bogdanov, S. (2002). Harmonised Methods of the Internacional Honey Comision: Introduction and General Comments on the Methods, Switzerland.
- Chataway, H. D. (1932). Determination of moisture in Money. Can. J. Res., 6, 532-547.
- Wedmore, E.B. (1955). The accurate determination of the water content of honey. I. Introductions and results. Bee World, 36 (11), 197-206.
- White, J.W. Jr. (1992). Quality evaluation of honey. Role of HMF and diastase assays. American Bee Journal, 132 (11/12), 737-742, 792-794.

Variable	Mediana (IQR)
pH	3,72 (3,66 ; 3,76)
Actividad del agua (aw)	0,5465 (0,5360; 0,5520)
Actividad diastásica (° Schade)	11,78 (10,82; 12,88)
Hidroximetilfurfural (mg/kg)	9,21 (8,60; 12,12)

Tabla 1. Resultados de las variables analizadas, expresados como medianas y rangos intercuartílicos (IQR).

Ácidos D-Glucónico, Cítrico y L-Málico en las mieles de Barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) de Gran Canaria.

A Jiménez-Pulido¹, E Sanjuán², R. Millán², M. A. Fernández-Muiño¹, M. T. Sancho¹. Correo electrónico: mtsancho@ubu.es.

¹Universidad de Burgos. Facultad de Ciencias. Área de Nutrición y Bromatología. Plaza de Misael Bañuelos s/n. 09001 Burgos (Castilla y León).

²Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Facultad de Veterinaria. Área de Nutrición y Bromatología. Campus de Arucas. 35416 Arucas. Las Palmas de Gran Canaria (Islas Canarias).

Introducción.

La barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) está presente en todas las Islas Canarias, dónde sustituye al césped en áreas costeras (Figura 1).

La miel procedente de esta especie es muy demandada, siendo su venta casi inmediata a la comercialización.

En este trabajo, colaborativo entre las Universidades de Burgos y Las Palmas de Gran Canaria se ha realizado una investigación preliminar para caracterizar a las mieles de barrilla, en la que se han cuantificado las concentraciones de los tres principales ácidos orgánicos no aromáticos (D-glucónico, cítrico y L-málico), que han demostrado ser potencialmente útiles para la tipificación botánica y geográfica de la miel (1). En este alimento, los ácidos orgánicos contribuyen decisivamente en las actividades antioxidante y antibacteriana (2,3).

La cantidad de ácido glucónico presente en la miel depende de la fortaleza de la colonia de abejas, la calidad y cantidad de néctar y mielatos que llegan a la colmena, y del tiempo necesario para que el néctar y los mielatos se transformen en miel.

El resto de ácidos orgánicos no aromáticos de la miel proceden directamente del néctar o los mielatos, o se forman a partir de la fructosa, glucosa y sacarosa del néctar mediante enzimas secretadas por las abejas. Muchos de ellos son intermediarios del Ciclo de Krebs o de otras rutas enzimáticas similares (4).

Material y Métodos.

Muestras

Este trabajo se ha llevado a cabo sobre seis muestras representativas de miel de barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) procedentes de la isla de Gran Canaria y conservadas hasta el momento de su análisis a -4 °C.

Métodos

Los ácidos orgánicos no aromáticos se han determinado empleando los ensayos UV de Boehringer-Mannheim, realizando las lecturas espectrofotométricas a 340 nm.

El ácido D-glucónico es fosforilado por el ATP en presencia de gluconato quinasa a D-gluconato-6-fosfato formándose simultáneamente ADP. Posteriormente, el D-gluconato-6-fosfato sufre una descarboxilación oxidativa a ribulosa-5-fosfato en presencia de dinucleótido de adenina y NADP mediante la acción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, generándose dinucleótido de adenina y NADPH. La cantidad de NADPH formada es equivalente a la cantidad de ácido D-glucónico total presente en la muestra. Para asegurar la ruptura de la D-gluconolactona se ha llevado la solución de miel a pH 10,5 durante 10 minutos y a continuación se ha disminuido el pH a 7,8 (5).

El ácido cítrico se ha analizado, previa clarificación de la miel con polivinilpirrolidona (PVPP), que mejora la precisión y exactitud del análisis (6). El ácido cítrico es transformado en oxalacetato y acetato mediante reacción catalizada por la citrato liasa. El oxalacetato y su producto de descarboxilación (piruvato) son reducidos a L-malato y L-lactato por el dinucleótido de adenina y el NADH en presencia de las enzimas L-malato deshidrogenasa y L-lactato deshidrogenasa. La cantidad de NADH oxidada durante las reacciones equivale a la cantidad de ácido cítrico presente en la muestra.

El ácido L-málico se ha cuantificado empleando un micrométodo enzimático (7) mediante el cual el ácido L-málico se oxida a oxalacetato por medio del dinucleótido de adenina y del NAD en presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa. Posteriormente el oxalacetato se convierte en L-aspartato en presencia de L-glutamato mediante la reacción catalizada por la enzima glutamato oxalacetato transaminasa. Durante todo este proceso se forman NADH y 2-oxoglutarato. La cantidad de NADH generada es equivalente a la concentración de ácido L-málico de la miel.

Resultados y Discusión.

Los contenidos de los tres principales ácidos orgánicos no aromáticos de las muestras de miel barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) procedentes de Gran Canaria han mostrado que las mieles de esta especie son de baja acidez, lo que es interesante desde el punto de vista de la Nutrición para los consumidores que manifiestan una hipersensibilidad hacia el consumo de mieles con acidez libre elevada.

En la Figura 2, se encuentran recogidos los resultados de la determinación del ácido D-glucónico total (g/kg) en las 6 mieles de barrilla analizadas. El promedio obtenido para el ácido D-glucónico ha sido de 3,89 g/kg, la mediana 3,53 g/kg y los valores mínimo y máximo de 3,47 y 5,42 g/kg, respectivamente, con una desviación estándar de 0,769.

El promedio obtenido para el ácido cítrico ha sido de 82,78 mg/kg, la mediana de 58,44 mg/kg y los valores mínimo y máximo de 42,32 y 145,16 mg/kg, respectivamente, con una desviación estándar de 48,116 (Figura 3).

El promedio obtenido para el L-málico ha sido de 74,33 mg/kg, la mediana de 69,37 mg/kg y los valores mínimo y máximo de 8,30 y 139,65 mg/kg, respectivamente, con una desviación estándar de 46,614 (Figura 4).

Se ha encontrado una relación polinómica de orden 2 entre los contenidos de ácido cítrico y L-málico (mg/kg) en las mieles de barrilla analizadas, con un coeficiente de correlación de 0,9499, lo que pone de manifiesto que estos dos ácidos orgánicos están correlacionados en las muestras de esta especie botánica (Figura 5). Sería interesante investigar si esta relación se mantiene analizando un número mayor de mieles de distintas cosechas, puesto que podría constituir una característica diferencial de las muestras de barrilla con respecto a otras mieles.

Referencias.

1. ANKLAM E (1998): A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 63, 549-62.
2. GHELDOF N, WANG XH, ENGESETH NJ (2002): Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5870-77.
3. BOGDANOV S (1997): Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm.-Wis. U.-Technol.* 30, 748-53.
4. WHITE, JW Jr. (1978): Honey. En: *Advances in food Research*. Ed. Board. Academic Press. New York. USA. Vol. 24, pp 287-364.
5. MATO I, HUIDOBRO JF, SÁNCHEZ MP, MUNIATEGUI S, FERNÁNDEZ-MUIÑO MA, SANCHO MT (1997): Enzymatic determination of total D-gluconic acid in honey. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3550-3.
6. MATO I, HUIDOBRO JF, CENDÓN V, MUNIATEGUI S, FERNÁNDEZ MUIÑO MA, SANCHO MT (1998a): Enzymatic determination of citric acid in honey by using polyvinylpyrrolidone clarification. *J. Agric. Food Chem.* 46, 141-4.
7. MATO I, HUIDOBRO JF, SÁNCHEZ MP, MUNIATEGUI S, FERNÁNDEZ MUIÑO MA, SANCHO MT (1998b): Enzymatic determination of L-malic acid in honey. *Food Chem.* 62, 503-8.



Figura 1.- *Mesembryanthemum crystallinum* L.

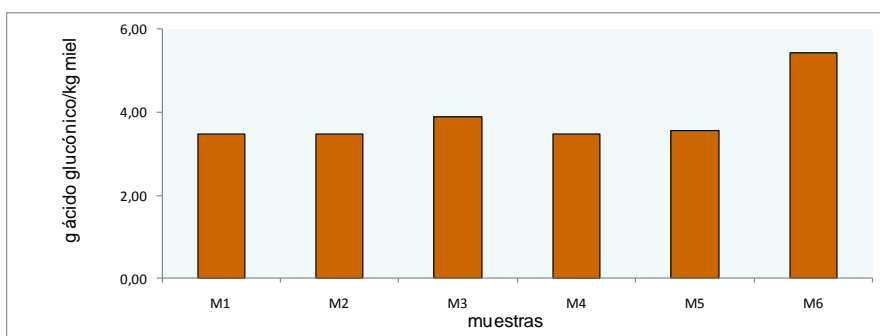


Figura 2: Contenidos de ácido D-glucónico (g/kg) en las mieles de barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) procedentes de Gran Canaria.

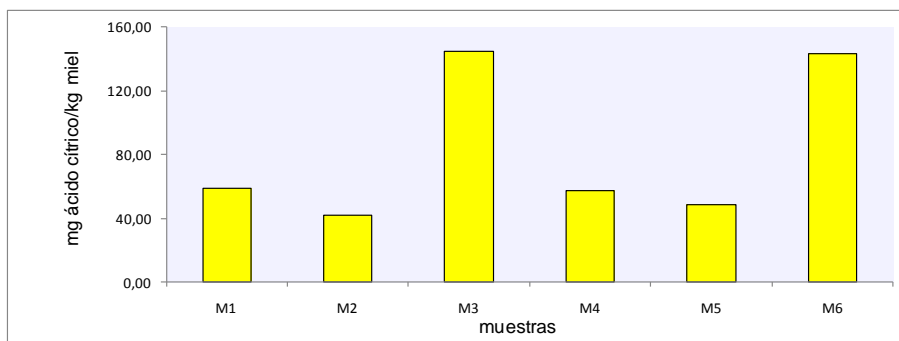


Figura 3: Contenidos de ácido cítrico (mg/kg) en las mieles de barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) procedentes de Gran Canaria.

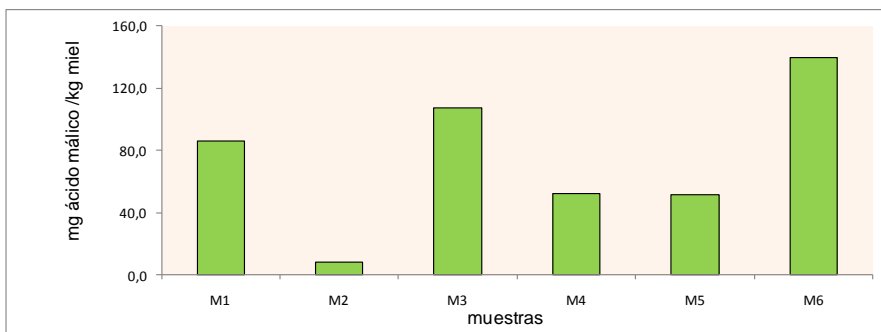


Figura 4: Contenidos de ácido L-málico (mg/kg) en las mieles de barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) procedentes de Gran Canaria.

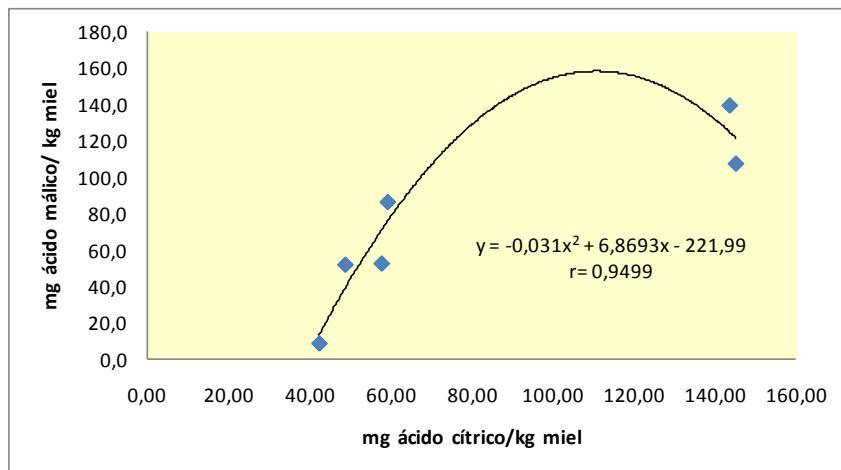


Figura 5: Correlación entre los contenidos de ácido cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) en las mieles de barrilla (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) procedentes de Gran Canaria.

Determinação do teor de polifenóis totais por FTIR-ATR.

O. Anjos¹, A. Fernandes¹, C. Gouveia¹, F. Peres¹ J. C. Rodrigues²

¹ Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Castelo Branco, Portugal

² Instituto de Investigação Científica e tropical, Lisboa, Portugal

Resumo

As análises físico-químicas do mel são morosas, sendo por isso objectivo deste trabalho estudar um método rápido para avaliar alguns parâmetros físico-químicos do mel, nomeadamente o teor de fenóis totais.

Neste trabalho foram utilizadas 28 amostras de mel monofloral de diferentes proveniências botânicas, entre as quais se destacam, a urze, o rosmaninho, a laranjeira, o eucalipto e a alfarrobeira. O teor em fenóis totais foi determinado utilizando o método de *Folin-Ciocalteu*, usando o ácido gálico como padrão.

