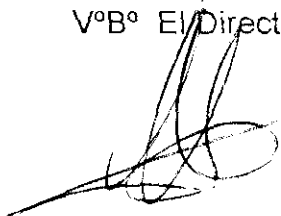


DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
CATEDRA DE BIOLOGIA
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

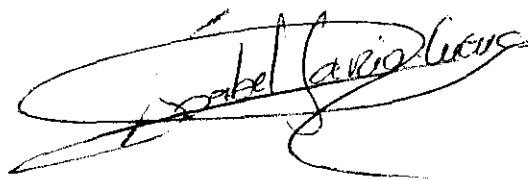
ESTUDIO DEL DESARROLLO POST-EMBRIONARIO EN EL CICLO
HOLOMETABOLO DE LA OBRERA DE APIS MELLIFICA MELLIFICA L.

Memoria presentada para aspirar al Grado de
Doctor en Veterinaria por la Licenciada:
Dña. Isabel García-Cuenca Ariati

VºBº El Director



Prof. Dr. D. Juan Carlos Fontanillas Pérez



El Doctorando

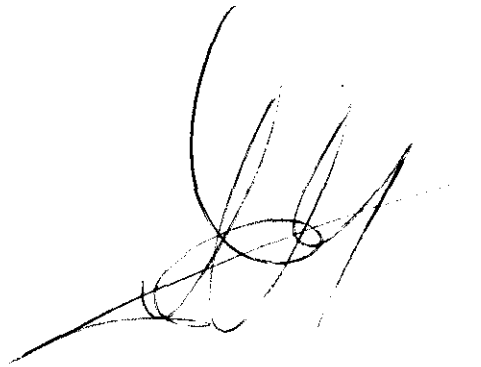
Madrid, 1996

D. JUAN CARLOS FONTANILLAS PEREZ, PROFESOR TITULAR DE BIOLOGIA (ZOOLOGIA Y BOTANICA) DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Informa:

Que la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DEL DESARROLLO POST-EMBRIONARIO EN EL CICLO HOLOMETABOLO DE LA OBRERA DE APIS MELLIFICA MELLIFICA L." de la que es autora Dña. Isabel García-Cuenca Ariati , ha sido realizada en la Cátedra de Biología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo mi dirección y que cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 2 de septiembre de 1996

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned below the date.

Fdo.: Juan Carlos Fontanillas Pérez

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Juan Carlos Fontanillas Pérez por su dirección, ayuda y apoyo en la realización de este trabajo, por su paciencia infinita y por saber separar su condición de Director de la de marido, cosa verdaderamente difícil en algunos momentos.

A los Profs. Drs. D. Tomás Pérez García y D. Leopoldo Cuéllar Carrasco por sus valiosas enseñanzas de la Biología, así como por su aliento y apoyo durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Biología por su desinteresada colaboración y ánimo.

A Dña. Rosa Calvo por su inestimable ayuda en el tratamiento estadístico y por su paciencia para hacerme entender estos procesos.

Al Prof. D. José Luis Guerrero Cerezo "in memoriam". Por toda su ayuda en la elaboración de este trabajo y que desgraciadamente hoy no está con nosotros para verlo terminado. Por enseñarme que nunca se termina de aprender y que hay que tener el espíritu abierto para comprender todo lo nuevo que la vida nos ofrece. Por ésto y por otras muchas cosas más, *gracias. Siempre estarás vivo en mi recuerdo.*

Al Departamento de Anatomía por permitirme usar sus medios informáticos y en especial al Prof. Dr. D. Ignacio de Gaspar y Simón.

A mis amigos de la Cátedra de Farmacología y a los "añadidos" al "comedor farmacológico", Pilar, Pili e Iñaquí, por su ánimo constante y por alegrarme la existencia todos los días en la comida. .

A Mariló por ayudarme a la corrección del trabajo y por darme la lata para que lo acabara de una vez, eso sí, siempre ofreciéndome su ayuda, su apoyo y su alegría. A Casilda y a Manuel por aguantarme con mis problemas y mis dudas e intentar que algo de luz entrara en mi cabeza cuando ya creía que todo era imposible.

A toda mi familia por su apoyo durante estos años, y en especial a mis padres por darme la oportunidad de haber llegado hasta aquí. A mi hijo David por todas las alegrías que me da y por su cariño, aunque también haya tenido una parte de culpa en la demora de este trabajo.

Finalmente a todos aquellos que de una u otra forma me han ayudado a que este trabajo viera la luz.

A todos muchísimas gracias.

A mis padres, a mi marido
Juan Carlos y a mi hijo
David.

INDICE

	Pag
1. INTRODUCCION	2
1.1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	2
1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>APIS MELLIFICA MELLIFICA</i>	4
1.2.1. ANATOMÍA EXTERNA.....	4
1.2.2. ANATOMÍA INTERNA.....	15
1.2.2.1. Aparato digestivo.....	15
1.2.2.2. Aparato circulatorio.....	16
1.2.2.3. Aparato respiratorio.....	16
1.2.2.4. Aparato excretor.....	17
1.2.2.5. Sistema nervioso.....	17
1.2.2.6. Aparato reproductor.....	18
1.2.3. CICLO BIOLÓGICO.....	19
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	21
2.1. EMBRIOGÉNESIS.....	21
2.1.1. DURACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	22
2.2. EXTRACCION DE LARVAS.....	25
2.3. DESARROLLO LARVARIO.....	26
2.3.1. INTRODUCCIÓN.....	26
2.3.2. FORMACIÓN DEL CAPULLO.....	30
2.3.3. MUDAS DURANTE EL PERIODO POST-EMBRIONARIO.....	33
2.3.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO POST-EMBRIONARIO DE LAS ABEJAS OBRERAS.....	44
2.3.4.1. Caracterización de las larvas por el diámetro de la cabeza y por el color de la cabeza y del abdomen.....	44
2.3.4.2. Caracterización de las larvas por el peso.....	48
2.3.4.3. Caracterización por cambios de la estructura externa.....	54
2.3.5. DESARROLLO DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTORES.....	55
2.3.6. DESARROLLO POST-EMBRIONARIO DEL SISTEMA ENDOCRINO DE LAS HEMBRAS DE <i>APIS MELLIFICA</i>	55
3. MATERIAL YMETODOS.....	60
3.1. LOCALIZACION.....	60
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	60
3.2.1. ACONDICIONAMIENTO DE LOS ANIMALES.....	60
3.2.2. ALIMENTACIÓN.....	61
3.2.3. CONTROL SANITARIO.....	61
3.3. FARMACOS Y REACTIVOS.....	61
3.4. MATERIAL DE LABORATORIO.....	62

3.5. MATERIAL FOTOGRÁFICO.....	62
3.6. MATERIAL INFORMÁTICO.....	63
3.7. COLMENAS EXPERIMENTALES.....	63
3.8. MANEJO DE LAS LARVAS.....	67
3.9. SONDEO PRELIMINAR.....	67
3.10. CURVA DE CRECIMIENTO DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO.....	68
3.11. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	70
3.12. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	70
3.13. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE LAS FOTOGRAFÍAS.....	71
4. RESULTADOS	74
4.1. CURVA DE CRECIMIENTO.....	74
4.1.1. ESTADIO LARVARIO.....	76
4.1.2. ESTADIO PUPAL.....	79
4.2. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	80
4.2.1. COLORACIONES CORPORALES.....	80
4.2.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	83
5. DISCUSION.....	125
5.1. CONSIDERACIONES PREVIAS.....	125
5.2. DISCUSION DEL METODO.....	125
5.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	128
5.3.1. CURVA DE CRECIMIENTO.....	128
5.4. ESTUDIO MORFOLOGICO.....	132
6. CONCLUSIONES	137
7. RESUMEN	139
8. BIBLIOGRAFIA	143

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION.

1.1. Justificación del trabajo.

La importancia económica y social de la cría de abejas la han hecho un foco tradicional de investigaciones entomológicas. Recientemente el interés en la biología y desarrollo de las abejas ha generado la necesidad de establecer un método rápido y fiable para identificar los distintos estadios del desarrollo larvario y pupal. Es fundamental el conocimiento del desarrollo larvario, no sólo por un mero conocimiento biológico de este insecto, que servirá como base para posteriores estudios relacionados con el desarrollo larvario y pupal de *Apis mellifica mellifica* L., sino para facilitar el diagnóstico precoz de enfermedades que afectan a la cría, permitiendo conocer en cualquier momento la edad de las larvas afectadas, tanto por un método físico de pesada como por sus características morfológicas.

Son varias las enfermedades que afectan a la cría de abejas, entre las que destacaremos por su poder patógeno la loque, tanto americana como europea, la cría sacciforme, cría encalada, cría momificada y la varroasis. Todas ellas son enfermedades frecuentes en los colmenares y en algunos casos difíciles de diferenciar unas de otras por su sintomatología semejante, afectando a larvas de distintas edades según la enfermedad de que se trate e incluso también a adultos jóvenes.

Las investigaciones dedicadas a este tema son muy amplias y muchas de ellas se hicieron hace más de 50 años, pero según nuestra revisión bibliográfica ninguna se ha realizado con *Apis mellifica mellifica* L., abeja autóctona y la más difundida en España.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Conocer los distintos acontecimientos biológicos que tienen lugar durante el desarrollo larvario y pupal de *Apis mellifica mellifica* L..
2. Establecer la curva de crecimiento de los cuatro primeros estadios larvarios, realizando pesadas de lotes de 5 abejas de *Apis mellifica mellifica* L. cada 24 horas con un diferencia máxima entre los individuos de cada lote de ± 6 horas.
3. Establecer igualmente la curva de crecimiento de las larvas operculadas (larva 5 y pupa) de *Apis mellifica mellifica* L., mediante pesadas individuales de 10 individuos cada 6 y 18 horas desde la operculación hasta la eclosión del imago, con una diferencia de edad entre las larvas de ± 6 horas.
4. Proporcionar un método rápido y fiable para identificar los distintos estadios del desarrollo larvario y pupal de *Apis mellifica mellifica* L..
5. Facilitar el diagnóstico precoz de las enfermedades que afectan a la cría en sus distintos estadios larvarios y pupales.

1.2. Características generales de *Apis mellifica mellifica* L..

En la sistemática zoológica este insecto está encuadrado de la siguiente forma:

Tipo: Artrópodos

Subtipo: Mandibulados o anteníferos.

Clase: Insectos

Superorden: Himenopteroides

Orden: Himenópteros

Género: *Apis*

Especie: *Apis mellifica o mellifera*.

Variedad: *Apis mellifica mellifica* L..

1.2.1. Anatomía externa.

El cuerpo de las abejas está recubierto de un estrato protector llamado exoesqueleto, provisto de cerdas o pelos robustos. Este estrato es más fuerte en las zonas centrales, y más débil y flexible en las articulaciones y en las zonas cercanas a los segmentos.

CABEZA:

En la cabeza se encuentran las siguientes estructuras:

- Ojos: La percepción visual se obtiene a partir de dos tipos distintos de ojos, los ocelos y los ojos compuestos. Los ocelos son tres ojos situados

siguiendo una estructura triangular. Cada ojo consta de una lente simple y densa que deriva de un engrosamiento del exoesqueleto de la cabeza y de células sensoriales retinales. Los ocelos no enfocan ni proveen de imágenes y su función parece que se limita a detectar la intensidad de la luz, regulando la actividad diurna y la orientación.

Los dos ojos compuestos ocupan una parte importante de la cabeza y son complejos órganos visuales capaces de realizar un gran número de funciones fotorreceptivas. Cada ojo compuesto tiene un gran número de facetas exagonales, integrando las señales a partir de las facetas individuales en una imagen en mosaico o por yuxtaposición. El modelo de mosaico está particularmente bien adaptado para detectar el movimiento.

- Antenas: Las antenas son el órgano olfativo de las abejas, consistente cada una en un flagelo con diez segmentos unido a un escapo y un pedicelo que se une a la base. El papel principal de las antenas de las abejas es una acusada sensibilidad olfatoria, así como su capacidad para detectar la dirección del olor a partir de las percepciones de cada una de ellas.

Las antenas tienen otra estructura de gran importancia funcional, los órganos de Johnston. Estos órganos son concentraciones de células sensitivas localizadas internamente en el pedicelo de cada antena. Su función incluye la detección del flujo de aire por el incremento de la curvatura de las antenas como medio para medir la velocidad de vuelo (Figura 1).

- El aparato bucal está situado en el vértice inferior de la cabeza y consta de una pieza impar de forma cuadrangular, denominado labro. Alrededor de la boca se agrupan los apéndices bucales: Las mandíbulas con fuertes dientes quitinosos de una sola pieza movidos por potentes músculos. Las maxilas tienen una estructura más complicada; comportan una base de dos segmentos, el cardo y el estipe sobre los que están fijadas anteriormente dos láminas masticadoras, la lacinia interna y la galea externa, y lateralmente con respecto al exterior el palpo maxilar. Siguen las maxilas que están soldadas medialmente distinguiéndose en ellas una base de dos artejos que comprende un postmentum (soldadura de dos cardos) y un prementum (soldadura de dos estipes). El prementum, lleva en general, dos glosas internas (que corresponden a las dos lacinias), dos paraglosas externas (que corresponden a las dos galeas) y a cada lado un palpo labial. El conjunto constituye el labio inferior (Figura 2).

En el caso de los Himenópteros evolucionados las mandíbulas se conservan dentadas, alargándose las anteriores frecuentemente en hoja de sable; el labio se modifica en una lengua velluda cruzada por un canal capilar utilizado para lamer el néctar de las flores, siendo las abejas las que muestran la máxima especialización.

Las mandíbulas tienen diferentes cometidos, como son: Asir fragmentos y residuos que ensucian la cámara de cría; modelar la cera, para lo cual segregan una sustancia que la reblandece; defensa, etc. Las mandíbulas además se emplean como si fuesen auténticos instrumentos amasadores (Figura 2).

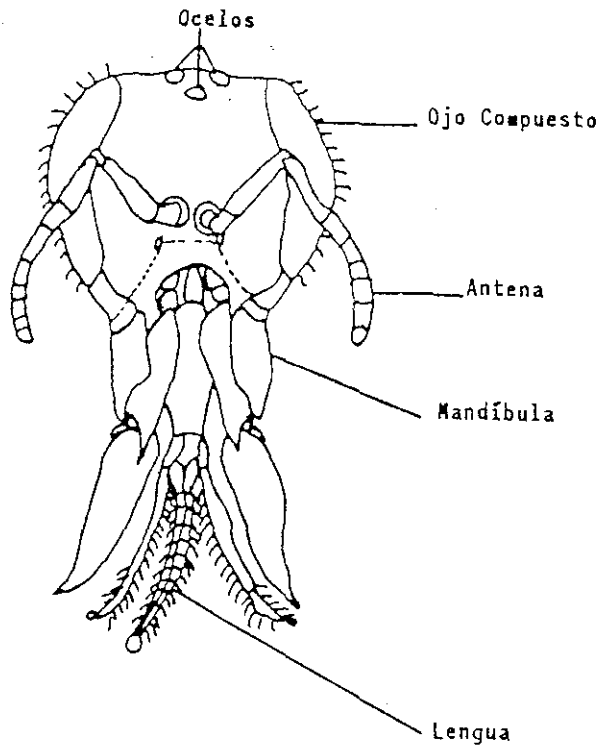
TORAX

El tórax está recubierto de numerosos pelos que disimulan la segmentación, se une a la cabeza a través del cuello, que es delgado y corto. El tórax consta de tres segmentos llamados protórax, mesotórax y metatórax, formado cada uno de éstos por cuatro partes: una lámina dorsal o tergo, una ventral o esterno y dos laterales denominadas pleuras. Los lugares de inserción de las alas reciben el nombre de notopleuras y los de inserción de los apéndices locomotores esternopleuras.

La cabeza y el tórax se distinguen claramente del abdomen por la existencia de un estrechamiento localizado después del primer segmento abdominal y que, morfológicamente forma parte del tórax.

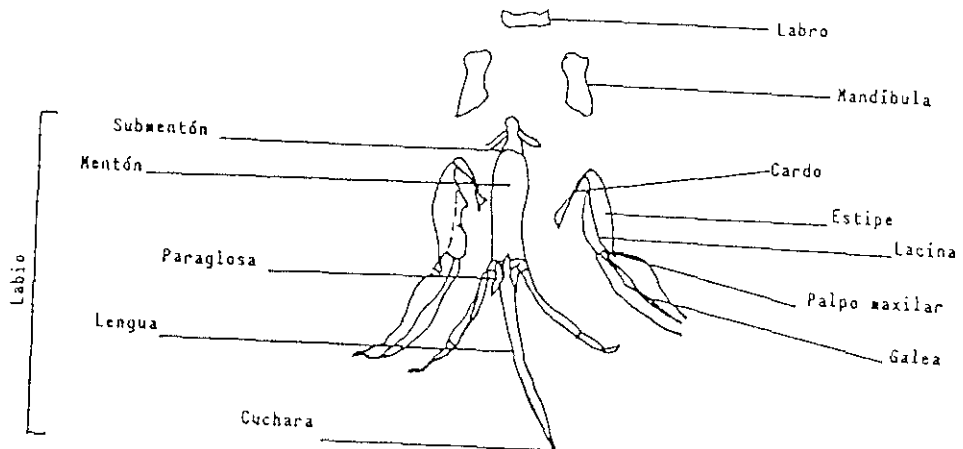
El protórax tiene, en su borde posterior, la fijación del primer par de apéndices ambulacrales, uno por cada lado, además del primer espiráculo traqueal.

Las alas son membranosas, de forma subtriangular atravesadas por numerosas nerviaciones y ganchillos que confieren solidez a las mismas. La superficie del ala va recubierta de numerosos pelos cortos. En posición de reposo, las alas están colocadas paralelamente sobre el abdomen.



CABEZA DE ABEJA OBRERA

Figura 1



PIEZAS BUCALES DE ABEJA OBRERA

Figura 2

El mesotórax, en el que se encuentra localizado el primer par de alas situadas una a cada lado, es el segmento más desarrollado del tórax tomando en su parte superior la forma de escudilo.

La longitud de las alas de las obreras alcanza el extremo del abdomen mientras que las de la reina, aún siendo tan largas como las de la obrera, parecen más cortas debido a su mayor desarrollo corporal. Las alas de los zánganos son anchas y sobresalen del abdomen, que tiene una apariencia más bien grosera y con la extremidad posterior redondeada y cubierta de gruesos pelos.

El metatórax es el tercer segmento del tórax y lleva lateralmente dos prolongaciones que sirven de soporte para los procesos alares del segundo par de alas. Posterior y lateralmente están las cavidades articulares para la inserción del tercer par de apéndices locomotores o patas. Aquí también se encuentra localizado el segundo par de espiráculos traqueales del tórax.

Las alas posteriores son menores que las anteriores y llevan, en su borde superior, numerosos ganchitos que se unen al borde posterior esclerotizado del ala anterior, formando durante el vuelo una estructura única. De esta forma el insecto vuela como si en lugar de cuatro tuviera sólo dos alas grandes, con lo que puede desarrollar gran resistencia y velocidad.

Las abejas poseen tres pares de apéndices locomotores: Anteriores, medios y posteriores, articulados en el punto de unión con las pleuras y el esterno. Las patas se insertan en el protórax, mesotórax y metatórax

respectivamente y constan de una serie de artejos articulados y cubiertos de pelos, denominados coxa, trocanter, femur, tarso y pretarso (Figura 3).

El pretarso es el último segmento articulado. Lleva dos robustos ganchos o uñas bilobulares, entre las cuales se encuentra una ventosa llamada empodio, que permite a la abeja caminar por superficies lisas. Ambas estructuras se encuentran en todas las extremidades de las abejas.

Las patas de las obreras tienen unas características peculiares (Figura 3), encontrándose las mayores transformaciones en la tibia y en el primer artejo del tarso. El primer par de apéndices locomotores es el más corto y en la parte terminal de su tibia hay una espuela bilobular que encaja en una pequeña cavidad del tarso. Cuando el tarso está replegado, el conjunto de espuela y cavidad forma una estructura llamada peine, en el cual introduce la abeja sus antenas haciéndolas resbalar desde la base hasta el extremo distal para limpiarlas, principalmente de polen, en el caso de las obreras.

El segundo par, es algo más largo que el anterior e igualmente robusto. Llevan en la tibia unas cerdas (pelos rígidos), en el lugar correspondiente a la espuela del primer par, mediante las cuales desprenden el polen recogido en los cestillos del tercer par de apéndices locomotores.

La parte exterior de la tibia del tercer par de patas, presenta una cavidad llamada cestillo, y sus bordes están recubiertos de pelos largos. El primer segmento articulado del tarso es ancho, grande y puntiagudo en su parte exterior, mientras que por su interior lleva una serie de pelos que forman la

espátula, y que le permiten recoger el polen acumulado en su cuerpo y depositarlo en los cestillos.

El segmento más distal de la tibia es afilado y junto con el segmento proximal, también afilado del tarso, forma la pinza, que según opinión de algunos autores, debe servir para recoger la cera, aunque según otros autores, la cera es recogida por los segmentos articulados del tarso y de las mandíbulas.