A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada na caracterização de plantas e madeiras, através de calibração prévia com amostras analisadas por métodos de referência. Neste contexto, as mesmas amostras foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com o equipamento Bruker FT-IR (Alpha) com um acessório de reflectância total atenuada (ATR). Os fenóis totais variaram consideravelmente entre 90 e 931mg GAE/Kg, sendo que os teores mais elevados correspondiam aos méis de urze.

A metodologia proposta neste trabalho revela-se promissora para a determinação do teor de fenóis totais do mel, bem como outros parâmetros físico-químicos, no sentido de se obterem modelos de predição através da modelação PLS-R com elevados coeficientes de determinação.

Introdução

O mel é uma solução saturada de açúcares (frutose - 38% e glicose - 31%) contendo outros constituintes como compostos fenólicos, minerais, proteínas, aminoácidos, enzimas e vitaminas (Alvarez-Suarez et al., 2010).

O mel é rico em compostos fenólicos que são antioxidantes naturais. Alguns estudos mostram que os antioxidantes fenólicos do mel estão biodisponíveis, pelo que a substituição de alguns edulcorantes tradicionais, usados em alimentos, pelo mel pode resultar numa melhoria do sistema de defesa antioxidante em adultos saudáveis (Alvarez-Suarez et al., 2010, Meda et al., 2005, Gheldof e Engeseth, 2002)

Velazquez et al (2009) conseguiu bons resultados utilizando FTIR – ATR para identificar méis adulterados reconhecer proveniências geográficas. No entanto, poucos são os estudos que têm sido efectuados recorrendo a esta metodologia pelo que são objectivos deste trabalho dar um contributo no sentido da avaliação do teor de compostos fenólicos do mel por FTIR – ATR.

Material e Métodos

Diferentes méis monoflorais comerciais foram usados neste estudo: Eucalipto; Erica, Lavandula, Ceratonia e Citrus. Para cada mel monofloral foram analisadas diferentes amostras: *Eucalipto* – 5 amostras; *Erica* – 7 amostras; *Lavandula* – 8 amostras; *Ceratonia* – 2 amostras e *Citrus* – 6 amostras.

Para todas as amostras determinou-se: o teor de humidade, aw, cor, cinza, pH, acidez livre e condutividade eléctrica, de acordo com os métodos adoptados pela Comissão Internacional de Mel (Bogdanov, 2002) e pelas normas Portuguesas (NP-1307, 1976).

O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu modificado e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por Kilograma de mel (GAE/Kg de mel).

Os diferentes parâmetros foram analisados recorrendo à análise de componentes principais e análise de variância. Os espectros em FTIR – ATR foram obtidos com um espectrómetro Bruker FT-IR (Alpha) com um acessório de reflexão total atenuada (ATR) com uma janela de diamante.

Efectuou-se um duplicado de espectros por amostra obtidos com 32 varrimentos por espectro a uma resolução espectral de 4 cm^{-1} no intervalo de número de onda $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. A análise de Componentes Principais (PCA) e a regressão pelos mínimos quadrados parciais (PLS-R) foi realizada utilizando o software Quant da OPUS (Bruker Optics, Ettlingen).

Resultados e Discussão

Os resultados dos parâmetros físico-químicos médios por tipo de mel monofloral estão representados na Tabela 1.

Para todos os parâmetros observa-se uma grande variabilidade que é devida em grande parte à origem botânica dos méis. Embora os méis possam ser classificados como monoflorais com uma dada percentagem de determinado pólen, dependendo do local contêm sempre grandes percentagens de outros pólenes que variam dentro do mesmo grupo. Esta grande variabilidade imprime ao mel uma grande variabilidade das suas propriedades físico-químicas.

De acordo com resultados da Análise de variância unifactorial e teste de comparação de médias (teste Fisher LSD a 95% de confiança), não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros humidade, actividade em água, pH e acidez livre. Resultados semelhantes foram observados por Andrade et al (1999) e Mendes et al (1998) para méis Portugueses.

No entanto, em termos médios pode observar-se que os méis de urze e alfarroba apresentam uma acidez ligeiramente mais elevada que por vezes é também detectado nas provas sensoriais (Anjos et al 2010).

Como parâmetros com diferenças significativas entre as amostras analisadas foram detectados o teor de fenóis totais, cinzas, condutividade eléctrica e os parâmetros a* e b* da cor.

O teor de fenóis totais encontrados nos méis de urze é estatisticamente superior aos observados para os outros méis. O mel de laranjeira é o que

apresenta teor de polifenóis mais baixo e os méis de eucalipto, rosmaninho e alfarroba apresentam características semelhantes. Resultados similares foram encontrados por Ferreira et al (2009).

A condutividade eléctrica é influenciada pelo teor de cinza, acidez e sais minerais (Crane, 1990) e quanto maior a acidez e a quantidade de cinzas no mel, maior é a sua condutividade eléctrica (Bogdanov, 2002), no entanto neste estudo apenas se verificou uma boa correlação com as cinzas ($R^2=0,9076$). Para estes dois parâmetros e uma vez que estão bem correlacionados foram encontrados três grupos de méis com características diferentes entre si. O mel de Urze com valores estatisticamente mais elevados, seguido do grupo formado pelos méis de eucalipto e alfazema e um terceiro grupo formado pelos méis de laranjeira e rosmaninho.

Para a cor e devido também a grande variabilidade observada dentro de cada grupo (Figura 1), não foram observadas diferenças significativas para o parâmetro L, mas apenas para os parâmetros a^* e b^* sendo que o grupo dos méis de urze e alfarroba apresentam colorações mais escuras do que as observadas para os restantes méis. A variação da cor dos méis de laranjeira, eucalipto e rosmaninho depende, entre outros factores, do 2º grupo de pólenes dominantes que conferem tons mais escuros ou mais claros ao produto final.

No sentido de perceber quais os parâmetros que poderiam influenciar mais directamente o teor de fenóis totais, foi efectuada uma análise de componentes principais com todos os parâmetros analisados (Figura 2).

Os dois primeiros eixos explicam 80% das variações encontrada. Apenas uma variável não era explicada por este sistema (humidade), pelo que se optou por a colocar em suplementar.

Podemos verificar que o factor 1 está definido pelos parâmetros de fenóis totais (PF), condutividade eléctrica (EC), cinzas (As), acidez total (Ac) e cor a^* (Ca) que estão correlacionadas positivamente entre si. O factor 2 é definido pela cor b^* (Cb), actividade de água (Aw), pH e luminosidade (Cl), sendo que a luminosidade está inversamente correlacionado com os restantes parâmetros. Assim, de acordo com esta análise podemos verificar que o teor de fenóis totais se encontra bem correlacionado com a condutividade eléctrica, cinzas, acidez total e cor a^* , sendo no entanto necessário aprofundar este estudo para se poderem compreender e modelar este tipo de correlações.

Os espectros de ATR-FTIR dos méis (Figura 3) são dominados por duas bandas intensas, a correspondente à água em 3284 cm^{-1} (estiramento OH) e 1641 cm^{-1} (deformação OH) e de cerca de $1500\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ contribuição a partir de mono e dissacáridos do mel. Outras bandas importantes na interpretação dos espectros são as correspondentes ao estiramento CO e CC e deformação COH com um máximo em 1025 cm^{-1} .

A Análise multivariada dos espectros de todos os méis analisados na faixa de $1800\text{-}742\text{ cm}^{-1}$ permitiu uma separação dos méis em três grupos já

identificados na análise de variância. O primeiro grupo inclui mel de Urze, claramente diferente dos restantes e os dois grupos restantes incluem méis de laranjeira, eucalipto e rosmaninho separando-se cada grupo pela origem geográfica dos méis, com excepção das amostras de mel de rosmaninho.

Embora tratando-se de um estudo preliminar sobre as potencialidades do FTIR – ATR para análises rápidas de mel, foram obtidos modelos promissores através da modelação PLS-R com coeficientes de determinação da validação cruzada elevados, para o teor de fenóis totais ($R^2 = 0,91$; RPD = 3,0), condutividade eléctrica ($R^2 = 0,90$; RPD = 2,9) e teor de cinzas ($R^2 = 0,92$; RPD = 3,3).

Conclusões

Méis de origem botânica diferentes têm diferentes características físico-químicas, em especial na cor, teor de fenóis, cinzas e condutividade eléctrica. Apesar de ser uma abordagem preliminar, os modelos obtidos pela modelação PLS-R apresentaram resultados promissores em amostras de mel e podem ser uma boa metodologia para prever alguns parâmetros analíticos em amostras de mel, de uma forma mais rápida e económica do que usando as técnicas tradicionais.

É possível obter correlações altamente significativas entre o teor de polifenóis totais e a informação espectral obtida por FTIR-ATR no intervalo de números de onda entre os 1800 e os 742 cm^{-1} .

Referências.

- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E and Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review, *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 3 (2010), pp. 15–23.
- Andrade PB, Amaral MT, Isabel P, Carvalho JC, Seabra RM, Cunha AP. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. *Food Chemistry* 66 (1999), pp. 503 -510.
- Anjos O, Liliana C, Gouveia C, Vitorino C, Rodrigues J, Peres F. Chemical and physical parameters of Portuguese honey: classification of Citrus, Erica, Lavandula and Eucalyptus honeys by multivariate analysis and FTIR-ATR spectroscopy. In: *Book of abstracts 3rd Scientific Conference of Institute of Tropics and Subtropics -Sustainable use of Natural Resources in tropics and subtropics, 19th November. Czech University of Life Sciences, Institute of Tropics and Subtropics (Ed.), Czech Republic. (2009), pp. 31-32.*
- Bogdanov S. *Harmonized Methods of the International Honey Commission.* Swiss Bee Research Centre, Switzerland 2002.
- Crane E. *Bees and beekeeping: science, practice and world resources.* Oxford (1990).
- Ferreira IC, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry* 114 (2009), pp. 1438–1443.

- Gheldof and Engeseth, 2002 N. Gheldof and N.J. Engeseth, Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002), pp. 3050–3055.
- Meda et al., 2005 A. Meda, C.E. Lamien, M. Romito, J. Millogo and O.G. Nacoulma, Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry* 91 (2005), pp. 571–577.
- Mendes E, Proença EB, Ferreira IM, Ferreira MA. *Carbohydrate Polymers*. 37 (1998), pp. 219-223.
- Velázquez TG, Revilla GO, Loa MZ, Espinoza YR. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International* 42(3) (2009), pp. 313-318.

Amostra	Humidade (%)	CE (µS/cm)	Aw	Cinzas (%)	pH	Acidez (meq/Kg)	F. totais (mg GAE/Kg de mel)
Alfarroba	19,2±1,7	606±253	0,60±0,05	0,23±0,23	3,5±0,6	31,7±4,8	377±16
Rosmaninho	18,8±2,4	470±31	0,58±0,03	0,17±0,02	3,7±0,4	25,0±11,4	240±31
Laranjeira	18,7±0,3	230±23	0,59±0,01	0,07±0,02	3,5±0,3	24,9±3,6	153±55
Eucalipto	18,1±0,8	293±93	0,60±0,02	0,09±0,06	3,7±0,4	28,6±6,9	254±92
Urze	18,8±0,6	695±102	0,60±0,01	0,35±0,05	3,9±0,2	32,8±5,1	723±153

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos analisados nas amostras de mel

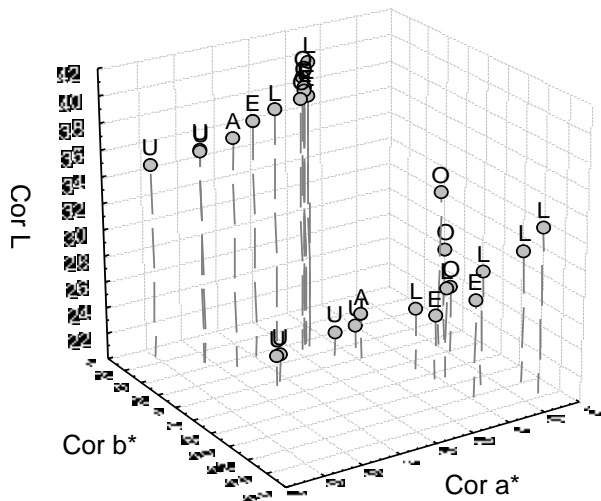


Figura 1.

rentes

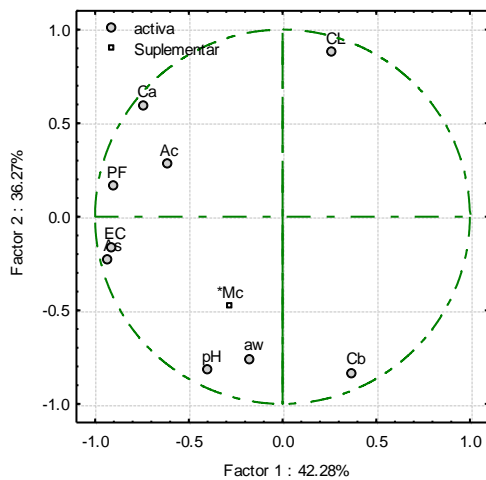


Figura 2 - Distribuição das variáveis estudadas no plano principal

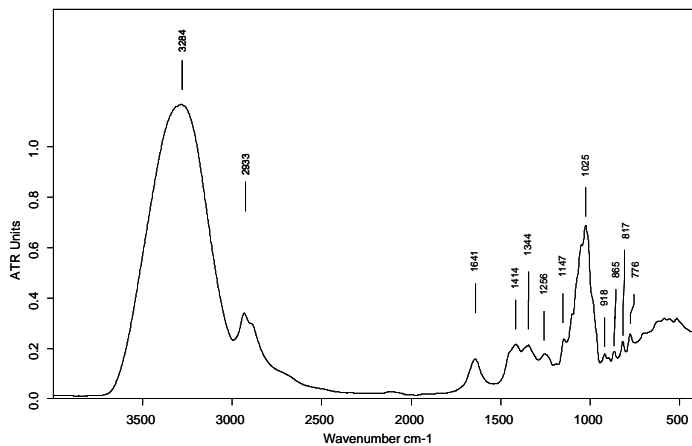


Figure 3 .Espectro FTIR – ATR resultante da media das amostras adquirido de 4000 to 450 cm^{-1} .