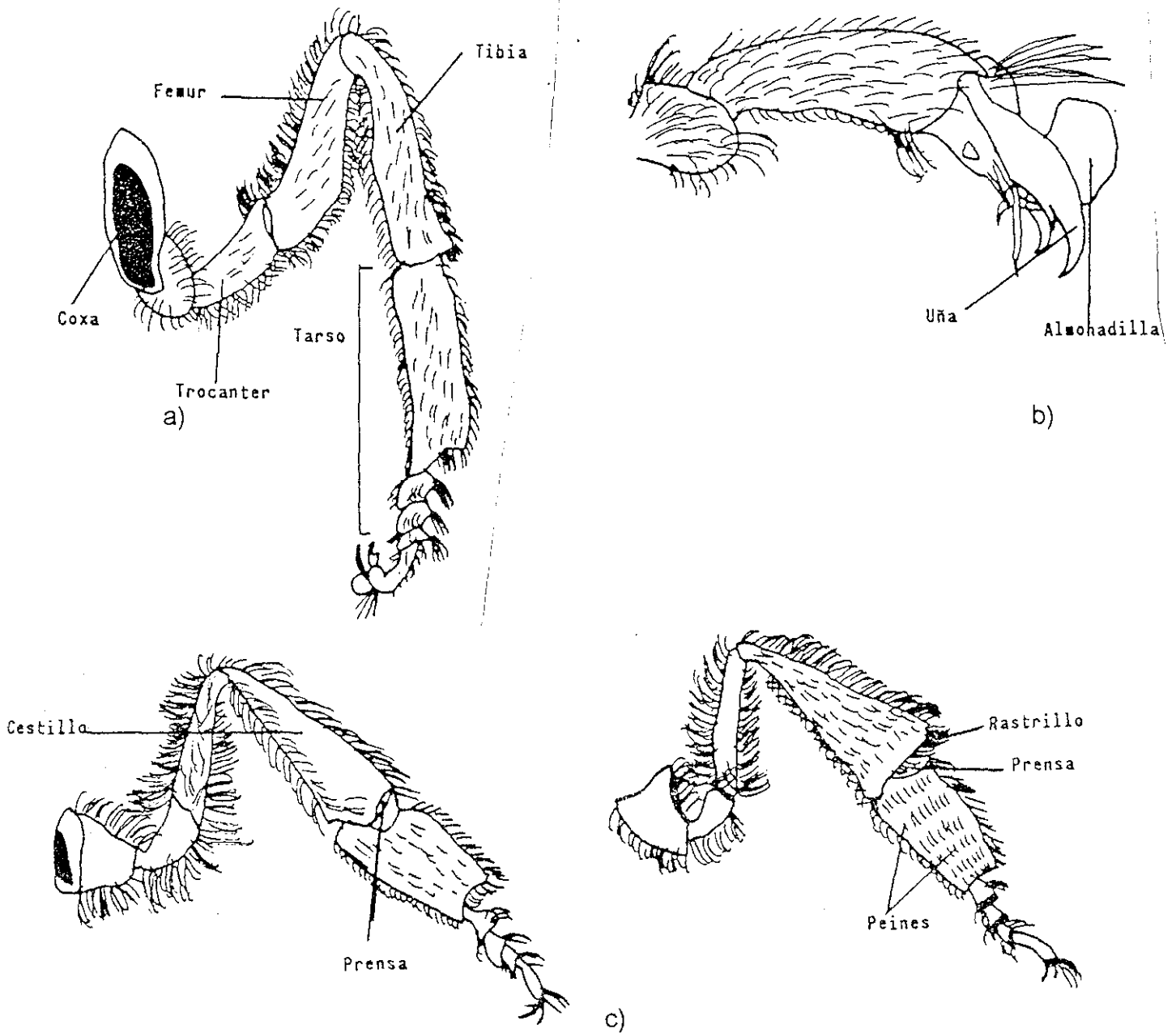


Figura 3
a) Segundo par de apéndices locomotores
b) Segmento pretarsal
c) Tercer par de apéndices locomotores
(Winston, 1987)

ABDOMEN:

El abdomen consta morfológicamente de diez segmentos, aunque sólo se aprecian siete en obreras y reinas, y en los zánganos se observan solamente ocho.

El abdomen de las abejas es pedunculado y el primer segmento, llamado propódeo, aparece incorporado al metatórax.

Al propódeo le siguen los otros seis segmentos, divididos lateralmente, seis superiores o dorsales, doblados en arco y seis ventrales o inferiores que se unen lateralmente entre sí. Todos ellos van revestidos de quitina.

Los segmentos toman en su parte dorsal el nombre de tergitos, y en la parte ventral el de esternitos. Los tergitos están colocados en superposición, como las tejas de un tejado, hacia la parte posterior del cuerpo y en cambio los esternitos tienen forma cuadrangular.

Los esternitos del cuarto, quinto, sexto y séptimo par ofrecen, lateral e interiormente al propio segmento, unas formaciones ovoides denominadas espejos, que se corresponden con las glándulas de la cera.

Las glándulas de la cera están constituidas por unas células hipodérmicas de función glandular. La cera elaborada es fluida y, tras atravesar la cutícula y contactar con el aire se solidifica, formando unas delgadísimas laminillas.

En los costados de cada segmento, hay dos orificios traqueales, espiráculos o estigmas, que intervienen en la respiración.

El último anillo del abdomen, salvo en el zángano, está provisto de aguijón, arma defensiva y ofensiva. El aguijón de la reina, que emplea exclusivamente contra otras reinas, tiene forma de sable con tres denticulos reducidísimos, mientras que el de las obreras que dispone de diez segmentos.

El armazón genital está situado entre el penúltimo y el antepenúltimo segmento abdominal, en tanto que el orificio anal tiene su desembocadura en el décimo y último segmento.

El aguijón forma parte del armazón genital y está constiuido por un puñal largo, hueco y delgado que va estrechándose hacia la extremidad. El puñal está formado, a su vez, por una vaina y dos estiletos terminados, como ya hemos indicado, en diez pequeños dientes vueltos hacia atrás.

En el dorso, entre el sexto y séptimo tergito, hay una glándula odorífera, llamada glándula de Nasanoff, capaz de emitir un olor característico para cada familia. Este captado por las antenas de los miembros de la misma, les sirve para reconocerse. Esta glándula está principalmente desarrollada en las obreras y en la reina.

1.2.2. Anatomía interna.

1.2.2.1. Aparato digestivo.

El aparato digestivo comienza en la cavidad bucal y se continua con el tubo digestivo para terminar en la abertura anal. Comprende una región anterior o estomodeo, una media o mesenterón y otra posterior o proctodeo.

En el estomodeo o intestino anterior, se diferencian, la faringe, el esófago, el buche o bolsa melaria y el proventrículo o estómago muscular.

El mesenterón o intestino medio, se extiende desde un esfínter o válvula cardíaca, que le separa del estomodeo, hasta otro o válvula pilórica que lo hace del proctodeo.

El proctodeo o intestino posterior, se inicia en la válvula pilórica y termina en la abertura anal. Normalmente se distingue una parte anterior y otra posterior o recto. Si el esfínter pilórico se cierra, el proctodeo sólo recibe el contenido de los tubos de Malpighi que desembocan en sus comienzos, pero al abrirse de forma periódica, permite el paso del contenido del mesenterón o intestino medio.

Glándulas digestivas: En las abejas constituyen un sistema complejo, con un par de glándulas mandibulares que utilizar para abrir las celdas y disolver los propóleos y unas glándulas faríngeas y labiales en las que se forma la jalea real y se elabora la cera, respectivamente.

1.2.2.2. Aparato circulatorio.

El aparato circulatorio consta de un vaso dorsal dividido en una parte posterior o corazón y otra anterior o aorta.

El corazón, se halla dividido en diversas cámaras, cada una de las cuales se abre en un par de ostiolos provistos de válvulas, por los que entra la hemolinfa para ser propulsada hacia la aorta, merced a la contracción de los músculos alares. Después la hemolinfa pasa a los senos lagunares irrigando los órganos internos, y finalmente vuelve lentamente hacia atrás al seno pericárdico.

1.2.2.3. Aparato respiratorio.

Es de tipo traqueal y comunica con el exterior por los estigmas o espiráculos, que comunican con un sistema de tubos elásticos o tráqueas, las cuales se ramifican por todo el cuerpo en forma de traqueolas que aportan oxígeno a los tejidos.

Los espiráculos son de forma redondeada y se abren en los segmentos torácicos y en los ocho primeros abdominales.

Las tráqueas son invaginaciones de la cutícula y por tanto están formadas por una capa de células que segrega el revestimiento cuticular. Los tubos traqueales se hallan reforzados por filamentos espirales que impiden su cierre.

1.2.2.4. Aparato excretor.

Los principales órganos excretores son los tubos de Malpighi, filamentosos, de fondo ciego, que desembocan en la unión del mesenterón y del proctodeo. Su función consiste en la eliminación de residuos metabólicos que son evacuados con los excrementos.

1.2.2.5. Sistema nervioso.

El cerebro o ganglio supraesofágico, situado en la cabeza, comprende tres pares de ganglios fusionados (proto, deuto y tritocerebro), con nervios que se dirigen a los ojos, las antenas y a otros órganos cefálicos. Mediante dos conectivos nerviosos que rodean el esófago comunica con el ganglio subesofágico, que también resulta de la fusión de tres pares (mandibular, maxilar y labial). Del último parte hacia atrás el cordón nervioso ventral, formado por una serie de ganglios pares y conectivos longitudinales. Cada segmento torácico contiene un par de ganglios con nervios que van a las patas, alas y órganos internos. Solamente hay cinco pares de ganglios abdominales ya que se han soldado algunos de ellos, que originariamente estaban separados. De ellos parten nervios a los diferentes órganos posteriores. También se ha descrito un sistema nervioso simpático o visceral, formado por una región esofágica con ganglios y nervios que comunican con el cerebro, la porción anterior y media del tubo digestivo y el corazón y una región posterior que va desde el último ganglio abdominal al intestino y al sistema reproductor. Bajo la epidermis de la pared del cuerpo hay una fina red de nervios periféricos.

1.2.2.6. Aparato reproductor.

En el macho cada uno de los dos testículos está formado por un gran número de testiolos, seguidos por los vasos deferentes. En su porción media, los vasos deferentes se amplian formando las vesículas seminales. Más caudalmente siguen un trayecto en forma de "S" y se abre después en el segmento inferior de las glándulas mucosas. Las glándulas mucosas, izquierda y derecha están unidas formando en la parte posterior un cuerpo en forma de "U", que es la parte mayor y más evidente de todo el aparato genital del zángano.

El tubo común de las glándulas mucosas y de las vesículas seminales se abre en el extremo bifurcado del conducto eyaculador, por el que el semen y el mucus llegan al bulbo del pene.

En las abejas existen dos castas hembras. El aparato genital de la reina está formado por dos ovarios que cuentan con un gran número de ovariolos (en cambio en la obrera el número de ovariolos es muy reducido). De los ovarios parten dos oviductos que convergen en un tubo único, cuyo extremo se alarga para formar la vagina. Las obreras poseen los órganos genitales atrofiados, es decir insuficientemente desarrollados para la reproducción.