Probióticos en apicultura.

M. R. Benítez Ahrendts¹, M. C. Audisio^{1,2} y H. Quinteros.¹

¹Fac. de Ciencias Agrarias, UNJu, ²INIQUI-CONICET.

²Fac. de Ingeniería, UNSa. Alberdi 47, 4600, Jujuy, Argentina. Correo electrónico: mrba71@hotmail.com

Resumen.

El objetivo del trabajo fue determinar la evolución de las colmenas tratadas con *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 utilizando como parámetros el número de abejas, área de cría abierta, operculada y miel almacenada. *L. johnsonii* CRL1647 se aisló del tracto intestinal de una abeja criolla de la provincia de Salta (Argentina). Se seleccionó por presentar, *in vitro*, efectos inhibitorios sobre *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*. Se determinó en laboratorio la concentración de azúcar que no alteraba la viabilidad de dicha bacteria y fue entregado a las abejas en un litro de jarabe compuesto por 125 gramos de sacarosa en un litro de agua, al que se le añadió una concentración final de 10^5 UFC / mL lactobacilos. El ensayo *in vivo* se realizó en el Departamento San Antonio de la provincia de Jujuy y se inició con núcleos tardíos de cuatro cuadros una vez confirmada la presencia de reinas en postura. Se utilizaron 5 colmenas como testigo y 5 como tratamientos, se realizaron 12 aplicaciones cada 30 días durante el año 2009 y se cuantificó el efecto mediante el análisis de fotos tomadas con un software diseñado para tal fin. El manejo se realizó según la manera tradicional de la zona. No se utilizó sustituto proteico ni complejo vitamínico. Se analizaron los valores promedios de los parámetros mencionados mediante el uso de la Distribución de "t" de Student para muestras pequeñas. Se utilizó la prueba de comparaciones de medias apareadas por tratarse de muestras dependientes. Evaluadas las dos series de cada parámetro estudiado, se concluyó que son diferentes con un $p \ll 0,001$. Esto es con un alto coeficiente de confianza (0,999). Se evidenció una diferencia marcada en el área de cría abierta de un 40% luego de la tercera aplicación y en el inicio de la floración importante de la zona. En cuanto a cantidad de miel producida se logró una producción de aproximadamente un 15,57 % mayor a la que se hubiera obtenido sin la aplicación del mismo al momento de la cosecha.

Palabras claves: *Lactobacillus johnsonii*, evolución de colmenas

Abstract.

The aim of this paper was to determine the evolution of the beehives treated with *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, using as parameters the number of working bees, open and operculated brood area, and stored honey. *L. johnsonii* CRL1647 was isolated from the intestinal tract of a creole

honeybee from the province of Salta-Argentina. It showed, *in vitro*, inhibitory effects over *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. The sucrose concentration that did not alter the viability of such bacterium was determined and it was delivered to bees on one liter of syrup composed of 125g/L of water, in which a final concentration of 10^5 UFC / mL lactobacilli was added. The assay *in vivo* was done in San Antonio, in the province of de Jujuy (Argentina) and it started with late nuclei of four frames once the presence of queens in position was confirmed. Five hives were used as control and five as treatment, 12 applications were made every 30 days during 2009 and the effect was quantified through the analysis of photos taken using a software which was designed for this purpose. The management was performed according to the traditional local way. Neither protein substitutes nor vitamin complex were used. The average values of the parameters mentioned before was analyzed through the usage of the Student *t* distribution test for small samples. The paired average comparison test was used because the analyzed samples are interdependent. The results showed a marked difference of 40% in the open brood area, after the third application and at the beginning of the most important flowering of the area. The amount of honey produced at the time of harvest was 15.6 % higher in hives treated with the lactic acid bacterium than the ones in the respective controls.

Introducción.

La abeja melífera común se puede ver afectada por distintos tipos de enfermedades: loque americana, loque europea, nosemosis, varroasis, entre otras, las cuales pueden ser favorecidas por un manejo inadecuado de la colmena y diagnósticos inoportunos. Por otra parte, el uso excesivo de antibióticos para combatirlas conduce, al menos, a dos problemas serios: la aparición de patógenos más resistentes y la detección de residuos en la miel. Una posible solución natural al problema puede ser completar la maduración de la microbiota intestinal de la larva o fortalecerla con la administración de microorganismos “beneficiosos” como las bacterias lácticas o una combinación de bacterias con metabolitos de origen bacteriano. No todas las bacterias que se aíslan son factibles de ser administradas. Para que las cepas puedan ser consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe) o probióticas deben cumplir con uno o más de los siguientes criterios de selección: identificación taxonómica segura; ser huéspedes específicos; no tóxicas y no patógenas; capaces de actuar en el sitio blanco; producir sustancias antimicrobianas (ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico, bacteriocinas o sustancias tipo-bacteriocinas, biosurfactantes, etc.); capacidad de sobrevivir y proliferar en las condiciones del tracto gastrointestinal del huésped; adherirse a epitelio o tejido intestinal; ejercer un efecto antagónico hacia microorganismos patógenos; estimular la respuesta inmune; capacidad de producir beneficios clínicos bien documentados y conservar sus características

durante la preparación, el almacenamiento y la comercialización (Fuller, 1989; Havenaar y col., 1992; Anadón y col., 2006; Gueimonde & Salminen, 2006).

Las bacterias lácticas forman parte de un gran número de fórmulas probióticas. Por lo tanto, teniendo en cuenta las propiedades de estos microorganismos se aislaron, en la provincia de Salta, bacterias lácticas del tracto intestinal de abejas de diferentes apiarios y se seleccionaron cepas que presentaron, *in vitro*, efectos inhibitorios sobre algunos patógenos de la abeja. El objetivo del trabajo fue determinar la evolución de las colmenas tratadas con *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 utilizando como parámetros el número de abejas, área de cría abierta, operculada y miel almacenada.

Material y Métodos.

Abejas/ Núcleos/ Ensayo exploratorio. El estudio se llevó a cabo en un apiario comercial ubicado en la localidad de San Antonio provincia de Jujuy a unos 1345 msnm. Según la clasificación de Köppen, el clima corresponde a la clase Cwah, que caracteriza a una región templada, moderadamente lluviosa, con inviernos secos y veranos calurosos (mes más caluroso >22°C), y con una temperatura media anual >18°C.

El trabajo se realizó con abejas de la especie *Apis mellifera* L. local manejadas en colmenas tipo Langstroth. En el ensayo se utilizaron diez núcleos tardíos iniciados en el mes de diciembre de 2008, a los cuales se les introdujo celdas reales provenientes de reinas PROAPI. Verificada la postura de las nuevas reinas se seleccionaron 5 núcleos al azar para ser tratados con la cepa CRL1347, los otros se utilizaron como testigo. Se hicieron doce aplicaciones cada treinta días. No se utilizó sustitutos proteicos, complejos vitamínicos ni suplemento energético durante el tratamiento. El manejo de los espacios se realizó según la manera tradicional de la zona.

Microorganismo y condiciones de cultivo. *L. johnsonii* CRL1647 fue aislado, en la provincia de Salta, del tracto intestinal de una abeja criolla y fue seleccionada porque presentó, *in vitro*, efectos inhibitorios sobre *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis* (Audisio y Apella, 2006; Audisio y col., 2010). Esta bacteria fue caracterizada por pruebas bioquímicas clásicas para el género *Lactobacillus* y la tipificación en género y especie fue corroborada por el análisis de la secuencia 16S de su ARNr (GenBank número de acceso EU428007). Se la cultivó en el medio MRS (Britania, Argentina), a 37°C durante 12 h en condiciones de microaerofilia.

Dosis. El número de células viables de *L. johnsonii* CRL1647 en el momento de la administración se determinó por recuento en placa en el medio selectivo para *Lactobacillus* (MRS, Britania) agarizado.

Vía de administración. Para estos estudios exploratorios se eligió el *alimentador* tipo Doolittle como vía de ingreso de la bacteria a la colmena.

Estudio de la tolerancia del cultivo bacteriano a la osmolaridad del jarabe. Teniendo en cuenta la vía de ingreso de la bacteria láctica a la colmena, previamente, se determinó en el laboratorio la concentración mínima de

azúcar que no alteraba la viabilidad de dicha bacteria y que sería aceptada por las abejas. Se probaron las siguientes concentraciones de azúcar común de mesa: 1kg: 1 L de agua; 1kg: 0,5 L de agua; 500g: 1L agua, 250g:1 L de agua y 125g:1 L agua.

Parámetros considerados. Se siguió la evolución de la colmena en el tiempo a través del análisis de imágenes digitales tomadas cada 30 días mediante un software diseñado para tal actividad. Los parámetros considerados para calificar el estado general de las colmenas en la evaluación fueron: área de abejas, áreas de cría abierta y cría operculada y cantidad de miel almacenada. Los cambios en los parámetros fueron comparados con núcleos/colmenas control que no recibieron esta bacteria láctica pero que fueron tratados bajo las mismas condiciones climáticas y de supervisión.

Miel almacenada. Para cuantificar la miel almacenada se tomaron 10 cuadros de medias alzas cargados y se prensaron. De esa manera se pudo obtener un promedio de kilogramos de miel por área que nos permita correlacionarlo con las imágenes tomadas de cada colmena.

Análisis Estadístico. Se analizaron los valores promedios de los parámetros mencionados mediante el uso de la Distribución de "t" de Student para muestras pequeñas. Se utilizó la prueba de comparaciones de medias apareadas por tratarse de muestras dependientes.

Resultados y Discusión.

La elección de la abeja como huésped de estudio no fue al azar. La República Argentina tiene un importante lugar a nivel mundial tanto en la producción como en la exportación de miel y la posibilidad de diseñar un suplemento probiótico nacional para abejas que colabore, naturalmente, con la sanidad de este insecto sería una alternativa ventajosa para el sector apícola argentino.

Para ello, se realizó una selección previa de cepas de bacterias lácticas aisladas del tracto gastrointestinal de abejas criadas en colmenas de la provincia de Salta que, a través de diferentes mecanismos, inhibieron *in vitro* a los siguientes patógenos de la abeja melífera común: *P. larvae*, agente etiológico de la loque americana y *A. apis*, agente causal de la cría yesificada (Audisio y Apella, 2006). En este trabajo se analizó, en particular, el efecto de *L. johnsonii* CRL1647 como potencial integrante de un suplemento probiótico para abejas.

Estudio de la tolerancia del cultivo bacteriano a la osmolaridad del jarabe. Como vía de ingreso a la colmena se eligió el alimentador tipo Doolittle que es el más utilizado por los apicultores locales. Para poder concretar la idea de suplemento probiótico, se determinó *a priori* la concentración de que no generaba modificaciones apreciables en la viabilidad bacteriana. Se observó que una concentración de 125g de azúcar común de mesa en 1 l de agua no alteraba significativamente la viabilidad del lactobacilo seleccionado (Fig. 1). Por lo tanto, se eligió esta concentración de azúcar en el jarabe y la dosis de *L. johnsonii* CRL1647 vehiculizada fue 5×10^5 ufc/mL, que se administró doce veces en la colmena tratada a través del alimentador.

Parámetros considerados. El análisis estadístico mostró que existieron diferencias significativas entre los tratamientos y se concluyó que son diferentes con un $p < < < 0,001$ en todos los parámetros analizados.

En la Fig. 2 se puede observar una manifestación marcada en el área de cría abierta de un 40% luego de la tercera aplicación tanto en el inicio de la floración importante de la zona como en la de otoño. La Fig. 2 también muestra la evolución de la cría operculada. Los valores de ambas figuras reflejarían la estimulación rápida en la postura de la reina, sino también, la respuesta de la colmena al entorno a favor de las tratadas con el lactobacilo.

El valor promedio de la cantidad de miel almacenada (Fig. 3) al momento de la cosecha fue un 15,6 % mayor en las colmenas tratadas con la bacteria láctica que en los respectivos controles. Estos valores eran de esperarse ya que las colmenas tratadas presentaron una mayor área de abejas durante el tratamiento con una diferencia del 34% para el mes más sobresaliente, pero en general se mantuvo en un valor superior 27%.

En términos general se observó que el efecto del tratamiento cobró relevancia a partir del tercer mes de ser aplicado.

Conclusión.

Estos resultados preliminares abren una alternativa interesante y natural que colaboraría con el apicultor tanto en el manejo de las colmenas como en la creación de núcleos y/o paquetes de abejas tardíos.

Referencias.

- Anadón, A., Martínez Larrañaga, M.R., Martínez, M.A. 2006. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 45: 91-95.
- Audisio, M.C., Apella, M.C. 2006. Caracterización de cepas de *Lactobacillus* aisladas del intestino de la abeja *Apis mellifera* L. II *Simposio Internacional de Bacterias Lácticas y Primer Encuentro red BAL* (Bacterias Lácticas), Tucumán, Argentina.
- Audisio, M.C., M.J. Torres, D.C. Sabaté, C. Ibarguren, M.C. Apella. 2010. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research* doi:10.1016/j.micres.2010.01.003 (*en prensa*)
- Fuller, R. 1989. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.
- Gueimonde, M., Salminen, S. 2006. *Digestive and Liver Disease* 38, S242-S247.
- Havenaar, R., Ten Brink, B., Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics: The Scientific Bases*. Chapman & Hall, London, pp. 209-224.

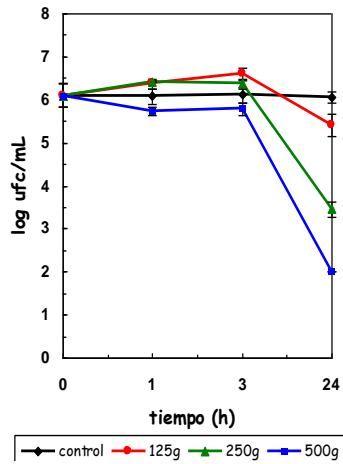


Figura. 1 Viabilidad de *L. johnsonii* CRL1647 en jarabes con diferentes concentraciones de azúcar, incubada a 37°C en condiciones de microaerofilia.

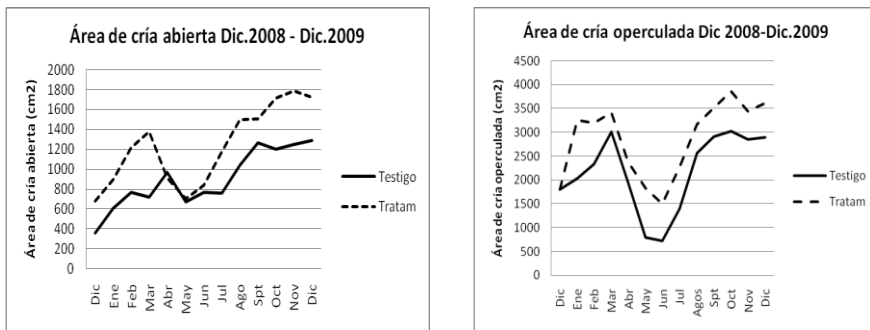


Figura. 2 Área de cría abierta (diciembre de 2008-2009) y área de cría operculada (diciembre de 2008-2009)

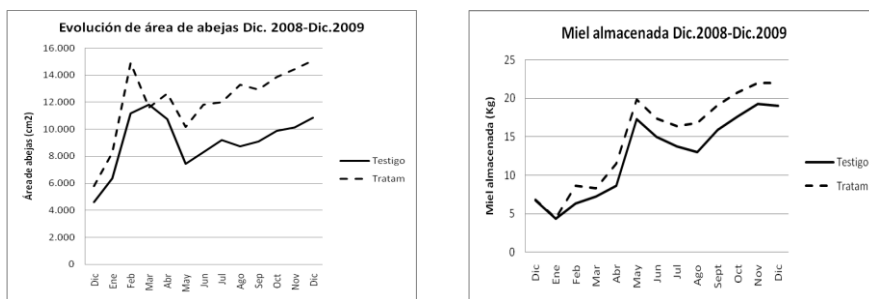


Figura. 3 Evolución de Área de abejas y miel almacenada (diciembre de 2008-2009).

Estudio del polen como posible vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas entre las abejas melíferas

I. Fernández¹, J. R. Díaz¹, M^a Aller¹, M^a L. Ortiz¹, A. M^a Pedregosa¹, A. González², R. Martín², M. Higes²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá. Campus Universitario, Crta. NII, Km 33,6 28871 Alcalá de Henares, Madrid, inmaculada.fernandez@uah.es

² Centro Agrario de Marchamalo. JCCM. Marchamalo, Guadalajara.

Summary

Bee pollen is a natural food with a great nutritional capability that is used by honey bees to the larva and adult bee nutrition. However, bee pollen could act as a vector to expand bee pathogen microorganisms between hives. By other hand, bee pollen could transmit microbial food diseases in humans when they take the pollen as a complement to diet. In order to detect the presence of honey bee and human pathogens, micro biota of pollen originated from health and chalk brood infected hives has been studied. Several bacteria, moulds and yeast were isolated and then identified. The microorganism presence is explained by their wide environmental distribution; they are typically found in soil and plants chosen as food source by bees. *Ascosphaera apis* was detected, not only in pollen ejected from chalk brood infected hives, but in health pollen as well, indicating that pollen could expand this and other diseases between honey bees.

Introducción

El polen de abeja es uno de los alimentos naturales conocidos con mayor poder nutritivo. El polen es utilizado por abejas melíferas como fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales para la nutrición de las larvas y abejas adultas. Por otro lado, los granos de polen pueden ser recolectados por los apicultores a la entrada de la colmena mediante un sistema atrapa-polen y ser comercializados como alimento energético (Baldi y col., 2004).

El polen posee una flora microbiana procedente del ambiente o aportada por las abejas o por el apicultor, que lo convierten en un vector propicio para la transmisión de microorganismos patógenos para las abejas o para el hombre. Algunas de las enfermedades de abejas melíferas (*Apis mellifera*) con mayor impacto en la apicultura están causadas por bacterias y hongos. Entre las enfermedades bacterianas que afectan a las larvas hay que destacar la “Loque Americana” producida por la bacteria esporulada *Paenibacillus larvae* y la “Loque Europea” cuyo agente primario es *Milisococcus plutón* con *Achromobacter*, *Enterococcus* y *Bacillus* como flora oportunista. El hongo *Ascosphaera apis* causa la ascosferosis o “cría yesificada”. *Aspergillus* afecta también a las larvas y causa “la cría pétrea” (Shimanuki and Knox, 2000).

Actualmente, es de mayor preocupación para la apicultura la nosemosis causada por los criptosporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. Este último ha sido descrito como el agente causante de “el despoblamiento de colmenas” de *Apis mellifera*, detectándose su presencia en granos de polen corvicular (Higes et al., 2008).

Por otra parte, siendo el polen un alimento que se consume principalmente en forma deshidratada, puede contener aflatoxinas u otras micotoxinas producidas por hongos tales como *Aspergillus* y *Penicillium* causando intoxicaciones alimentarias en el hombre (González et al., 2005). Además, el polen puede ser contaminado con microorganismos patógenos para el hombre durante su recolección y comercialización.

Objetivo

Dado que el polen puede ser un vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas, el objetivo del presente trabajo es realizar un análisis microbiológico intensivo del polen para detectar la presencia de agentes infecciosos para el hombre y las abejas.

Materiales y Métodos

El análisis microbiológico se llevó a cabo en dos tipos de polen diferentes: Un polen “sano” y un polen enfermo con “crías yesificadas”. El polen “sano” fue recolectado mediante trampas atrapa-polen en apiarios de la finca de Malaguilla y del Centro Agrario Regional (CAR) de Guadalajara en la primavera del 2009. El polen fue almacenado congelado a -40°C hasta su uso. En las muestras de polen “sano”, el análisis microbiológico se llevó a cabo en los días siguientes a su recolección y después de ser almacenado durante al menos 9 meses. El polen mezclado con larvas yesificadas había sido desechado por abejas de una colmena infectada con *Ascosphaera*.

Las muestras de polen se suspendieron en agua de triptona. Alícuotas de esta suspensión se usaron como inóculo para evaluar el crecimiento microbiano en diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales. El número de colonias crecidas en cada medio sirvió para determinar el N^oUFC/g de polen. Los medios de cultivo sólido empleados para el recuento microbiano fueron: SPS para clostridios sulfito reductores (44°C); PCA para aerobios mesófilos (31°C); R2 para microorganismos oligotrofos (22 y 31°C); McConkey y Levine para coliformes totales y fecales (37 y 44°C); KF para *Enterococcus* (37°C); Manitol salado para estafilococos (37°C); Sabouraud con cloranfenicol y Agar Patata para mohos y levaduras (28°C); MYPGP para microaerófilos (*Paenibacillus larvae*) (37°C) y Cetrimida para *Pseudomonas* (37°C).

Los microorganismos crecidos en los medios de cultivo sólidos se aislaron mediante resiembras en placa utilizando el mismo medio de cultivo. Para la identificación de los hongos se realizaron estudios macroscópicos y microscópicos de las colonias, hifas y conidios. Para el estudio microscópico, los hongos fueron crecidos en medio sólido usando la técnica del cubreobjetos

incrustado en agar. Las levaduras fueron identificadas en base a características morfológicas y bioquímicas utilizando las galerías API 20 AUX con la ayuda del software de identificación <https://apiweb.biomerieux.com/>. Las bacterias se identificaron en base a características fenotípicas y mediante las galerías de pruebas bioquímicas API 20E, 20 NE, API STAPH, API STREP, API 20E y API 50 CH, con la ayuda del software de identificación <https://apiweb.biomerieux.com/>.

Resultados y Discusión

En el polen existe una flora microbiana formada por microorganismos aerobios mesófilos, oligotrofos y hongos (Figura 1). El recuento de microorganismos aerobios no patógenos en medio PCA es inferior al máximo permitido según el Código Alimentario Argentino (150×10^3 UFC/g). Sin embargo, no ocurre lo mismo con el recuento de hongos, que supera, en el polen recién recolectado, el máximo permitido de 10^2 UFC/g (Baldi y col, 2004).

Esta flora microbiana resulta notablemente disminuida en el polen almacenado congelado durante varios meses, al menos del orden de una unidad logarítmica (Figura 1). El valor medio de la actividad del agua (a_w) medida en el polen recién recolectado fue de 0.660, semejante a la a_w determinada en cereales y frutos secos. Este grado de deshidratación permitiría únicamente el crecimiento de algunos hongos xerófilos (Madigan et al., 2009). Es posible que la falta de agua del polen junto con la baja T^a de congelación (-40°C) reduzcan la población microbiana durante el almacenamiento. Pero hay que tener en cuenta que otros factores como el pH y sustancias microbicidas presentes en el polen pueden también participar en la reducción del número de microorganismos viables.

En ninguna de las muestras de polen se detectó la presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal; *Pseudomonas*; ni *Paenibacillus larvae*. Por el contrario, en casi todas las muestras se detectó crecimiento en Manitol Salado con acidificación del medio (MS+), lo que podría indicar la presencia de *Staphylococcus*. Sin embargo, la mayor parte de las colonias MS+ fueron identificadas como pertenecientes al género *Bacillus*, aunque dos de los aislamientos fueron identificados como *Staphylococcus aureus* y *Sataphylococcus sciuri* (Tabla 1).

Del polen almacenado en congelación se aislaron bacterias, mohos y levaduras (Tabla 1). Aparentemente, tras algunos meses de conservación, la mayor parte de la flora microbiana del polen consiste en bacterias Gram positivas formadoras de esporas como *Bacillus* y *Paenibacillus*; *Streptomyces*; mohos y levaduras, siendo todos ellos microorganismos que se encuentran habitualmente en el suelo, en el polen de las flores u otras partes de las plantas y en las abejas (García y col., 2006; Gilliam, 1979a; 1979b; y Gilliam et al., 1989). Entre los hongos presentes en el polen "sano" se detectó *Ascosphaera apis*. Este hongo patógeno de abejas, puede encontrarse

disperso en el ambiente y ser llevado a las colmenas a través del polen corvicular. Sin embargo, es necesario la aparición de ciertas condiciones para el desarrollo de la enfermedad, tales como un alto porcentaje de humedad, debilitamiento de la colonia por otras enfermedades y manipulaciones que provoquen el enfriamiento de la colonia (Gilliam, 1986). En el polen estudiado no se detectó la presencia de *Paenibacillus larvae*, agente causal de la “Loque Americana”.

La mayor parte de las bacterias aisladas pertenecen al género *Bacillus*, siendo *B. subtilis/amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* las especies aisladas con mayor frecuencia (en un 33, 21 y 21% respectivamente). Un 9% de los *Bacillus* aislados fueron identificados como *B. cereus*, causante de intoxicaciones alimentarias en el hombre, y también en un caso se aisló *Staphylococcus aureus*, otro agente causante de toxiinfecciones. Con relación a la posibilidad de que el consumo del polen pueda generar infecciones alimentarias en el hombre, hay que destacar también la presencia de algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* que pudieran aportar micotoxinas al polen. Por ello, pretendemos identificar las especies fúngicas posibles productoras de micotoxinas y detectar la presencia de micotoxinas en el polen.

Además, en este trabajo se estudió la flora microbiana presente en una muestra de polen mezclado con larvas yesificadas procedente de una colmena infectada con *Ascosphaera apis*, y se identificaron los microorganismos aislados (Tabla 2). Al igual que en el polen “sano”, en el polen infectado no se detectó la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal; *Pseudomonas*; ni *Paenibacillus larvae*. Únicamente se detectaron bacterias Gram positivas del género *Bacillus* y *Micrococcus*. Además de *Ascosphaera apis*, en el polen infectado se aislaron diversos hongos filamentosos y levaduras. En las crías yesificadas únicamente se aislaron *Ascosphaera apis* y *Bacillus pumilus*.

Referencias.

- Baldi, B.; Grasso, D.; Chaves, S. y Fernández, G. (2004). Caracterización bromatológica Del pólen apícola argentino. Ciencia, Docencia y Tecnología. **29**, 145-181.
- García, D.; Rojas, M.A. y Sánchez, J. (2006). Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Acta Biológica Colombiana, **11**, 123-129.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: the yeast. Apidologie, **10**, 43-53.
- Gilliam, M. (1979 a). Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. Apidologie, **10**, 269-274.
- Gilliam, M. (1979 b). Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. Apidologie, **10**, 269-274.