Unido al aparato genital femenino hay un sáculo llamado espermateca, en el cual vierte su secreción la glándula de la espermateca. En este reservorio se almacenan los espermatozoides después de la cópula, donde conservan su

actividad durante mucho tiempo, gracias a la secreción de la glándula de la espermateca.

1.2.3. Ciclo biológico

El desarrollo de las tres castas de abejas representa una transición a través de cuatro grandes estadios: Huevo, larva, pupa y adulto. La reina pone los huevos en celdas de obrera o zánganos, pudiendo desarrollarse los huevos fertilizados tanto en abejas obreras como en reinas, mientras que los que no están fertilizados dan lugar a zánganos.

El estadio larvario es el de alimentación, cuando las abejas ganan peso y aumentan en tamaño. Estos dos cambios ocurren mientras que las celdas están desoperculadas; las larvas hilan sus capullos y mudan a pupa después de que las obreras adultas hayan operculado sus celdas, emergiendo posteriormente como adultos. Este proceso tiene una duración variable según la casta a la que pertenezcan las abejas, siendo de 16 días para la reina, 24 días para el zángano y 21 para la obrera.

Las larvas de abeja se denominan ápodas (también vermiformes) y se caracterizan por carecer de cualquier tipo de patas.

Las pupas se denominan obtectas y presentan esbozos de los apéndices de los adultos, pero soldados al cuerpo que está revestido por una cutícula única.

REVISION BIBLIOGRAFICA

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1. EMBRIOGENESIS.

La embriogénesis de las abejas ha despertado el interés de los investigadores ya desde hace muchos años, y hoy sigue atrayendo la atención de numerosos estudiosos del tema, los cuales continúan profundizando en este proceso, aunque a unos niveles en los que nosotros no debemos entrar puesto que este trabajo no trata directamente del estudio embriológico de la abeja. Sin embargo hemos creído necesario hacer referencia a ella como paso previo del desarrollo post-embrionario, tema de nuestro estudio, incidiendo más en los trabajos que tratan sobre el tiempo de desarrollo, desde la puesta de los huevos hasta la eclosión de las larvas, y de la influencia que sobre éstos tienen las condiciones ambientales, que lógicamente también influirán en el crecimiento posterior.

Existen trabajos sobre embriogénesis ya desde el año 1866, siendo NELSON (1915), con su trabajo sobre la embriología y el desarrollo completo de la abeja desde el estadio de división de los huevos, el que estableció las bases para las sucesivas investigaciones. Nelson fue el que estudió inicialmente la embriogénesis de abejas obreras, mediante extensiones de cortes de embriones, fijados y teñidos. En su trabajo se muestran las características celulares de la embriogénesis de este insecto, describiendo la totalidad de su desarrollo. Los trabajos de Nelson fueron continuados por DU PRAW (1967), quien publicó una descripción de diez estadios embrionarios mediante la observación del desarrollo de embriones vivos bajo aceite. Du Praw resumió las características citológicas

visibles del desarrollo y posteriormente rodó una película en 16 mm de la embriogénesis de la abeja. En 1960 OCHIAI efectuó un amplio estudio comparativo de la embriogénesis de los géneros *Apis*, *Polistes*, *Vespula* y *Vespa*, prestando una especial atención al desarrollo de la glándula de la seda. BEIG (1971) estudió la embriogénesis de las abejas sin aguijón, *Trigona postica*, realizando microfotografías de huevos en desarrollo y secciones de embriones fijados y teñidos.

FLEIG (1985), FLEIG y SANDER (1985, 1986), usando microscopio electrónico de barrido, siguieron el desarrollo del blastodermo de la abeja obrera. Sus observaciones contemplaban desde la gastrulación hasta 55 horas tras la puesta del huevo, y describían los cambios en la superficie de éste, así como, el de las células blastodérmicas, sistema de yema central, serosa y amnios.

2.1.1. Duración del desarrollo embrionario.

En 1981 HARBO y BOLTEN estudiaron el tiempo de desarrollo de los huevos de machos y hembras de abejas, mantenidos en una incubadora sin la influencia de abejas adultas, encontrando que los huevos de abejas africanizadas tenían un tiempo de desarrollo de aproximadamente 37 horas menos que los de las europeas. Previamente REINHARD (1960) había establecido que los huevos de obreras se desarrollan más rápidamente que los de zánganos. El trabajo de HARBO y BOLTEN tenía como objetivo fundamental medir los efectos de la temperatura y sexo sobre el desarrollo del huevo, comparando huevos de zánganos diploides y hembras, machos haploides y hembras, y también los

efectos de la temperatura sobre el tiempo de desarrollo de los huevos y el tiempo de desarrollo en huevos de 20 reinas no emparentadas.

Sus resultados fueron los siguientes: Los machos diploides eclosionan aproximadamente 2,9 horas más tarde que las hembras, mantenidos en ambos casos a 34,8°C, siendo el tiempo de los primeros de 73,9±0,8 h y el de las segundas 71,0±0,6 h. Los machos haploides tienen un tiempo de desarrollo de 3,6±1,0 h mayor que las hembras.

Respecto al efecto de la temperatura, sus resultados fueron los siguientes: Tiempo desde la oviposición hasta la eclosión a 34,8°C, 71,0±0,7 h; a 34,3°C, 72,4±0,7 h y a 31,3°C, aproximadamente 99 horas. Así se establece una diferencia de 1,4 horas por cada 0,5°C en el intervalo de temperatura que va de 34,3°C a 34,8°C, con diferencias mayores cuanto menores son las temperaturas (una media de 4,4 horas por cada 0,5°C entre 31,3°C y 34,3°C).

También observaron que las temperaturas bajas limitan por completo el desarrollo, y así a 29,8°C eclosionan sólo el 1% de los huevos, entre 29,8°C-31,3°C eclosionan el 50% y a 31,3°C el 67%. Respecto a los tiempos de desarrollo para los huevos de las 20 reinas no emparentadas, obtuvieron un rango desde 68,8 horas hasta 74,2 horas, con una media de 71,44 horas, demostrando así la gran variabilidad que existe en un grupo de solo 20 reinas.

En 1988, MILNE et al. establecieron una técnica microfotográfica para monitorizar el desarrollo de la abeja obrera desde la puesta del huevo hasta la eclosión y así realizar una guía fotográfica para una rápida y fiable identificación

de los 10 estadios embrionarios publicados por DU PRAW (1967), cada uno de ellos dividido a su vez en 3 subestadios (temprano, medio y tardío) en los que ellos estructuran la embriogénesis. Establecieron los acontecimientos y el momento en que sucede cada uno de ellos refelejándose sus resultados en el cuadro 1.

Para la realización de este trabajo usaron huevos puestos en un periodo de tiempo de 2 a 4 horas, trasladados después a un portaobjetos excavado y cubiertos por una fina capa de aceite de parafina, introduciéndolos en una incubadora a 35°C. Los huevos se fotografiaron cada dos horas, unos desde una perspectiva lateral y otros desde una vista ventral.

ESTADIO	TEMPRANO (HORAS)	MEDIO (HORAS)	TARDIO (HORAS)
1	0	2	4
2	5	7	8
3	9	10	12
4	14	17	21
5	24	27	33
6	35	39	41
7	43	45	47
8	49	51	53
9	57	61	67
10	69	73	76

DURACION EN HORAS DE LOS ESTADIOS EMBRIONARIOS DE APIS MELLIFICA
CUADRO 1
DU PRAW (1967).

Respecto al tiempo de desarrollo total desde la puesta del huevo hasta la eclosión, DU PRAW (1967) determinó un rango de 70-76 horas y HARBO y BOLTEN (1981) de $73,3 \pm 1,14$ h. NELSON (1915) había apuntado unas variaciones de 74 a 76 horas, mientras que MILNE et al. (1988) establecieron un tiempo de 77 horas, que es un poco más largo que las estimaciones anteriores, pero razonable, bajo condiciones diferentes, especialmente de temperatura, considerando como HARBO y BOLTEN. (1981), que descensos pequeños de temperatura pueden aumentar el tiempo necesario para el desarrollo.

2.2. EXTRACCION DE LARVAS.

Como paso previo a cualquier estudio de larvas, es necesario poner a punto una técnica adecuada para la obtención de larvas vivas sin producirlas ningún daño.

Existen distintos métodos descritos para la extracción de larvas de abeja sin producir daños a las mismas. BREY et al. (1980) pusieron a punto una sistema para la extracción de larvas sin opercular mediante una corriente rápida de aire de 36.000 a 40.000 ml/min. El aire se aplicaba sobre la larva mediante una boquilla alargada con un orificio de 2 mm situado a 6-8 cm de la superficie del panal. Para facilitar la operación fijaban el cuadro de cría con la cara del panal ligeramente hacia abajo, recogiendo las larvas sobre una toalla de papel.

GARY et al. (1961), usaban agua para la extracción de las larvas, gracias al estímulo que ésta producía sobre las mismas provocando un aumento de sus

movimientos. GILLIAM et al. (1978) combinaron el método de Gray con la utilización de pinzas. Este último sistema puede provocar lesiones en las larvas cuando no se aplica correctamente.

2.3. DESARROLLO LARVARIO.

2.3.1. Introducción.

Las abejas, como insectos holometábolos que son, presentan diferentes etapas en su desarrollo: Huevo, larva (de varias edades), pupa e imago.

Pasados aproximadamente tres días desde la puesta del huevo tiene lugar la eclosión. DIXON y SHUEL (1958) observaron que la eclosión en un ambiente a 35°C y 100% de humedad relativa (HR) se producía a las 75 horas de la puesta. La pequeña larva recién nacida está enroscada como un arco que, al crecer, aumenta cada vez más su curvatura. Durante los días siguientes al nacimiento las larvas sufren mudas consecutivas que contribuyen a su crecimiento. De acuerdo con BERTHOLF (1925) y con SHUEL y DIXON (1960), la primera de las cuatro mudas sucede al mismo tiempo en reina y obrera, aproximadamente entre el cuarto y quinto día tras la oviposición. La segunda, tercera y cuarta muda se producen a los cinco, seis y siete días respectivamente.

La larva de reina se opercula el séptimo día y la de obrera al final del octavo. La quinta muda de la reina tiene lugar el décimo día y la de la obrera el undécimo. La sexta muda (eclosión) sucede al final del decimoquinto día en la reina y en la obrera al final del vigésimo primero. (BERTHOLF,1925). Estos

tiempos están sujetos a la influencia que tiene la modificación de la temperatura (MILUM, 1930).

La duración de la evolución larvaria es distinta en las diferentes castas de *Apis mellifica L.*, como se esquematiza en el cuadro 2.