- Gilliam, M. (1986). Infectivity and survival of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, in colonies of honey bees *apis mellifera*. *Apidologie*, **17**, 93-100.
- Gilliam, M.; Prest, D.B. and Lorenz, B.J. (1989). Microbiology of pollen and bee bread: Taxonomy and enzymology of molds. *Apidology*, **20**, 53-68.
- González, G.; Hinojo, M.H.; Mateo, R.; medina, A. and Jiménez, M. (2005). Ocurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 1-9.
- Higes, M.; Martín Hernández, R.; Garrido-Bailón, E.; García-Palencia, P: and Meana, A. (2008). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of Foraker honeybees. *J. of Invertebrate Pathology*. **97**, 76-78.
- Shimanuki, H. and Knox, A. (2000). Diagnosis of honey bee diseases. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook Nº 690.

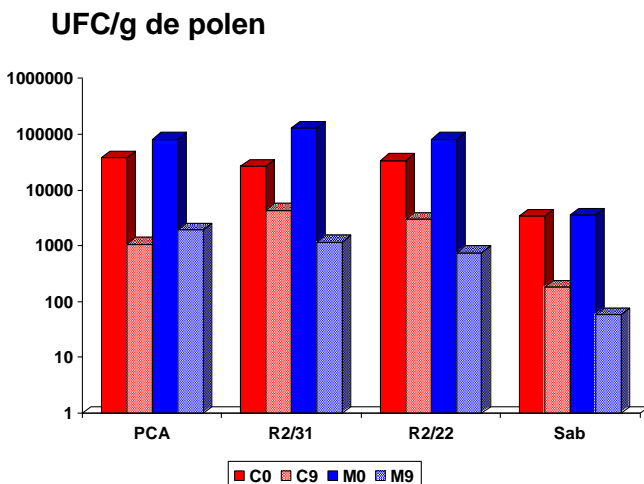


Figura 1 Representación a escala logarítmica del número de microorganismos aerobios mesófilos, oligotrofos y hongos del polen. C0 polen recolectado en apiarios del CAR, analizado de forma inmediata; C9 el mismo polen analizado al cabo de 9 meses; M0 polen recolectado en apiarios de la finca de Malaguilla, analizado de forma inmediata; M9 el mismo polen analizado al cabo de 9 meses.

Tabla 1. Microorganismos aislados del polen “sano”(*)

Bacterias	Hongos filamentosos	Levaduras
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>B. lentus</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>Stephanoascus ciferrii</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Ascospaera apis</i>	<i>Cryptococcus. albidus</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>B.subtilis/amyloliquefaciens</i>	<i>Rhizopus</i>	
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>		
<i>Micrococcus luteus</i>		
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>		
<i>Paenibacillus polymyxa</i>		
<i>Pantoea spp</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Staphylococcus sciuri</i>		
<i>Streptomyces ssp.</i>		

(*) está pendiente la identificación de algunos aislados de bacterias G+ y G-, streptomyces, mohos y levaduras.

Tabla 2. Microorganismos de un polen procedente de una colmena infectada con <i>Ascosphaera apis</i>	
Bacterias	Mohos y levaduras
24000 UFC/g	750 UFC/g
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Ascosphaera apis</i>
<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Cladosporium</i>
	<i>Helminthosporium</i>
	<i>Mucor</i>
	<i>Aspergillus</i>
	<i>Rhizopus</i>
	<i>Stephanoascus ciferri (Candida ciferri)</i>
	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	<i>Cryptococcus albidus</i>
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

Diagnóstico laboratorial de enfermedades de la cría de abejas en el noreste de Portugal.

S. Pires¹, K. Paulos², V. Cadavez^{1,3}, M^a J. Valério⁴

^{1,3}Centro de Investigação de Montanha (CIMO)/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal. Correo electrónico: spires@ipb.pt

²Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

⁴Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Departamento de Patologia, Sector de Patologia Apícola, Estrada de Benfica 701, 1549-011 Lisboa CODEX, Portugal.

Resumen.

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia y la dispersión de las enfermedades de cría de las abejas en el Noreste de Portugal. Muestras de cría de abejas melíferas fueron recogidas y enviadas al Laboratorio de Patología Apícola de la Escola Superior Agraria de Bragança (LPAESAB). Dichas muestras fueron recogidas en los años 2008 y 2009 y se procesaron para la evaluación de las enfermedades de la cría. El diagnóstico de laboratorio reveló la prevalencia de las siguientes enfermedades de la cría: varroosis, loque americana y ascosferiosis. Los resultados obtenidos muestran que estas enfermedades se manifiestan a lo largo de las diferentes estaciones del año. La presencia de varroosis y ascosferiosis es mayor ($P < 0,05$) en el verano y en otoño. La loque americana tuvo una incidencia más alta ($P < 0,05$) en el área climática de Terra Fria (15,4%) que en el área geográfica de Terra Quente (3,9%). Respecto al efecto del año, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las distintas enfermedades de cría diagnosticadas.

Introducción.

En la actualidad, las enfermedades de las abejas representan un problema grave que los apicultores tienen que afrontar, tanto a nivel nacional como mundial. El diagnóstico de laboratorio de las enfermedades de las abejas melíferas es una herramienta clave para su control, ya que la detección precoz es importante, no solo para prevenir la propagación como también para la toma de decisiones en el momento de realizar tratamientos.

Muestras de cría de abejas fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Apícola de la Escola Superior Agrária de Bragança (LPAESAB), para la evaluación de sus enfermedades en la región del Noreste de Portugal; en cual pertenece a la región de Trás-os-Montes y según los criterios climáticos definidos por Gonçalves (1985) y actualizados por Agroconsultores y Coba (1991) posee dos zonas de clima distinto. Así, Terra Fria y Terra Quente son,

por lo tanto, los nombres comunes de estas dos regiones que reflejan los contrastes de su clima.

Según la distribución regional de los apicultores registrados en Portugal, el área de estudio está incluida en la Región Norte, donde la actividad apícola es predominantemente no profesional. Todavía, representa la segunda región mayor del país con respecto al número de apicultores (28% del total nacional). Las explotaciones apícolas tienen una dimensión media de 29,4 colmenas por apicultor y cada apicultor tiene una media de 1,7 colmenares (Programa Apícola Nacional, 2010).

La información sobre la prevalencia y distribución de las enfermedades de cría de las abejas en esta región es escasa. Así, este trabajo tuvo como objetivo determinar la prevalencia y la dispersión de las enfermedades de cría de abejas en la región del Noreste de Portugal.

Material y Métodos.

Al LPAESAB fueron remitidas un total de 341 muestras de cría de abejas recogidas a lo largo de dos años (2008 y 2009) en colmenares ubicados en la región del Noreste Transmontano. Estas muestras (porciones de panales con cerca de 12cmx12cm) fueron preservadas por el frío, sólo cuando no había ninguna posibilidad de su procesamiento inmediato. La inspección y toma de muestras se realizó por los técnicos de las asociaciones y/o agrupamientos de apicultores según el protocolo propuesto por la Dirección General de Veterinaria de los Servicios de Sanidad y Protección Animal (DGV) a lo largo de casi todos los meses del año, pero algunas muestras fueron enviadas directamente al laboratorio por apicultores.

Las técnicas de diagnóstico, basadas fundamentalmente en el examen microscópico, fueron realizadas de acuerdo con los métodos habitualmente utilizados por el laboratorio de referencia a nivel nacional (Laboratorio Nacional de Investigación Veterinaria (LNIV), según las recomendaciones del Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) sobre Animales Terrestres. Las técnicas de diagnóstico empleadas fueron tinción simple o gota pendiente a partir de restos larvales para loque americana, examen macroscópico de la cría de abeja para varroosis (conteo de ácaros en la porción del panal de cría) y ascosferiosis o poyo escayolado (mediante el conteo de momias sobre la porción del panal de cría). Los datos fueron analizados utilizando el software SAS (1995), mediante el test de Kruskal-Wallis.

Resultados y Discusión.

Un total de 337 muestras fueron procesadas en el LPAESAB, todavía sólo 1 muestra en 2008 y 3 muestras en 2009 fueron rechazadas (Tabla 1). Las muestras fueron consideradas inviables cuando sus celdillas no tenían crías o sólo tenían alimento (miel y polen). Esto ocurre, a veces, cuando es el propio

apicultor que hace el muestreo y, una u otra vez, lo hace de forma inadecuada.

El análisis microscópico de 337 muestras confirmó la incidencia de la varroosis, loque americana y ascosferiosis como las enfermedades de la cría de abejas. De las muestras analizadas, el mayor porcentaje correspondió a muestras negativas. El promedio de casos positivos detectados en el laboratorio reveló que la presencia de enfermedades de la cría de abejas se manifiesta en todas las estaciones del año. Sin embargo, hay que resaltar una incidencia más alta ($P < 0.05$) de la varroosis en verano (62,5%) y otoño (64,2%), así como de la ascosferiosis (Tabla 3). Respecto a la varroosis esto sucede, probablemente, porque estas estaciones del año corresponden a los períodos en que no se hacen tratamientos o que aún no fueron hechos (en otoño). Este hecho puede indicar una disminución de la eficacia de los productos utilizados y la necesidad de una evaluación del éxito al final de cada temporada, pero también puede ser debido a un manejo inadecuado del apicultor.

La distribución de enfermedades de cría entre las diferentes zonas climáticas de la región reveló que la prevalencia de casos de loque americana fue mayor ($P < 0.05$) en la zona de de la Terra Fria en comparación con la zona de la Terra Quente.

Estos datos sugieren, que los apicultores de la Terra Quente realizan, posiblemente, una gestión sanitaria más adecuada de sus colmenares, haciendo la prevención de estas enfermedades de una forma más planificada. No obstante, el manejo descuidado del apicultor (incluyendo la profilaxis que él realiza o no), puede ser uno de los factores a considerar, pues es una de las formas de contagio entre las distintas colmenas. Podrán, sin embargo, contribuir otras causas a la explicación de estos resultados, como por ejemplo, el desconocimiento del apicultor en relación a la sintomatología de campo de las distintas enfermedades de la cría o de alguna en particular. Quizás esta situación de un manejo sanitario inadecuado también refleje la falta de profesionalidad del sector apícola en la región de estudio ya que la mayoría de los apicultores practica esta actividad como un complemento de su explotación agrícola o como una actividad de ocio. En consecuencia, sería necesario investigar en futuros estudios las razones de estas diferencias.

Respecto al efecto del año y por orden decreciente, la enfermedad que presentó mayor frecuencia es la varroosis (43,4 y 45,5%), seguida de la loque americana (12,6 y 8,6) y de la ascosferiosis (4,2 y 2,0). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre años en el porcentaje de muestras positivas diagnosticadas de las distintas enfermedades de la cría de abejas (Tabla 4). Estos datos son consistentes con los encontrados por Vaz (2007) que mostró, la prevalencia de las mismas enfermedades de la cría de abejas, detectadas en el muestreo nacional realizado en 2006. Pero el promedio de casos positivos solo tuvo una incidencia similar en el caso de ascosferiosis,

pues, en relación a la varroosis y loque americana, nuestros resultados reflejan una frecuencia regional mayor.

Conclusión.

La varroosis sigue siendo la enfermedad de la cría de abejas que causa mayor preocupación regional y nacional. Así, las entidades responsables del sector apícola portugués deben mantener una atención particular a las estrategias para su control, insistiendo en la sensibilización de los apicultores para la realización de un manejo adecuado (incluyendo siempre medidas de profilaxis) de sus colmenares.

Agradecimientos.

Agradecemos a las asociaciones de apicultores y cooperativas de apicultores que colaboraran en la recogida, envío y / o entrega de muestras, por la disponibilidad de datos que forman la base de este trabajo.

Referencias.

- Agroconsultores y Coba (1991). Projecto de Desenvolvimento Rural Integrado de Trás-os-Montes, Carta de Solos, Carta de Uso da Terra e Carta de Aptidão da Terra do Nordeste de Portugal, UTAD, Vila Real, Portugal, 111p.
- Gonçalves, D. A. (1985). Contribuição para o Estudo do Clima da Bacia Superior do Rio Sabor: Influência da circulação geral e regional na estrutura da baixa atmosfera. Tese de Doutoramento. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal
- Programa Apícola Nacional Triénio de 2011-2013, (2010). Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Regional e das Pescas, Gabinete de Planeamento e Políticas, Lisboa, Portugal, 103p.
- SAS Institute Inc., (1995). Users Guide, Version 6, Third Edition, Cary, NC. 582p.
- Vaz, Y., (2007). Resultados do Rastreio Apícola Nacional 2006. Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, Direcção-Geral de Veterinária, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária Publicações, Fórum Nacional de Apicultura, Boticas, Portugal.

	2008		2009	
	Número	%	Número	%
Muestras viables	142	99,30	195	98,48
Muestras inviables	1	0,70	3	1,52
Total de muestras remitidas por año de estudio	143	100,00	198	100,00
Total de muestras	341			

Tabla 1. Número de muestras remitidas al LPAESAB durante el período de estudio.

Estación	Varroosis		Loque americana		Ascoferiosis	
	N	%	N	%	N	%
Primavera	194	36,6a	72	9,1a	18	1,5a
Verano	56	62,5b	35	12,5a	7	7,1b
Otoño	53	64,2b	34	7,6a	4	5,7b
Invierno	34	31,4a	11	17,1a	6	0a

Tabla 2. Porcentaje (%) de muestras positivas obtenidas por estación del año en el período total de estudio. ^{a,b} En la misma columna valores con diferentes anotaciones son significativamente diferentes (P<0,05).

Zona	Varroosis		Loque americana		Ascoferiosis		Muestras inviables
	N	%	N	%	N	%	%
Terra fría	185	47,87 ^a	90	15,43a	29	2,66a	1,6
Terra Quente	152	40,52a	62	3,92b	6	3,27a	0,65

Tabla 3. Porcentaje (%) de muestras positivas obtenidas por y entre las zonas climáticas distintas de la región del Noreste de Portugal ^{a,b} En la misma columna valores con diferentes anotaciones son significativamente diferentes (P<0,05).

Años	Varroosis		Loque americana		Ascoferiosis		n
	N	%	N	%	N	%	
2008	142	43,36 ^a	62	12,59a	18	4,20a	6
2009	195	45,45a	90	8,59a	17	2,02a	4

Tabla 4. Porcentaje (%) de muestras positivas obtenidas por año y entre años período total de estudio ^{a,b} En la misma columna valores con diferentes anotaciones son significativamente diferentes (P<0,05).

Actividad acaricida frente a *Varroa destructor* de aceites esenciales obtenidos de *Thymus* sp.

M^a J. Gracia^{1,5}, S. Bayarri², R. Lázaro², L. Corredera², J. Burillo³, M. A. Peribáñez¹, A. Sanz⁴, A. Herrera², C. Pérez-Arquillué²

¹Departamento de Patología Animal, ²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, ³Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Gobierno de Aragón, ⁴ADS Provincial de Zaragoza.

⁵ Departamento de Patología Animal, Área de Sanidad Animal. Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria. C/ Miguel Servet 177, 50013. Zaragoza. Teléfono: 976 761562; FAX: 976 761590; Correo electrónico: mjgracia@unizar.es

Resumen.

Se ha estudiado el efecto acaricida frente a *Varroa destructor* Anderson & Trueman de aceites esenciales procedentes de mejorana (*Thymus mastichina* L.), tomillo francés (*Thymus vulgaris* L.) y tomillo rojo (*Thymus zygis* L.). El sistema de extracción de los aceites esenciales fue por hidrodestilación mediante el método Clevenger. Por cromatografía de gases se comprobó que el componente mayoritario en *T. zygis* era el timol y en *T. vulgaris* el α terpineno. El efecto acaricida de los aceites esenciales frente a *V. destructor* se ha valorado mediante un ensayo de laboratorio. Los ácaros se colocaban en placas de Petri, en las que previamente se habían depositado diferentes concentraciones (de 0,5 a 25 μ l) de los aceites esenciales objeto de estudio. La supervivencia de los ácaros se evaluó a las 24 horas. El aceite esencial más eficaz es el que procedía de *T. zygis* y su mayor eficacia parece responder a un mayor contenido en timol.

Summary.

We have studied the acaricidal effect of essential oils from marjoram (*Thymus mastichina* L.), French thyme (*Thymus vulgaris* L.) and red thyme (*Thymus zygis* L.) against *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Extraction of essential oils was carried out by hydrodistillation Clevenger method. Gas chromatography analysis revealed that thymol was the major component of *T. zygis*, and α -terpinene was majoritary in *T. vulgaris*. Acaricidal effect of essential oils against *V. destructor* has been assessed by laboratory testing as follows. The mites were placed in Petri dishes, with different concentrations (0.5 to 25 μ l) of essential oils. Survival of mites was registered after 24 hours. The most effective essential oil was that from *T. zygis* and seems to respond to a higher content of thymol.

Introducción.

El control de *Varroa destructor* (Anderson & Trueman) se basa principalmente en la utilización de acaricidas de síntesis que pese a su reconocida eficacia frente al ácaro, en ocasiones pueden ocasionar problemas de resistencias y residuos en los productos de la colmena. Los acaricidas naturales son una alternativa a estos productos debido a la baja toxicidad para las abejas, poco impacto ambiental y a su amplia aceptación social, siendo habitualmente utilizados en apicultura ecológica. Entre los productos naturales, los aceites esenciales han mostrado eficacia en el control de *V. destructor* y es, entre sus componentes, el timol, el que ha dado los resultados más prometedores.

Aragón posee una gran diversidad vegetal y sus características climáticas favorecen el desarrollo de diversas especies de tomillo (*Thymus* sp). Uno de sus componentes mayoritarios es el timol, que posee propiedades antisépticas, tonificantes y acaricidas. En relación a esta última, resulta interesante conocer la posible actividad acaricida de los aceites esenciales procedentes de estas plantas y comparar si existen diferencias en cuanto a su eficacia sobre *V. destructor* en función de cuál sea su origen botánico.

El objetivo de este trabajo ha sido valorar la eficacia frente a *V. destructor* en condiciones de laboratorio y obtener la DL50 de aceites esenciales extraídos de tres especies de *Thymus* sp.: *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*.

Material y Métodos.

Los aceites esenciales evaluados procedían de mejorana (*Thymus mastichina* L.), tomillo francés (*Thymus vulgaris* L.) y tomillo rojo (*Thymus zygis* L.). Las muestras de mejorana eran originarias de una población en estudio de Trasobares (Zaragoza), mientras que las del tomillo francés y el rojo eran de un cultivo experimental de Villarroya de la Sierra (Zaragoza). El sistema de extracción de los aceites esenciales fue por hidrodestilación mediante el método Clevenger.

En las especies procedentes de los cultivos experimentales (*T. vulgaris* y *T. zygis*), tras análisis por cromatografía de gases, se determinó que el componente mayoritario en *T. zygis* era el timol y en *T. vulgaris* el α -terpineno. En *T. mastichina* no se realizó dicho análisis.

El efecto acaricida de los aceites esenciales frente a *V. destructor* se ha valorado mediante un ensayo de laboratorio según la técnica de Lindberg, et al., (2000). Para ello, se tomaron muestras de colmenas parasitadas que no habían recibido ningún tratamiento acaricida. Una vez en el laboratorio, se recogían los ácaros de las larvas de abeja *Apis mellifera* y se colocaban en placas de Petri (hasta 5 ácaros, junto a 2 larvas de abeja por placa). Previamente, se habían depositado diferentes volúmenes (0,5, 1, 5, 15, 20 y 25 μ l) de los aceites esenciales objeto de estudio, disueltos en 1ml de alcohol y dejándolo evaporar durante 24h. Para cada concentración y aceite ensayado se realizaron tres réplicas. La supervivencia de los ácaros se evaluó a las 24

horas. Los datos eran analizados utilizando la transformación probit (Finney, 1971; Milani, 1995).

Resultados y Discusión.

Los valores medios e intervalo de DL50 y DL95 (expresado en μl) de cada aceite esencial ensayado frente a *Varroa destructor* se presentan en la tabla siguiente:

A las 24 horas, la DL50 más baja fue la obtenida con el aceite esencial extraído de *T. zygis*. La DL50 intermedia procedía de *T. vulgaris* mientras que el aceite esencial extraído de *T. mastichina* obtuvo la DL50 más alta.

El aceite esencial más eficaz fue el que procedía de *T. zygis*; la DL50 media obtenida fue de 15 a 31 veces inferior a la obtenida con *T. vulgaris* y *T. mastichina*, respectivamente. La mayor eficacia de *T. zygis* parece responder a un mayor contenido en timol, mientras que el α -terpineno, componente mayoritario de *T. vulgaris*, posee un menor efecto acaricida frente a *V. destructor*. En cuanto a *T. mastichina*, de la que no conocemos su composición, sería interesante cuantificar la proporción de timol y determinar además la posible presencia de otros componentes.

La baja DL50 obtenida con *T. zygis* plantea la posibilidad de llevar a cabo en un futuro ensayos de campo con el fin de valorar su eficacia real y los posibles efectos adversos en la población apícola. Asimismo, también sería interesante conocer si existe una posible acción repelente de estos aceites que de alguna manera pudiera impedir la entrada de los ácaros en la cría de abeja, y/o alterar la reproducción de *V. destructor*.

Ante los resultados obtenidos, la ubicación de colmenas en un entorno con una vegetación espontánea de *T. zygis*, podría ser una pauta de manejo positiva en el control de *V. destructor*.

Agradecimientos.

Grupos Consolidados A 42 y A 01 (Reconocidos por el Gobierno de Aragón, con la financiación del Fondo Social Europeo) y Ayudas a los laboratorios apícolas (Gobierno de Aragón). Asimismo agradecemos la colaboración de D. Ángel Ortillés y D. Abel Cervero.

Referencias.

- Finney D.J. (1971). Probit Análisis, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lindberg, C., Melathopoulos, A., Winston, M.. 2000. Laboratory Evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni*, a honey bee parasite. J. Econ. Entomol., 93:189-198.
- Milani N. (1995). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. Apidologie, 26: 415-429.

Reducción de la población de *Varroa destructor* en colmenas dotadas de fondos sanitarios de rejilla

S. León, S. Gil, J. M. Flores, F. Padilla, F. Campano.

Departamento de Zoología. Universidad de Córdoba. Edificio C-1. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba. Correo electrónico: ba1flsej@uco.es

Resumen.

La lucha contra *Varroa destructor* se basa en gran medida en el uso de compuestos químicos de síntesis. Además del reducido número de principios activos disponibles, están apareciendo resistencias del parásito a todos ellos. Por este motivo medidas de manejo que permitiesen incrementar el intervalo de tiempo entre tratamientos, serían de gran ayuda para los apicultores. En el presente trabajo hemos estudiado el efecto del uso de fondos sanitarios sobre la población de varroa de colonias de abejas mediante el estudio de la caída natural de los ácaros. Concluimos que los fondos sanitarios permiten una mayor eliminación de ácaros de las colonias.

Introducción.

Varroa destructor sigue siendo el principal problema sanitario de la apicultura española y podemos afirmar que también el de la apicultura a escala global. La lucha frente al parásito se ha apoyado fundamentalmente en los tratamientos químicos de síntesis. Inicialmente productos como el Folvex Va[®], (bromopropilato) se mostraron poco eficaces. Otras sustancias lo sustituyeron (fluvalinato, flumetrina, amitraz, coumafós, etc.) evitando su uso la práctica desaparición de la apicultura. No obstante, estos tratamientos no fueron ni son la panacea. Además, el reducido número de sustancias admitidas o la mala administración han provocado la aparición, en mayor o menor medida, de resistencia del parásito a todos ellos (Rosenkranz y cols. 2009). De hecho, en lugares como Brasil, donde la abeja africanizada era capaz de controlar al parásito sin necesidad de tratamientos, se está produciendo un cambio en la relación parásito-hospedador, que está obligando al uso de acaricidas para evitar la pérdida de colmenas.

Es importante resaltar que el uso de tratamientos químicos de síntesis puede conllevar la aparición de alguno o varios de los siguientes problemas:

- Resistencias por parte del parásito a los principios activos empleados.
- Riesgo de aparición de residuos de acaricidas en la miel cuando no son aplicados adecuadamente.
- Falta de una alternancia eficaz (tratamientos autorizados). Las perspectivas de que aparezcan nuevas moléculas para este fin no son muy halagüeñas.

- Un alto nivel de residuos en las ceras que pueden ser una causa de la reducción de vitalidad de la cría y las abejas adultas, siendo otra probable causa del síndrome de despoblamiento de las colmenas.

Por otra parte, cuando hablamos de medidas de manejo para el control de varroa, de lo primero que nos acordamos es de criar zánganos y retirarlos antes de que nazcan, llevándonos con ellos gran cantidad de parásitos. Nos suele faltar la imaginación para desarrollar y aplicar otros métodos de manejo que puedan ser eficaces y aplicables en un alto número de colmenas.

El objetivo de este trabajo ha sido probar sueldos sanitarios para reducir la población de Varroa en las colmenas. Es un estudio preliminar realizado con un lote pequeño de colmenas y durante un tiempo limitado.

Material y Métodos.

El ensayo fue realizado en el término municipal de Córdoba (España), en un periodo comprendido entre febrero y agosto de 2010. Elegimos 15 colonias de abejas *Apis mellifera iberiensis* que estaban albergadas en cajas del modelo Langstroth.

Las 15 colonias fueron distribuidas al azar en tres grupos de cinco colonias de acuerdo a la siguiente distribución: Grupo (a) dotadas de un fondo tradicional cerrado, Grupo (b) con fondo sanitario y bandeja inferior (sin cartulina ni vaselina), Grupo (c) Colmenas en las que se mantuvo el fondo sanitario sin bandeja inferior.

En todas las colonias se midió inicialmente la caída natural de varroa en los fondos durante un periodo de 4 días. Para ello se dotaron todas de fondos sanitarios con rejillas y una bandeja inferior donde se colocó una cartulina impregnada de vaselina para poder valorar el número de parásitos caídos.

Durante cuatro meses, entre el 9 de abril de 2010 y el 5 de agosto de 2010 se mantuvieron las colmenas con sus correspondientes fondos. Transcurrido este periodo se volvió a colocar a todas las colmenas fondos sanitarios con bandeja y cartulina impregnada de vaselina durante cuatro días, para volver a evaluar la población de Varroa mediante la caída natural de parásitos.

Para el análisis estadístico de los datos usamos el programa estadístico SPSS®. Dado el bajo número de colonias usadas en el ensayo, realizamos un análisis no paramétrico “Kruskal-Wallis Test” para la comparación de muestras no relacionadas. En nuestro caso comparamos las medias de caída natural de parásitos en los tres grupos.

Resultados.

De las 5 colmenas con las que iniciamos los ensayos en cada grupo, se mantuvieron 3 del primer grupo (a), 4 del segundo grupo (b) y 5 del grupo 3 (c). Las otras 3 colmenas (dos del grupo “a” y una del grupo “b” fueron retiradas debido a que cambiaron las reinas o bien mostraron síntomas de ascoferiosis.