ESTADIO	REINA	OBRERA	ZANGANO
Huevo	3 días	3 días	3 días
Larva	8 días	10 días	13 días
Pupa	4 días	8 días	8 días
Total	15 días	21 días	24 días

DURACION DE LA EVOLUCION LARVARIA EN LAS
DIFERENTES CASTAS DE APIS MELLIFICA L..
CUADRO 2

Estos tiempos se establecen para una temperatura en el interior de la colmena de 30-35°C. Si la temperatura es inferior, los días empleados pueden aumentar.

El crecimiento larvario según NELSON y STURTEVANT (1924) y STABE (1930), sigue el modelo de una curva sigmoidea. Las determinaciones de STABE (1930) hechas con intervalos de 6 horas muestran un crecimiento idéntico en larvas de reinas y obreras durante las primeras 48 horas, seguido por un incremento más rápido en el peso de las obreras que dura alrededor de un día. A las 96 horas las larvas de reina sobrepasan en peso a las de las obreras y continúan creciendo rápidamente, logrando una media de peso máxima de 322 mg

a las 132 horas mientras que las obreras a las 120 horas tienen una media de peso máximo de 152 mg.

Según JAY (1965) los pesos medios de las larvas de obrera, zángano y reina con las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa son:

	Celda recién operculada	Capullo completo
Obrera	153,9± 7,7 mg	136,6± 8,4 mg
Zángano	400,2±20,4 mg	350,7±18,1 mg
Reina	204,3±11,4 mg	279,9±13,9 mg

BOUNIAS (1978) a partir de los datos de STRAUSS (1911) y MELAMPY et al. (1940) establece para las obreras la distribución de estadios larvarios, duración de los mismos y pesos de las larvas (Cuadro 3).

ESTADIO	DURACION APROX. (DIAS)	PESOS MEDIOS (mg/insecto)	Nº INSECTOS	D.S.
L ₃	1-1,5	60,75	22	11,24
L ₄	1-1,5	11,82	17	6,38
L ₅	1-1,5	137,10	23	13,85
OPERCULACION				
L ₅	1-1,4	151,15	11	11,10
PREPUPA				
P ₀	1	139,05	10	2,76
P ₁	1	139,56	106	3,94
P ₂	1	134,67	28	4,04
P ₃	1,5	137,17	28	4,32
P ₄	1,5	130,50	16	2,12
P ₅	1,5	121,00	11	4,24
P ₆	1,5	127,70	40	1,50
P ₆	1	123,38	75	3,02
A ₀	1/2-1	118,25	30	6,88
F-Ab	(15-90)	102,10	18	15,93

DISTRIBUCION Y DURACION DE LOS ESTADIOS LARVARIOS Y PESOS DE LAS LARVAS DE OBRERAS APIS MELLIFICA. BOUNIAS (1978)

CUADRO 3

2.3.2. Formación del capullo.

Las larvas de obrera al igual que las de zánganos, construyen los capullos completamente cerrados, directamente sobre el final de las paredes de las celdas (JAY, 1965).

Los capullos consisten en finas láminas e hilos secretados por las glándulas de la seda. Se trata de un material incoloro, al cual se añade un material amarillo y otro marrón más sólido, ambos productos fecales de las larvas (KOEHLER, 1923, PRELL 1924 a,b; VELICH, 1930; WEIPPL, 1931; JAY, 1965).

Las tres castas de abejas se desarrollan en celdas distintas lo que determina la forma de sus capullos.

Las celdas de obrera y de zángano están inclinadas de abajo a arriba y son hexagonales en sección con base piramidal; los ángulos de las celdas se redondean tras sucesivas generaciones de larvas, debido al acúmulo de restos de capullos y excrementos (JAY, 1965).

Las celdas operculadas de obrera son ligeramente convexas al principio, achatándose posteriormente, mientras que las celdas operculadas de zánganos y reinas son muy convexas (JAY, 1965).

Según describe JAY (1965) en su trabajo sobre la formación del capullo de la abeja *Apis mellifica* L., la larva de obrera tras la operculación realiza una serie de movimientos estereotipados encaminados a la formación del capullo. La

construcción del capullo se inicia después de la operculación de la celda de cría y la desespiralización de la larva, con su extremo anal hacia la cápsula de la celda, invirtiendo la dirección mediante gateo hacia delante y girando hacia la base de la celda. La descripción de la construcción del capullo de obrera de *Apis mellifica* L. según JAY, se representa en la figura 4.

Durante la construcción del capullo la larva se mueve hacia delante con su cara dorsal próxima a las paredes de la celda, usando los pliegues del cuerpo como apéndices locomotores, extendiendo la región anterior, retrayendo la posterior y empujando hacia fuera desde el final de las paredes de la celda. Este movimiento desplaza a la larva alrededor de la celda, ejecutando una serie de giros (Fig 4). Durante estos movimientos la larva inclina su región cefálica o caudal hacia atrás depositando secreciones o excreciones en la pared de la celda. La larva invierte su dirección haciendo un movimiento en espiral parecido a la figura de un ocho o bien mediante giros sucesivos.

Cuando el órgano hilador, situado medialmente, toca la pared de la celda, se forma una fina lámina transparente de seda, mientras la cabeza realiza movimientos al azar en todas las direcciones, apareciendo la cabeza cubierta con una espesa malla de hilos. Gradualmente las paredes de las celdas y las bases se cubren con una fina capa de láminas de seda.

Transcurridas entre 12 y 18 horas del inicio de la construcción del capullo, se produce la descarga de material polínico a través del ano, depositándose en distintas partes de la pared de la celda. Las excreciones aumentan progresivamente entre las 16-24 horas pasando a ser de un material fecal marrón

oscuro, más sólido, que contienen granos de polen. Esta defecación indica que el septo que separaba el intestino medio y el posterior se ha roto, permitiendo que los materiales de desecho acumulados sean expulsados (SNODGRASS, 1956).

El número de giros y el tiempo que tarda una larva en relizarlo varía considerablemente según el autor consultado; según LINEBURG (1924), una larva de obrera realiza un giro en 22 minutos, en 32-60 minutos según VELICH (1930) y en 40 minutos según LATHAM (1954). Esto nos da una variabilidad de 22-60 minutos con una media de 52 minutos. En cuanto al número de giros la variabilidad es mayor ya que, según LINEBURG (1924) es de 75 giros, mientras que LATHAM (1954) opina que es solamente de 6.

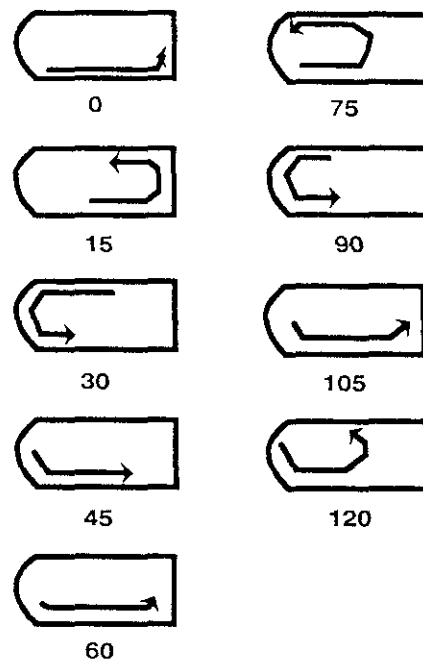
JAY (1965) afirma que el tiempo medio en horas para la construcción de los capullos de obreras, zánganos y reinas a 35°C y 80% de HR es el siguiente:

Tiempo en horas entre la operculación e inicio de la hiladura:

Obrera	3,5±0,7
Zángano	4,2±1,6
Reina	29,7±1,1

Tiempo en horas entre inicio de hiladura y término del capullo:

Obrera	37,0±3,7
Zángano	54,0±2,6
Reina	29,8±1,1



GIROS DE LA LARVA DE OBRERA PARA HACER EL CAPULLO
JAY (1965)
FIGURA 4

2.3.3. Mudanzas durante el periodo post-embrionario.

Justamente antes de cada muda, la larva pierde su apariencia brillante y llega a ser más bien mate, viéndose como la cutícula vieja se separa del cuerpo, empezando por el polo anterior y se abre sobre la cabeza gracias a los movimientos de la larva que vibra ligeramente empezando a desplazarse hacia el polo posterior. A medida que esto sucede el recubrimiento del digestivo anterior, posterior y de todas las tráqueas empieza a retirarse y a salir con la cutícula

mudada, que flota sobre el alimento de la celda y queda cubierta posteriormente con adiciones subsiguientes de alimento. La duración de las mudas suele ser inferior a 30 minutos (BERTHOLF, 1925).

Al final del cuarto día de vida larvaria, la larva ha mudado cuatro veces. Estas mudas se producen de la forma siguiente: la primera entre las 12-18 horas después de la incubación, la segunda alrededor de día y medio después de la incubación, la tercera alrededor de dos días y medio después y la cuarta de tres días y cuarto a tres días y medio a partir del momento del nacimiento.

Después de la operculación de la celda (al final del octavo día) y de la formación del capullo al final del noveno, la larva pasa gradualmente y sin mudas a un estadio diferente denominado prepupa. Mientras que hasta el noveno día la larva ha estado activa y apoyada generalmente sobre un lado, curvándose para adaptarse a la forma de la celda, en el décimo día se estira sobre su dorso con la cabeza hacia la apertura de la celda permaneciendo inmóvil dentro del capullo. La cutícula pierde gradualmente su apariencia brillante observándose el undécimo día zonas claras llenas de líquido alrededor de la cabeza, pudiendo distinguirse las patas y partes de la cabeza de la pupa por debajo de la cutícula vieja.

Once días después de la puesta, la larva está ligeramente activa durante unas horas, momento en el cual se produce la 5ª muda, emergiendo la pupa joven, inmóvil, y de un color blanco uniforme. La cutícula vieja es desplazada hacia la base de la celda donde se mezcla con heces amarillas depositadas por la larva durante la elaboración del capullo (BERTHOLF, 1925; ARNHART, 1931;

KOEHLER, 1923; PRELL 1924a,b; VELICH, 1930; WEIPPL, 1931; JAY, 1965) (Cuadro 4).

En la ecdisis prepupal la última cutícula larvaria se desprende dando lugar a la pupa, la cual sufre una nueva ecdisis revelando al imago. PRELL (1923), BERTHOLF, (1925) y GONTARSKI (1957) observaron estas dos ecdisis pero no hicieron una descripción detallada.

JAY (1962a) realizó un estudio en detalle de estas dos últimas ecdisis obteniendo los siguientes resultados: En las celdas naturales de la obrera, la prepupa se encuentra sobre el dorso con su extremo anal tocando la base de la celda y elimina la cutícula en esta posición.

En algunas larvas antes de la ecdisis, la prepupa aparece flácida y blanca, excepto los bordes de los ojos compuestos cuyo color es rosa pálido. Una ligera ondulación aparece dorsalmente en la cutícula, entre el escutelo mesonotal de la pupa y la región torácica prepupal, aparece más estrecha que el abdomen. Las piezas bucales rudimentarias y antenas, ojos compuestos, patas, alas y parte del sistema traqueal son fácilmente observables debajo de la cutícula mudada. Periódicamente el cuerpo se expande lateralmente y subsecuentemente se contrae lentamente de nuevo.