La media de parásitos caídos en los fondos al final del período experimento fueron:

- Grupo “a” (colmenas con fondos normales) $660,67 \pm 219,75$ varroas.
- Grupo “b” (colmenas con fondos con rejilla y bandejas inferiores) $461,00 \pm 196,48$ varroas.
- Grupo “c” (colmenas con fondos de rejillas y sin bandejas) $189,00 \pm 57,46$ varroas.

En la figura 1 se muestra gráficamente la caída natural de parásitos tanto al inicio de los ensayos como al final del ensayo.

El test de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los tres grupos ($p = 0,211$) en la caída de parásitos en el último control realizado.

Discusión.

El número de ácaros caídos a los fondos de las colonias es proporcional al número de parásitos (nivel de parasitación) presentes en las colonias. Por lo tanto podemos usar la caída natural como un medio que permite valorar el grado de infestación. Obviamente esta técnica también nos permite conocer la evolución de la parasitación entre grupos de colonias.

Los datos mostrados en la figura 1 nos permiten afirmar que los fondos higiénicos son útiles para reducir la población de parásitos, pero el limitado número de colmenas usadas en el experimento no nos permite afirmarlo categóricamente.

En cualquier caso, estos resultados, aunque preliminares, nos hacen pensar que los fondos sanitarios pueden ser una herramienta interesante para el control de la varroosis.

En la revisión bibliográfica realizada hemos constatado que son escasos los trabajos científicos dedicados a la valoración de este tipo de fondos como herramienta de lucha contra varroa. Aunque sean escasos los trabajos científicos, son abundantes las citas de apicultores que si los utilizan.

Harbo y Harris (2004) encontraron un menor crecimiento de la población de varroas en colmenas con fondos higiénicos, frente a colmenas con fondos normales de madera. Es más, estos autores, cuando colocan bandejas en los fondos higiénicos, también encuentran una tendencia a la reducción de la población de parásitos, de forma similar a lo que indican nuestros resultados. Igualmente, Chapleau (2003) en su trabajo recomienda el uso de fondos higiénicos. Delaplane *et al.* (2005) confirma que los fondos sanitarios retrasan el crecimiento de la población de parásitos, alargando el lapso de tiempo entre tratamientos.

Hemos observado la caída de varroas a los fondos de las colonias de forma natural. Muchos de los ácaros estaban vivos y es probable que cierto número de ellos puedan volver a parasitar a las abejas. En los fondos tradicionales las abejas se encuentran al alcance de los parásitos, pero en los fondos sanitarios los parásitos caen al suelo, sin posibilidad de volver a la colmena. En el caso de fondos sanitarios provistos de bandejas, la distancia de la bandeja a la rejilla

reduce de forma importante las posibilidades de volver a encaramarse a un hospedador.

Sabemos que las altas temperaturas suelen afectar negativamente a la supervivencia de los parásitos, por lo que es posible que ocurra una caída natural más frecuente de los mismos, quedando sus posibilidades de recuperación reducidas en el caso de utilizar fondos sanitarios. En este sentido, Tabor y Ambrose (2001) citan que el incremento de la temperatura provoca una mayor caída natural de parásitos desde las abejas, reconociendo que muchos ácaros caen vivos y con posibilidades de volver a parasitar a otra abeja. En el mismo sentido Chapleau (2003) llega a recomendar una distancia de 4 cm entre una posible bandeja inferior y la rejilla sobre la que caminan las abejas, con el fin de dificultar el retorno de los parásitos. Si además de existir una separación quitamos la bandeja y permitimos que las varroas caigan al suelo, el método se vuelve más expeditivo y efectivo, como sería lo ocurrido en el tercer grupo de colmenas de nuestro experimento.

Esta misma hipótesis es empleada por Pettit y Shimanuki (1999) en su trabajo, concluyendo que el uso de fondos higiénicos también es útil en la selección de colonias tolerantes a *Varroa*, no permitiendo el regreso de los parásitos a las abejas cuando caen al fondo como consecuencia del comportamiento higiénico desarrollado por las abejas.

Referencias.

- Chapleau, J. P. (2003). Experimentation of an Anti-Varroa screening bottom board in the context of developing an integrated Management strategy for Varroa infested honeybees in the province of Quebec. Final report. http://www.countryrubes.com/images/AV-BOTTOM_BOARD.pdf
- Delaplane, K. S; Berry, J. A; Skinner, J. A; Parkman, J. P; Hood, W. M. (2005). Integrated pest management against *Varroa destructor* reduces colony mite levels and delays treatment threshold. *Journal of Apicultural Research* 44: 157-162.
- Harbor, J. R; Harris, J. W. (2004). Effect of screen floors on populations of honey bees and parasitic mites (*Varroa destructor*). *Journal of Apicultural Research* 43: 114-117.
- Pettis, J. S; Shimanuki, H. (1999). A hive modification to reduce varroa populations. *American Bee Journal* 139 (6): 471-473.
- Rosenkranz P., P. Aumeier, B. Ziegelmann (2009). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: 96-119.
- Tabor, K. L; Ambrose, J. T. (2001). The use of heat treatment for control of the honey bee mite, *Varroa destructor*. *American Bee Journal* 141: 733-736.

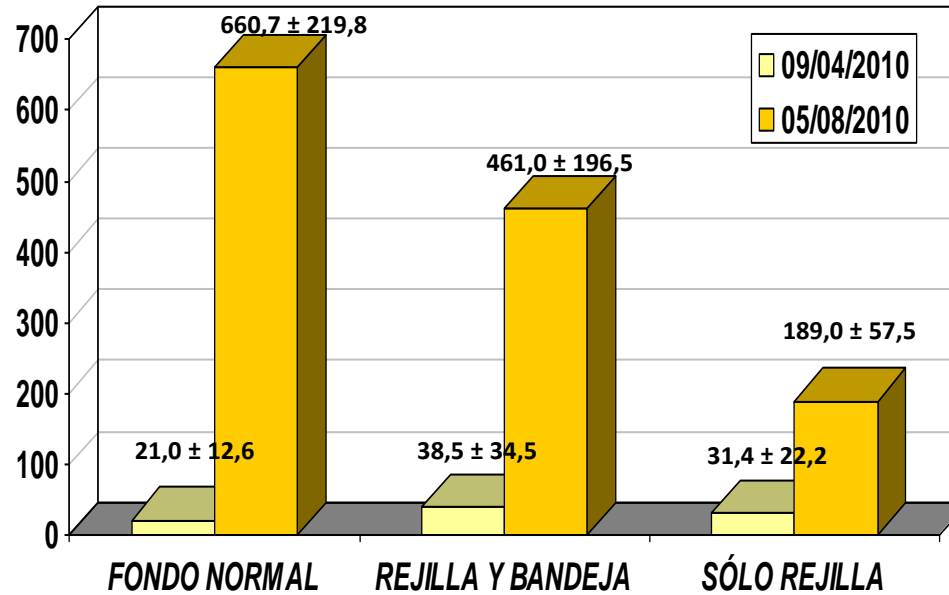


Figura 1. Caída natural de varroas (número medio de parásitos caídos ± error estándar) en tres grupos de colmenas que se mantuvieron con tres tipos de fondos diferentes durante 4 meses. El primer grupo permaneció con un fondo tradicional de madera, en el segundo el fondo fue sustituido por un fondo sanitario (de rejilla) con una bandeja inferior y en el tercero se sustituyó también por un fondo sanitario pero sin bandeja inferior. Los datos muestran la caída de parásitos al inicio y final del experimento.

Prevalencia y estacionalidad de diferentes patógenos de importancia apícola en Uruguay

K. Antúnez¹, M. Anido¹, B. Branchiccela¹, C. Invernizzi², J. Harriet³, J. Campá³, P. Zunino¹.

¹Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: pablo@iibce.edu.uy

²Sección Etología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

³Sección Apicultura, DILAVE, MGAP.

Summary

Apiculture in Uruguay has suffered a severe decline in recent years. Although no massive losses of hives have been detected, a significant drop in numbers and yields has been observed. Pathogens probably have a role in the occurrence of these episodes. The main objective of the present work was to assess the prevalence and seasonally distribution of diverse bee pathogens in Uruguay. Two apiaries with a history related to hive losses were selected and the presence of *Paenibacillus larvae*, *Varroa destructor*, *Nosema* spp. and viruses ABPV, BQCV, DWV, SBV, IAPV and KBV was assessed.

At the beginning of this assay (autumn of 2009) we found a high viruses prevalence (98, 95, 93 and 83 % for BQCV, DWV, ABPV and SBV respectively). Incidence of *V. destructor* was also high (98%) although *Nosema* spp. was detected in 10% of the hives.

Along the year a marked seasonality of DWV, ABPV and SBV was observed since the number of infected hives in spring decreased to 48, 48 and 35 % respectively, while BQCV maintained a high incidence along the whole year (98%). *V. destructor* showed a high prevalence in autumn but it dramatically dropped to 0% after an appropriate treatment was applied. In addition, *Nosema* spp. infection exhibited an inverse behaviour since its incidence increased in spring. Neither IAPV nor KBV were detected in Uruguay and *P. larvae* spores were not found in honey samples, indicating a marked decrease in the presence of this bacterium.

The high degree of infection and co-infection of different pathogens could be probably involved in losses reported in recent years.

Introducción

La actividad apícola en Uruguay ha sufrido un declive durante estos últimos años. Si bien no se han registrado episodios masivos de despoblación de colmenas similares a los reportados en Estados Unidos o varios países de Europa (Neumann & Carreck, 2010; Ratnieks & Carreck, 2010), se ha notado una disminución en el número de colmenas y en su productividad, debiéndose posiblemente a la presencia de diferentes patógenos.

Entre las potenciales causas, se encuentra la presencia de diferentes virus ARN. Se han descrito y caracterizado más de dieciocho virus que afectan a las abejas, entre ellos el virus de la parálisis crónica (CBPV), virus de la parálisis aguda (ABPV), virus de la celda negra (BQCV), virus de la cría ensacada (SBV), virus de las alas deformadas (DWV), Kashmir virus (KBV) y virus de la parálisis Israeli (IAPV) (Bailey & Ball, 1991; Chen & Siede, 2007; Maori y col., 2007). Cinco de estos virus han sido previamente detectados en nuestro país (Antúnez y col., 2005, Antúnez y col., 2006). Se ha propuesto que no son los virus por si mismos los causantes de las mortandades, sino que ofician un factor desencadenante en colmenas afectadas por patógenos de distintas clases, como el ácaro *Varroa destructor* o el microsporidio *Nosema ceranae* (Higes y col., 2008; Genersch & Aubert, 2010).

En los últimos años se ha corroborado una importante incidencia de estos patógenos en el país y el peso que estas afecciones pueden tener en las pérdidas de colmenas está en debate (Toscano, 2005).

Dada la gravedad de los episodios de mortandad de abejas que están ocurriendo en el mundo consideramos que es de fundamental importancia conocer la situación los patógenos apícolas en Uruguay. La determinación de la influencia de distintos factores en las pérdidas de colmenas, podría ayudar a comprender y enfrentar con eficacia este problema.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la prevalencia y distribución estacional de patógenos de importancia apícola en apiarios con antecedentes de pérdidas de colmenas, en Uruguay.

Materiales y Métodos.

Se seleccionaron dos apiarios con antecedentes de pérdidas de colmenas en temporadas anteriores, localizados en Colonia y Canelones, zonas de mayor producción apícola del país. En cada apiario se realizaron muestreos estacionales durante el año 2009 (otoño, invierno, primavera y verano) y se tomaron muestras de veinte colmenas. Cada muestra consistió en miel, abejas nodrizas y abejas pecoreadoras. Se tuvo especial cuidado en que las abejas nodrizas llegaran vivas al laboratorio donde se almacenaron inmediatamente a -80°C para evitar la degradación del ARN viral.

La presencia de *Paenibacillus larvae* en miel se analizó mediante la técnica descrita previamente (Antúnez y col., 2004) y la identidad de los aislamientos se confirmó mediante PCR (Piccini y col., 2002).

La presencia de *Varroa destructor* y esporas de *Nosema* spp se determinó en abejas nodrizas y pecoreadoras respectivamente, mediante las técnicas descritas por la Organización Internacional de Sanidad Animal (www.oie.int). Por último se evaluó la presencia de diferentes virus ARN (ABPV, BQCV, DWV, KBV, IAPV, SBV) en abejas nodrizas, para esto se maceraron diez abejas, se extrajo el ARN total, se retrotranscribió y se amplificó mediante Real Time PCR empleando SYBR Green y *primers* específicos para cada virus (Tabla 1). Los

reactivos empleados fueron de Qiagen. Se realizó la cuantificación relativa de cada virus en base a la amplificación del ARNm de la β -actina de la abeja.

Resultados y Discusión.

Al inicio del trabajo, en otoño de 2009, se encontró una alta prevalencia de los diferentes virus en las colmenas pertenecientes a ambos apiarios (93, 98, 95 y 83% para ABPV, BQCV, DWV, ABPV y SBV respectivamente). El porcentaje de infección con *V. destructor* también resultó alto (98%) mientras que el de *Nosema* spp. resultó bajo (10%).

Durante el transcurso del año se observó que el porcentaje de colmenas infectadas con ABPV así como la carga viral, disminuyó de otoño a invierno y luego aumentó levemente hacia el verano, aunque estas variaciones no resultaron significativas.

En el caso de BQCV, el porcentaje de colmenas infectadas se mantuvo alto todo el año en los dos apiarios, siendo superior al 90 % en todas las estaciones. En cuanto a la carga viral, el comportamiento fue diferente en los dos apiarios. Ésta disminuyó significativamente de otoño a invierno y luego aumentó significativamente del invierno a la primavera en el apiario 1, mientras que se mantuvo de otoño a invierno y disminuyó significativamente hacia la primavera en el apiario 2.

La carga viral de DWV disminuyó significativamente de otoño a primavera en ambos apiarios. Lo mismo ocurrió con el porcentaje de colmenas infectadas con este virus, disminuyendo del 95 % en otoño al 53 % en primavera.

En cuanto al porcentaje de colmenas infectadas con SBV así como la carga viral, disminuyeron significativamente de otoño a invierno en ambos apiarios, luego aumentaron significativamente en el apiario 1 y se mantuvo baja en el apiario 2.

En todos los casos se observó una relación entre el comportamiento de cada colmena (carga viral por colmena) y el comportamiento del apiario (porcentaje de colmenas infectadas).

Los virus IAPV y KBV no se detectaron en estos apiarios, no existiendo reportes, hasta el momento, de su presencia en el país ni en Sudamérica.

Un resultado interesante fue el comportamiento de *V. destructor*. En ambos apiarios el nivel de infección así como el porcentaje de colmenas infectadas disminuyó significativamente de otoño a invierno, manteniéndose bajo el resto del año y aumentando hacia el verano. Esto, por un lado comprueba la efectividad de las medidas tomadas para el control de este ácaro (aplicadas en otoño), y por otro refleja que existe una relación entre la presencia de *V. destructor* en una colmena y la presencia de los diferentes virus, ya que presentan el mismo comportamiento estacional.

Por otro lado, la infección por *Nosema* spp. mostró un comportamiento inverso a *V. destructor*, aumentó significativamente de otoño a invierno y se mantuvo alto durante el resto del año.

En cuanto a *P. larvae*, de acuerdo a los resultados obtenidos no sería un mayor inconveniente en estos apiarios, ya que el porcentaje de colmenas infectadas resultó muy bajo, siendo 6% para el apiario 1 y 5% para el apiario 2, teniendo en cuenta todo el año de muestreo. No se observó una estacionalidad en la presencia de este microorganismo en miel. Estos resultados indican una significativa disminución en la prevalencia este microorganismo en el país, coincidiendo con lo reportado por apicultores.

Conclusiones:

Se encontró un alto nivel de infección por los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV en ambos apiarios, mientras que no se detectó la presencia de los virus IAPV ni KBV.

El porcentaje de infección con *V. destructor* resultó alto en otoño (98%) pero las medidas aplicadas para su control resultaron eficientes, logrando disminuir el porcentaje de infección a 0 %.

V. destructor presentó un marcado comportamiento estacional, lo que va acompañado con la estacionalidad de los diferentes virus.

El porcentaje de colmenas infectadas con *P. larvae* resultó muy bajo, indicando una disminución en la prevalencia este microorganismo en el país.

La presencia y co-existencia de los diferentes patógenos probablemente esté involucrado en las pérdidas de colmenas y en la disminución de la producción reportada en nuestro país.

Referencias.

- Antúnez K., D'Alessandro B., Piccini C., Corbella E., Zunino P. 2004. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. J. Invertebr. Pathol. 86: 56-58.
- Antúnez K., D'Alessandro B., Corbella E., Zunino P. 2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. J. Invertebr. Pathol. 90: 69-72.
- Antúnez K., D'Alessandro B., Piccini C., Corbella E., Zunino P. 2006. Honeybee viruses in Uruguay. J. Invertebr. Pathol. 93: 67-70.
- Bailey L., Ball B.V., 1991, Honey bee pathology. . 2nd edn. Academic Press. New York, London.
- Chen Y.P., Siede R., 2007. Honey bee viruses. Adv. Virus Res. 70: 33-80.
- Genersch E., Aubert M. 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Vet. Res. 41:54. DOI: 10.1051/vetres/2010027.
- Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Bailón E.G., González-Porto A.V., Barrios L., del Nozal D.J., Bernal J.L., Jiménez J.J., Palencia P.G., Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ. Microbiol. 10: 2659-2668.
- Johnson R.M., Evans J.D., Robinson G.E., Berenbaum M.R. 2009. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). Proc Natl Acad Sci U S A. 106:14790-14795.

- Kukielka, D., Esperon, F., Higes, M., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2008. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. J. Virol. Methods 147: 275-281.
- Maori E., Lavi S., Mozes-Koch R., Gantman Y., Peretz Y., Edelbaum O., Tanne E., Sela I., 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: Evidence for diversity due to intra and inter-species recombination. J. Gen. Virol. 88: 3428-3438.
- Neumann P., Carreck L.N., 2010. Honey bee colony losses. J. Apicult. Res. 49: 1-6.
- Palacios G., Hui J., Quan P.L., Kalkstein A., Honkavuori K.S., Bussetti A.V., Conlan S., Evans J., Chen Y.P., vanEngelsdorp D., Efrat H., Pettis J., Cox-Foster D., Holmes E.C., Briese T., Lipkin W.I. 2008. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. J. Virol. 82: 6209-6217.
- Piccini C., D'Alessandro B., Antúnez K., Zunino P. 2002. Detection of *Paenibacillus larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. World J. Microbiol. Biotechnol. 18: 761:765.
- Ratnieks F.L., Carreck N.L. 2010. Ecology. Clarity on honey bee collapse? Science. 327:152-153
- Stoltz D., Shen X. R., Boggis C., y Sisson G. 1995. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. J. Apic. Res. 34: 153-160.
- Toscano, 2005. Mesa Apícola de Sanidad. 1º Congreso de Apicultura del Mercosur.
- Yang X., Cox-Foster D.L. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 7403-7775.

Referencia	Virus/ Gen
Johnson y col 2009	ABPV
Kukielka y col 2008	DWV
Kukielka y col 2008	BQCV
Johnson y col 2009	SBV
Stoltz y col 1995	KBV
Palacios y col 2008	IAPV
Yang & Cox-Foster 2005	BACTINA

Tabla 1. *Primers* empleados para la detección y cuantificación de los diferentes virus.

Primer diagnóstico de *Aethina tumida* en la Unión Europea

M. J. Valério da Silva.

Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – Estrada de Benfica, 701
1549-011 Lisboa, Portugal. Correo electrónico: mjose.valerio@Iniv.min-
agricultura.pt

Resumen.

La autora describe la primera observación de larvas del *Aethina tumida* (Murray), en abejas *Apis mellifera ligustica*, en la Unión Europea. Las larvas fueron observadas sobre el “candy” que rellenaba parte de las cajitas, donde fueron transportadas las reinas importadas de Tejas, Estados Unidos de América.

Introducción.

Parasito originario de las regiones tropicales y subtropicales situadas al sur del Sáhara, el *Aethina tumida*, también conocido como el “pequeño escarabajo” de la colmena, fue identificado por la primera vez en 1867 por Murray en abejas *Apis mellifera capensis* en África del Sur y descrito como parásito de la misma en 1940 por A. Lundie. *Aethina tumida* pertenece al filo Artrópoda, a la clase *Insecta*, al orden *Coleoptera*, a la familia *Nitidulidae*, al género *Aethina*. Se piensa que por importaciones de paquetes de abejas o por cajas de frutos tropicales provenientes de África del Sur haya sido introducido en los E. U. A. e identificado en 1998 por el Dr. Michael Thomas en Florida. En 2000 fue identificado en Egipto, cerca del Cairo, en 2002 en la Australia y Canadá y en finales de Septiembre de 2004 en Portugal.

El *Aethina tumida* es un parásito que suele realizar parte de su ciclo biológico en la colmena. Los adultos se reproducen en el verano y pueden vivir varios meses. Las hembras fecundadas pasados 6 a 7 días de entraren en la colmena inician la ovoposición en masas muy irregulares. Pasados de uno a siete días estos eclosionan y pasan a larvas. Estas después de 10 a 14 días pasan a pupas que penetran en el suelo. Después de un periodo de 16 a 60 días nacen hembras y machos que salen de la tierra. En el exterior alcanzan la madurez sexual y de nuevo las hembras entran en una colmena para iniciar un nuevo ciclo biológico.

De todos los estadios evolutivos del parásito el más agresivo es el de larva. Esta mide de 8 a 10 mm de longitud de y 2,5 a 3 mm de anchura. Luego después de la cabeza presenta 3 pares de patas muy largas y finas y todo su cuerpo está cubierto por varias filas de espículas, que tienen como finalidad la “flotación “ de la larva en la miel. Esta come de todo en el panal. Restos de cría, polen y la miel que queda toda fermentada y con sabor a naranja ácida. Incluso la larva defeca en la miel. Esta situación podrá llevar al colapso de la colonia de abejas. Se alienta más una vez la importancia de evitar la

importación de países infectados por Aethinose de todo y cualquier material vivo y cada vez más preservar, conservar y mejorar nuestra abeja autóctona.

Material y Métodos.

Se observó en el Servicio de Patología Apícola 122 “cajitas” provenientes de Tejas USA. Estas habían servido de transporte a 122 reinas *Apis mellifera ligustica* que fueron introducidas en núcleos de dos colmenares en Alentejo, cerca de la frontera con España. Las “amas” y las respectivas “cajitas” fueron enviadas para diagnóstico laboratorial, como el consignado en la decisión comunitaria 2003/881/CE, para la pesquisa del *Tropilaelaps* spp. Y del *Aethina tumida*. Las “cajitas” y las respectivas “amas” fueron observadas una a una. La presencia del *Aethina tumida* fue confirmada después de la observación de algunos ejemplares a la lupa estereoscópica con ampliaciones de 6x10 hasta 9x10. El diagnóstico fue confirmado por el Musée de Histoire Naturel de París.

Resultados.

Después de una cuidadosa observación individual de las “cajitas” se detectaron en dos de ellas larvas del del *Aethina tumida*, dos vivas y dos muertas, sobre el “candy”, que había servido de alimento a las “amas” durante el transporte. Las larvas apresentaban una coloración blanca amarillenta, una longitud de 6 a 8 mm y una anchura de 2,5 y 3 mm. Se observaron sobre su cuerpo numerosas filas de espículas (cuya finalidad es evitar que las larvas se ahuden en la miel). No fueron observadas formas adultas, hembras o machos.

Conclusión.

El primero diagnóstico del *Aethina tumida* en la Unión Europea llevó a la alteración de la Decisión Comunitaria 2003/ 881/ CE de 11 de Diciembre, en el respecto a la limitación de la exportación de países infectados. De inmediato surgió la decisión 60/2005/CE para países terceros y después la decisión, 265/2007/CE, todavía con efecto, que obliga al certificado higio-sanitario y a la observación visual de la carga de abejas.

Referencias.

- Lundie, A. E. (1940)- The small hive beetle *Aethina tumida*. Science Bulletin 200. Union Of South Africa; Department of Agriculture and Forest, 30 p.p.
- Sanford, M. T. (1998) - *Aethina tumida*; A New Beehive Pest in Western Hemisphere, Apis vol 16, nº 7.
- Eischen, F. A. (1999)- Beetle watching. American Bee Journal 138 (6): 452-453
- Thomas, M. (2000). A Honeybee Pest New to Florida and the Western hemisphere *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae, June).
- Eischen, F. A. (1999). Beetle watching. American Bee Journal 138: 452- 453.

Índice de Autores

Aller M ^a , 115	Díaz J. R., 115
Anido M., 139	Domínguez Valhondo D., 87
Anjos O., 101	Falcón A., 91
Antúnez K., 139	Fernandes A., 101
Audisio M. C., 109	Fernández I., 115
Bayarri Fernández S., 67	Fernández-Muiño M. A., 95
Bayarri S., 129	Ferrer Ferrer J., 47
Benítez Ahrendts M. R., 109	Flores J. M., 133
Bibiloni Canyelles A., 47	Galán H., 81
Bibniloni Jaume P., 47	Galián J., 7, 31
Bohoyo Gil D., 87	Gallardo Madueño M ^a C., 71
Boi M., 53	Gil Gómez J., 37
Branchiccela B., 139	Gil L., 53
Burillo J., 129	Gil S., 133
Cadavez V., 123	González A., 115
Campá J., 139	González Gómez D., 87
Campano F., 133	Gornes Ametller J., 47
Cánovas F., 7	Gouveia C., 101
Carrascosa C., 91	Gracia M ^a J., 129
Corredera L., 129	Gutiérrez M., 59
Corredera Martín L., 67	Harriet J., 139
De La Rúa P., 7, 23, 31	Hernández T., 87

Hernández-García R., 7	Paulos K., 123
Herrera A., 129	Pedregosa A. M ^a , 115
Herrera Marteache A., 67	Peres F., 101
Higes M., 115	Pérez E., 91
Invernizzi C., 139	Pérez-Arquillué C., 67, 129
Isern Amengual A., 47	Peribáñez M. A., 129
Jara L., 31	Pinto M. A., 23
Jiménez-Pulido A., 95	Pires S., 123
Jodral M., 81	Porrini C., 59
Jodral Villarejo M., 71	Quinteros H., 109
Lafont Deniz F., 71	Rodrigues J. C., 101
Lázaro Gistau R., 67	Rodríguez I., 81
Lázaro R., 129	Rovira J., 41
León S., 133	Ruiz J. A., 59
Lladó G., 53	Sancho M. T., 95
Llorens L., 53	Sanjuán E., 91, 95
Lodesani M., 59	Sanz A., 129
Martín R., 115	Serrano J., 7
Mauricio C., 91	Serrano Jiménez S., 71
Millán M., 91	Serrano S., 81
Millán R., 91, 95	Taltavull M., 53
Muñoz I., 23	Torres Marí V., 47
Ortiz M ^a L., 115	Ubera J. L., 81
Padilla F., 133	Valério da Silva M ^a J., 145

Actas del VI Congreso Nacional de Apicultura

Valério M^a J., 123

Villa Álvarez P., 47

Vergara J. M., 53

Zunino P., 139