Cuando se aproxima la ecdisis, las piezas bucales y las antenas resaltan más hacia delante, la cabeza y torax pupal, con sus apéndices se hacen más obvios y el escuto mesonotal y el escutelo forman prominencias distintas.

Periódicamente éstos y el abdomen se expanden y contraen lenta y repetidamente.

Inmediatamente antes de la ecdisis, las partes dorsales del torax y abdomen se expanden y contraen vigorosamente. Finalmente la íntima de las tráqueas abdominales aparecen como hilos blanquecinos moviéndose hacia atrás por debajo de la piel. Simultáneamente, cuando la región anterior está doblándose y desdoblándose ventralmente, la cutícula se fragmenta a lo largo de la línea media del escuto mesonotal y escutelo.

Existen cuatro procesos, que incrementándose en intensidad, separan la cutícula:

- Retracción y extensión del abdomen.
- Giro de la cabeza y torax.
- Doblamiento y desdoblamiento ventral y movimientos de lado a lado de cabeza y torax.
- Expansión y contracción de la estructura en forma de ampolla o bulbo del extremo dorsal del abdomen al ano.

La cutícula no se rompe detrás del escutelo mesonotal de la pupa sino que lo hace hacia delante revelando a su vez el vértice de la cabeza, los ojos compuestos y las bases de las antenas. El frontal, cípeo y escuto mesonotal se mueven rítmicamente y la cabeza y tórax de la pupa aparecen comprimidos, finamente arrugados y acanalados. Tres canales longitudinales sobre el escuto mesonotal y otro extendido desde el ocelo medio a las bases de las antenas son claramente visibles.

La íntima de las primeras tráqueas empieza desde sus espiráculos en depresiones de la mesopleura a través de los lóbulos pronotales del protorax de la pupa. La íntima de la segunda traquea (cuyos espiráculos están localizados en pliegues membranosos entre los extremos superiores de la mesopímera y de la metapleura) y la tercera traquea (cuyos espiráculos están sobre los lados del propodio), no son visibles hasta que el clipeo se hace evidente. La íntima traqueal, desde los espiráculos sobre los lados de los terguitos abdominales, se desplaza hacia delante debajo de la piel. Gradualmente el labro y mandíbulas se hacen visibles, pero la cutícula inmóvil cubre la probóscide y las partes distales de las antenas. Aproximadamente en este momento la piel empieza a desplazarse hacia delante sobre el abdomen evidenciándose las partes superiores de las patas y almohadillas de las alas.

Durante el movimiento de la cutícula, la íntima de la primera traquea se desplaza sobre las patas meso y metatorácicas así como sobre las almohadillas de las alas. La íntima de la segunda traquea pasa por debajo de la primera y segunda almohadillas de las alas y la unión femoro-tibial de las patas meso y metatorácicas. La íntima de la tercera traquea (propodeal) no encuentra muchos obstáculos y se separa con la cutícula. La fase crítica de la ecdisis es el no doblamiento y extensión hacia delante de la probóscide y antenas. Las partes proximales de éstas y las patas protorácicas están normalmente expuestas cuando la capa dorsal de la cutícula alcanza el segundo o tercer terguito abdominal. La cabeza y torax y sus apéndices se expanden ahora gradualmente.

Cuando la capa dorsal de la cutícula alcanza el tercer o cuarto terguito abdominal las patas meso y metatorácicas completamente extendidas y las almohadillas de las alas, se hacen evidentes y la íntima de la traquea propodeal sale totalmente. La íntima de la segunda traquea sale completamente cuando la cutícula alcanza el cuarto o quinto terguito del abdomen mientras que la íntima más corta de la traquea abdominal, se desplaza como consecuencia de los movimientos hacia delante de la cutícula. Cuando la cutícula se aproxima al ano, la íntima de la primera traquea sale completamente, la probóscide se libera de la cutícula externamente y un doble filamento de la cutícula, presumiblemente parte de la íntima estomodeal, sale desde el interior de la proboscis. Este estadio se alcanza 20-30 minutos después de que la cutícula empiece a separarse sobre el mesonoto.

Aproximadamente 30 minutos después de que la cutícula alcance el ano, los palpos labiales, galea y glosa se extienden a las posiciones pupales normales con la glosa alcanzando el segundo artejo del tarso de las patas mesotorácicas. La expansión de la cabeza al tamaño pupal normal ocurre 10-15 minutos después de que la cutícula alcance el ano.

La pupa continua girando y extiende y retrae el abdomen (y el clípeo) y la estructura en forma de ampolla del extremo anal. Esta actividad roza la cutícula húmeda sobre el interior de las bases de la celda.

Un material verdoso o amarillento se observa en la cutícula mudada. Aproximadamente 60 minutos después de que la cutícula alcance el ano, la pupa se sitúa inmóvil sobre su zona dorsal.

JAY (1962a) también expuso sus observaciones sobre la ecdisis pupal. Este autor observó que una pupa en su celda natural se encuentra situada horizontalmente sobre su dorso con el ano contra la base de la celda. Las antenas, proboscis, apéndices locomotores y almohadillas de las alas están adheridas al cuerpo. Algunas horas antes de la ecdisis, la cutícula que rodea a la pupa aparece despegada y su color ha cambiado (JAY, 1962b), mientras que la cabeza y torax presentan un color gris negruzco, las almohadillas de las alas son grises, los ojos compuestos y segmentos flagelares negros, las mandíbulas, uñas, espinas, espolones y pelo medio presentan un color marrón oscuro y el abdomen, patas, escapo y pedicelo de cada antena son de un color que varía entre amarillo oscuro y marrón claro.

Cuando la ecdisis se aproxima, las mandíbulas se abren y se cierran, las antenas y patas vibran ligeramente, la cabeza se mueve de lado a lado y periódicamente las patas meso y metatorácicas se extienden lentamente fuera del cuerpo y se mueven hacia atrás de nuevo. Estos movimientos se hacen más frecuentes y vigorosos según pasa el tiempo. Inmediatamente antes de la ecdisis las patas metatorácicas se extienden hacia la base de la celda y la íntima de las tráqueas abdominales parecen como hilos blanquecinos bajo la cutícula.

Seguidamente las patas metatorácicas se extienden y durante la ecdisis, el abdomen se retrae y extiende y la cabeza y torax giran y se curvan ventralmente. Estos movimientos parecen mover la cutícula hacia delante, llevando con ella la íntima de varias tráqueas. Las patas, antenas y mandíbulas también vibran constantemente durante la ecdisis.

Aproximadamente en este momento la cutícula se fragmenta a lo largo de las mándíbulas y se desplaza hacia el labro. Las patas y áreas proximales de las almohadillas de las alas se mueven vigorosamente y la cutícula se rompe alrededor de sus bases. Los movimientos de las patas también hacen que se rompa la cutícula en las uniones y a lo largo de los segmentos con espinas o espolones, particularmente en las superficies internas. La cutícula sobre el lado dorsal de la proboscis cerca de la mandíbula y sobre los segmentos flagelares de las antenas parece estar fragmentada por un suave movimiento de las patas protorácicas. Los movimientos de las antenas también rompen la cutícula entre los segmentos flagelares y alrededor de las bases de las antenas. Aproximadamente en este momento la cutícula se fragmenta a lo largo de los otros bordes de los ojos compuestos y su lenta separación interna coincide con la erección de los pelos largos sobre las superficies de los ojos compuestos.

Los movimientos de las patas prototorácicas y mesotorácicas así como del abdomen ahora se hacen más intensos, iniciándose un estiramiento y contracción rítmico del cuello. La cutícula que cubre el abdomen se mueve ahora hacia atrás estirándose desde el lado dorsal del petiolo, mientras que un estrecho puente de cutícula se forma entre el tórax y el abdomen. Por debajo, la íntima de las dos tráqueas propodales se mueven hacia delante a lo largo de los lados del torax entre las bases de las patas y alas mientras que la cutícula situada sobre la superficie dorsal del tórax permanece estática. Por ahora las patas están cubiertas parcialmente con fragmentos de cutícula y los pelos largos entre sus coxas están erectos y libres de cutícula.

Cuando la cutícula se mueve sobre los primeros y segundos espiráculos, la íntima de sus tráqueas empieza a salir y moverse hacia delante con ella. Estas íntimas están tensas y las uniones femorotibiales de las patas meso y metatorácicas parecen ayudar a su movimiento pegándose bajo éstas y estirándose. Cuando el borde de la cutícula alcanza las bases de las alas empieza a separarse de éstas cubriendo de un relleno fluido las almohadillas de las alas. Ahora se forma un cordón de cutícula entre las patas uniendo el lado ventral de la proboscis con el borde de la cutícula. Este cordón (presumiblemente la íntima estomodeal) aparece aparentemente liberado de la proboscis.

La cutícula pronto se fragmenta a lo largo de la fisura escutal del mesonoto y resbala sobre el abdomen, saliendo el resto de la superficie dorsal de la cubierta del tórax. La corta íntima de las tráqueas abdominales están ahora despojadas completamente de sus aperturas espiraculares. La retirada de la cutícula a partir de las alas y de la íntima traqueal desde el primer y segundo espiráculo coincide con el movimiento hacia delante de la cutícula. Las alas estiradas aparecen con un relleno al principio fluido.

Las cortas alas metatorácicas se liberan cuando el borde dorsal de la cutícula alcanza el tercer y cuarto terguito abdominal, pero las mesotorácicas más largas (y la íntima traqueal desde el segundo espiráculo torácico) no se liberan hasta que el borde dorsal de la cutícula se acerca al cuarto o quinto terguito abdominal. Cuando la cutícula se acerca al extremo del abdomen, el cordón de cutícula se ajusta al lado ventral de la proboscis y la íntima traqueal de los primeros espiráculos torácicos se retira completamente. Ahora los segmentos flagelares de las antenas, el labrum y una gran parte de los ojos compuestos

quedan expuestos. Las patas están sin embargo aún parcialmente recubiertas con pequeños restos de cutícula. Las alas ahora se pliegan planas sobre la superficie del abdomen donde su desarrollo ha finalizado.

La cutícula ahora húmeda roza sobre el interior de la base de la celda por giros lentos del abdomen y durante este proceso la íntima proctodeal se despega completamente. Se puede observar en la cutícula que ha sufrido la muda una sustancia verdosa o amarillenta. Las patas metatorácicas están por ahora retraídas y el imago lentamente se sitúa sobre su dorso. Todo el proceso, desde la primera aparición de la íntima de la traquea abdominal hasta que la cutícula alcanza el ano, tarda 20-30 minutos.

Algunas piezas de la cutícula se desprenden entre la ecdisis y la emergencia del imago de su celda. Algunos restos secos de la cutícula quedan sobre las paredes de la celda y otros situados sobre la cara dorsal del tórax, escapo y pedicelo de cada antena y sobre la parte dorsal de la cabeza, también normalmente cae en capas en este movimiento. Sin embargo, a veces pequeños fragmentos de cutícula cubren estas partes tras la emergencia, retirándose piezas secas de cutícula del cípeo, genas, frontal y vertex por la erección del pelo subyacente. Algunas veces, el pelo situado sobre el lado dorsal del torax aparece normalmente erecto tras la emergencia. Las abejas recién nacidas tienen las cabezas y tórax blanco-plateados cuando la cutícula seca aún no se ha retirado.

Las pupas jóvenes están totalmente encajadas en una cutícula externa fina que muda finalmente (6ª muda) al acabar el estadio pupal, permitiendo la

expansión de las alas y revelando la presencia del pelo que cubre su cuerpo (BERTHOLF, 1925; SHUEL y DIXON, 1960).

DIA	OBRERA		REINA		ZANGANO	
	ESTADIO	MUDA	ESTADIO	MUDA	ESTADIO	MUDA
3		Eclosión		Eclosión		Eclosión
4	L1	1ª Muda	L1	1ª Muda	L1	1ª Muda
5	L2	2ª Muda	L2	2ª Muda	L2	2ª Muda
6	L3	3ª Muda	L3	3ª Muda	L3	3ª Muda
7	L4	4ª Muda	L4	4ª Muda	L4	4ª Muda
8	Allment.		Allment.		Allment.	
9						
10	Prepupa		Prepupa	5ª Muda		
11		5ª Muda				
12			Pupa		Prepupa	
13						
14						5ª Muda
15						
16			Imago	6ª Muda		
17						
18					Pupa	
19						
20						
21	Imago	6ª Muda				
22						
23					Imago	6ª Muda
24						Emerg.

EVOLUCION DE LAS MUDAS EN EL DESARROLLO DE APIS MELLIFICA
(BERTHOLF, 1925)

CUADRO 4

2.3.4. Caracterización de los estadios de desarrollo post-embrionario de las abejas obreras.

La caracterización de los distintos estadios durante el desarrollo post-embrionario se ha llevado a cabo mediante diferentes controles que nos indican con bastante precisión en que momento o estadio de su desarrollo se encuentran las larvas de obreras. Estos controles están referidos al peso de las larvas, al color de los ojos compuestos y del tórax de las pupas, al diámetro de la cabeza de las pupas y los cambios de la estructura externa.

Con estos criterios una larva o una pupa pueden ser asignados a una edad definida bajo unas condiciones de temperatura y humedad relativa determinadas.

2.3.4.1. Caracterización de las larvas por el diámetro de la cabeza y por el color de la cabeza y del abdomen.

En 1890 DYAR afirmaba que la anchura de la cabeza de las larvas de Lepidópteros es aproximadamente constante durante un estadio larvario definido, y aumentaba de acuerdo con una progresión geométrica regular con las sucesivas mudas de la larva.

Estas observaciones fueron confirmadas para la abeja por BERTHOLF (1925) y sus datos sobre el desarrollo han sido usados por gran número de investigadores. Según BERTHOLF la cabeza de la larva recién incubada mide 0,33 mm de altura, tomada en paralelo con el primer segmento según la larva yace

sobre un lado. Este autor examinó larvas más viejas y encontró que cada una tiene medidas de cabeza dentro de los siguientes valores: 0,5 mm; 0,72 mm; 1,1 mm; 1,6 mm. Cada uno de estos valores supone aproximadamente 1,5 veces la cifra anterior y parece claro de acuerdo con DYAR (1890) que estas cifras se corresponden con varios estadios en el desarrollo de la larva y que se relacionan con las mudas en cada cambio de tamaño.

REMBOLD y KREMER. (1980) compararon los diámetros de la cabeza y pesos de 500 larvas de obrera de *Apis mellifica carnica* L. y 464 larvas de reina.

Las correlaciones resultantes demuestran la existencia de cinco grupos de pares de datos para larvas de obrera y reina. Una comparación del incremento del diámetro de la cabeza revela una muy alta diferencia significativa entre los correspondientes grupos, lo que demuestra claramente que el diámetro de la cabeza se puede usar para caracterizar cada uno de los cinco estadios larvarios (Cuadro 5).

El 5º estadio larvario es más largo que los precedentes y se puede subdividir en una fase de celda abierta y una fase de hiladura tras la operculación de la celda. Según REMBOLD y KREMER. (1980) una celda de obrera de *Apis mellifica carnica* L. se opercula con un peso de la larva de 150-165 mg.

	EST. LARVARIO	N ° INDIVIDUOS	φ CABEZA (mm±SD) ^b	PESO LARVARIO (mg)	
				Min.	Max.
OBRERA	L ₁	33	0,33±0,018	0,10	0,45
	L ₂	75	0,47±0,030	0,35	1,50
	L ₃	101	0,70±0,051	1,3	6,0
	L ₄	147	1,05±0,058	4,2	32
	L ₅ +LS	145	1,58±0,078	27,0	280
REINA	L ₁	10	0,33±0,020	0,10	0,45
	L ₂	20	0,48±0,026	0,35	1,50
	L ₃	113	0,72±0,044	1,3	7,0
	L ₄	165	1,11±0,072	3,8	44
	L ₅ +LS	156	1,69±0,097	31	360

SD = Desviación estandar; L₅ = 5º estadio larvario antes de la operculación
 LS = 5º estadio larvario tras la operculación

DIAMETRO DE LA CABEZA Y PESO CORPORAL DE LOS ESTADIOS LARVARIOS DE OBRERA Y REINA (REMBOLD y KREMER, 1980).

Cuadro 5

REMBOLD y KREMER. (1980) siguieron también el desarrollo pupal por la pigmentación de los ojos compuestos y del tórax, coordinando los estadios de color de los ojos con valores cromáticos del mapa de color RAL (RAL, 1976) dividiéndolos para facilitar la aplicación en grandes grupos (rosa, marrón-rojo, marrón oscuro) (Cuadro 6).

ESTADIO	OBRERA		REINA	
	DURACION (H)	N	DURACION (H)	N
L ₁	14-20	20	14-20	9
L ₂	16-22	16	16-22	14
L ₃	18-24	34	18-24	27
L ₄	24-32	25	24-32	23
L ₅	24-36	48	24-36	30
L _s	36-54	37	30-42	41
Pp	48-60	15	30-36	4
Pw	30-42	34	30-36	2
Pp	18-30	40	18-30	11
Pr	6-18	54	6-12	11
Pd	36-48	53	18-30	11
Pdl	12-24	53	6-18	11
Pdm	30-42	53	12-24	11
Pdd	6-18	45	6-12	8

Pw = rosa-blanco

Pp = rosa-rosa

Pr = rosa-rojo

Pd = rosa-oscuro

Pdl = rosa-oscuro abdomen claro

Pdm = rosa-oscuro abdomen medio

Pdd = rosa-oscuro abdomen oscuro

DURACION DE ESTADOS DE LARVA Y PUPA EN OBRERA Y
REINA (REMBOLD y KREMER, 1980)

Cuadro 6

BELZUNCES et al. (1992) utilizando el método de Rembold y Kremer establecieron una correspondencia entre el color de los ojos y la edad de las larvas en días:

Pw=10 días

Pp=11,2 días

Pr=12 días

Pd=13 días

Pdl=14,3 días

Pdm=15,5 días

Pdd=16,5 días

2.3.4.2. Caracterización de las larvas por el peso

STABE (1930) estableció el rango de crecimiento de las larvas de obreras mediante el pesado de larvas de forma individual o en grupo, con intervalos de edad definidos desde la eclosión hasta que las larvas alcanzaban su tamaño máximo (Cuadro 7). Según STABE el incremento de peso de las larvas es relativamente lento durante los primeros días y más tarde se hace más rápido dando su representación gráfica una clásica curva sigmoidea. La media máxima de peso obtenida por este autor fue de 159,07 mg para larvas de obrera de 144 horas de edad.

Edad en Horas	Nº de larvas	Peso total	Peso medio
0	70	7,7	0,11
6	50	8,7	0,17
12	50	14,3	0,29
18	60	21,6	0,36
24	50	26,0	0,52
30	45	45,5	0,01
36	50	64,4	1,29
42	55	89,9	1,63
48	16	48,5	3,03±0,09
54	20	117,5	5,87±0,19
60	23	255,8	11,12±0,48
66	20	366,0	18,30±0,33
72	22	452,3	20,56±0,40
78	34	881,3	25,92±0,55
84	27	1344,3	47,74±1,88
90	20	1335,1	66,76±1,25
96	17	1363,2	80,19±1,98
102	15	1734,2	115,62±1,79
108	8	1111,2	138,90±0,79
114	31	4930,7	159,07±0,36
120	33	5028,7	152,38±0,62
126	31	4512,7	145,57±0,62
132	29	4147,9	143,03±0,65
138	26	3687,6	141,83±0,50
144	28	4030,3	143,94±0,51

PESO DE LARVAS DE OBRERA (STABE, 1930)
Cuadro 7

Sin embargo las mediciones de STABE presentaban según DER I WANG (1965) características desconcertantes respecto a algunas de las pesadas, posiblemente y según este autor debido a la falta de una balanza analítica suficientemente sensible para pesar de forma individual larvas de peso pequeño.

DER I WANG (1965) comparó los datos obtenidos, trabajando con abejas de raza ZX, un híbrido de línea de padres muy semejantes desarrollado por el Departamento de Agricultura de E.E.U.U. a partir de abejas caucasicas e inglesas, con los obtenidos por STABE (1930). DER I WANG pesó larvas de obrera entre 6 y 192 horas recogidas de celdas de obrera con intervalos de 6 horas (Cuadro 8).

Contrariamente a los datos de Stabe para larvas jóvenes, encontró que la media de peso de las larvas de obrera era mayor que el de los de reina para los grupos de edades comprendidas entre 6 y 90 horas. Los pesos de las larvas mayores de 48 horas fueron muy similares a los dados por Stabe.

BOUNIAS (1978) reflejó en su trabajo sobre las relaciones intra-glicémicas durante el desarrollo de obreras de abeja *Apis mellifica ligustica* L., el peso individual y tiempo de evolución para cada estadio de desarrollo, partiendo de abejas en estadio de L₃, datos que se reflejan en el cuadro 9.

THRASYVOULOU y BENTON (1982) en su trabajo sobre índices de crecimiento de las larvas de abejas italianas, mostraron que el crecimiento de las larvas de obrera durante las primeras 90 horas de desarrollo coincidía con los estudios realizados por WANG (1965), pero no con los resultados de STABE

(1930). También dividieron el periodo de desarrollo en subunidades más pequeñas estableciendo los coeficientes de correlación (R^2) y las ecuaciones de regresión, tal como se observa en el cuadro 10 a,b..

Las ecuaciones de regresión obtenidas fueron aplicadas a los datos de STABE (1930) y WANG (1965). La estimación de edades predecidas por las ecuaciones eran más altas durante las primeras 36 horas y más bajas después de 48 horas en los tres estudios. Las ecuaciones lineales se ajustaban bien para 11 de las 14 distintas edades larvarias usadas por Wang pero solo para 4 edades usadas por Stabe. Estas variaciones consideraban que podían ser debidas a la variación de ± 4 horas de los datos de Wang y la posible menor sensibilidad analítica de la balanza usada por Stabe.

Edad (hr.)	DATOS DE WANG		DATOS DE STABE	
	Larvas obrera	Larvas reina	Larvas obrera	Larvas reina
6	0,24±0,014 (22)	0,19±0,018 (25)	0,17 (50)	
12	0,36±0,024 (23)	0,21±0,013 (28)	0,29 (50)	0,29(45)
18	0,39±0,014 (17)	0,25±0,042 (24)	0,36 (69)	
24	0,59±0,058 (24)	0,26±0,028 (12)	0,52 (50)	0,59±0,026(47)
30	0,69±0,039 (32)	0,67±0,032 (26)	1,01 (45)	
36	1,01±0,071 (23)	0,84±0,050 (29)	1,29 (50)	1,28±0,028(45)
42	1,37±0,079 (22)	1,08±0,083 (21)	1,63 (55)	
48	3,31±0,102 (24)	2,23±0,133 (23)	3,03±0,09 (16)	3,10±0,094(56)
54	8,63±0,209 (23)	3,53±0,162 (19)	5,87±0,19 (20)	
60	9,55±0,195 (23)	4,40±0,351 (24)	11,1±0,48 (23)	4,69±0,160(28)
66	15,4 ±0,73 (30)	9,47±0,537 (15)	18,3±0,33 (20)	
72	18,5±0,41 (22)	1,5±0,57 (15)	20,6±0,40 (22)	11,6±0,55(33)
78	30,4±0,33 (20)	23,5±0,91 (18)	25,9±0,55 (34)	
84	31,8±0,97 (22)	25,2±1,09 (26)	47,8±1,88 (27)	42,3±1,79(36)
90	46,8±0,88 (18)	32,3±0,58 (16)	66,8±1,25 (20)	
96	64,4±1,57 (20)	49,8±1,58 (15)	80,2±1,98 (17)	87,0±2,01(37)
102	69,3±2,25 (22)	110,1±3,86 (10)	115,6±1,79(15)	
108	117,4±1,35 (23)	208,9±7,51 (23)	138,9±0,79(8)	198,6±5,02 (31)
114	123,9±4,92 (21)	260,1±7,49 (23)	159,1±0,36(31)	
120	160,2±0,83 (23)	268,2±8,64 (25)	152,4±0,62(33)	285,5±5,81 (31)
126	163,7±2,03 (23)	276,7±6,57 (27)	145,6±0,62(31)	
132	163,9±0,91 (21)	290,3±5,79 (23)	143,0±0,65(29)	322,6±2,52 (38)
138	164,1±0,83 (23)	306,9±6,16 (21)	141,8±0,50(26)	
144	167,5±1,98 (21)	298,8±6,86 (21)	143,9±0,51(28)	302,9±1,68 (42)
150	163,0±0,86 (23)	281,1±6,42 (22)		
156	161,6±1,55 (20)	278,5±3,47 (26)		
162	162,9±1,72 (20)	276,1±4,41 (14)		
168	162,0±1,12 (16)			
174	160,0±1,23 (21)			
180	158,9±0,68 (18)			
186	157,9±1,77 (23)			
192	151,5±0,87 (24)			

COMPARACION DE LOS DATOS DE STABE Y WANG

Cuadro 8

ESTADIO	DURACION APROX. (DIAS)	PESOS MEDIOS (mg)	Nº INDIVIDUOS	DESV. EST.
L ₃	1-1,5	60,75	22	11,24
L ₄	1-1,5	111,82	17	6,38
L ₅	1-1,5	137,10	23	13,85
Operc.				
L ₅	1-4	151,15	11	11,10
Preninfa	1	139,05	10	2,76
N ₀	1	139,56	106	3,94
N ₁	1	134,67	28	4,04
N ₂	1,5	137,17	28	4,32
N ₃	1,5	130,50	16	2,12
N ₄	1,5	121,00	11	4,24
N ₅	1,5	127,70	40	1,50
N ₆	1	123,38	75	3,02
A ₀	1/2-1	118,25	30	6,88
F-Ab	(15-90)	102,10	18	15,93

PESO Y TIEMPO DE EVOLUCION PARA CADA ESTADIO DE DESARROLLO A PARTIR DE L₃ (BOUNIAS, 1978).

Cuadro 9

EDAD (h)	PESO (mg)	ECUACIONES DE REGRESION	R ²
6- 30	0,20- 0,80	Y= 1,41+32,60X	95,7
31- 54	0,81- 7,00	Y=31,90+ 2,71X	92,4
55- 90	7,10- 46,00	Y=50,60+ 0,87X	92,6
91-120	46,10-140,00	Y=73,30+ 0,32X	96,9
6-120	0,20-140,00	Y=28,50+ 1,69X-0,0078X ²	90,6

ECUACIONES DE REGRESION Y COEFICIENTES DE CORRELACION (R²) PARA EDAD (X) Y PESO (Y) PARA LARVAS DE OBRERA (THRASYVOULOU y BENTON, 1982)

Cuadro 10a

EDAD (h)	PESO (mg)	ECUACIONES DE REGRESION	R ²
6- 30	0,12- 0,69	Y= 4,79+51,40X	95,7
31- 54	0,70- 8,50	Y=33,50+ 3,29X	84,7
55- 90	8,60- 37,90	Y=48,80+ 1,12X	99,1
91-120	38,00-186,00	Y=85,10+ 0,16X	93,9
6-120	0,20-186,00	Y= 35,60+ 1,06X-0,0031X ²	81,67

ECUACIONES DE REGRESION Y COEFICIENTES DE CORRELACION (R²)
 PARA EDAD (X) Y PESO (Y) DE LARVAS DE REINA
 (THRASYVOULOU y BENTON, 1982)
 Cuadro 10b

2.3.4.3. Caracterización por cambios de la estructura externa.

MYSER (1954) en un extraordinario trabajo sobre el desarrollo larvario y pupal de la abeja *Apis mellifica ligustica* L. estableció los cambios en la estructura externa durante dicho desarrollo, trabajo reflejado en una serie de láminas en las que se representan las larvas enrolladas observadas lateralmente tal y como se encuentran dentro de las celdas durante los 5 días posteriores a la eclosión, y extendidos a partir de este momento hasta llegar al estadio de pupa (cuarto día tras la operculación), representando a ésta en su fase temprana y tardía con proyecciones laterales y ventrales, describiendo con gran detalle cada uno de los apéndices y estructuras que existen en este momento del desarrollo.

En otras láminas se representan también detalles de cabeza, tórax y abdomen de larvas tanto vistas lateral como ventralmente.

2.3.5. Desarrollo de los órganos reproductores.

El desarrollo de los órganos reproductores en la abeja ya fue tratado por ZANDER et al. en 1916. El desarrollo sexual es similar en larvas de reinas y obreras durante el primer día. A partir del segundo día el ovario en la reina empieza a ser mayor que el de la obrera, extendiéndose los ovariolos a lo largo de todo el ovario en el caso de la reina y ocupando la mitad proximal de éste en el caso de la obrera, teniendo al final del tercer día 130 ovariolos en la reina y solo 90 en la obrera. En las obreras durante el estadio pupal se produce una regresión de la espermateca (MICKEY y MELAMPY, 1941; SHUEL y DIXON, 1960).

2.3.6. Desarrollo post-embrionario del sistema endocrino de las hembras de *Apis mellifica*.

El sistema endocrino de los insectos consta de 4 partes: células neurosecretoras en el cerebro y ganglios del SNC, el corpora cardiaca, corpora allata y glándulas protorácicas. El corpora allata y las glándulas protorácicas son glándulas endocrinas que producen hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo. El corpora allata y las glándulas protorácicas son activadas y coordinadas por las células neurosecretoras del cerebro (WIGGLESWORTH, 1964 y GILBERT, 1964). CANETTI et al. (1964), demostraron que las larvas de

obrero y reina de abejas de 72 horas no tenían definido morfológicamente el sistema de transporte y almacenamiento del material neurosecretado. LUKOSCHUS (1956) afirma que en las formas inmaduras, los órganos endocrinos son considerablemente de mayor tamaño en la reina que en la obrero tras el cuarto o quinto día de la vida larvaria.

DOGRA et al. (1977) encontraron marcadas diferencias en la estructura del complejo neurosecretor de la larva de reina y de obrero. En la de reina la morfogénesis de las células neurosecretoras, sus axones y la formación de los quiasmas tiene lugar al final del segundo y principio del tercer estadio larvario y en las obreros al principio del cuarto. Estos autores encontraron material neurosecretor que puede ser teñido al principio del cuarto estadio en larvas de reina y en larvas de obreros al final del cuarto estadio.

En estadios larvarios tempranos el corpora allata es más activo en reinas. Las larvas de obrero y de reina de un día de edad tienen más desarrollado el corpora allata (PFLUGFELDER, 1948; THOMSEN, 1954; LUKOSCHUS, 1955).

Como ya hemos indicado antes el sistema endocrino de la larva de abeja consiste en células neurosecretoras, corpora allata, y glándulas protorácicas, desarrollándose el corpora cardíaca al final del periodo larvario. Las larvas jóvenes no tienen aún completas las células neurosecretoras del protocerebro (DIXON y SHUEL, 1959), mostrando largas células indiferenciadas cuyo contenido nuclear posee grupos desorganizados de material. Estas células fueron primeramente descritas por NELSON en 1924 como células degenerativas.

El proceso de diferenciación de castas en las abejas está bajo el control de la hormona juvenil que es producida por el corpora allata (SHUEL y DIXON, 1960; WIRTZ y BEETSMA, 1972), por lo que los cambios de actividad del corpora allata son muy importantes en este proceso. Puesto que el tipo de nutrición juega un papel importante en esta actividad, la dieta específica de la larva de reina puede guiar los cambios en las tasas de producción de hormona juvenil durante los periodos críticos del desarrollo (NIJHOUT y WHEELER, 1982).

YAGINUMA et al. (1990) realizaron la evaluación citofotométrica del ADN del corpora allata durante el desarrollo larvario de obreras y reinas, obteniendo que entre estadios larvarios de reina, el incremento del contenido de ADN fue gradual y por tanto las mayores diferencias fueron obtenidas entre los estadios 2º y 4º; 2º y 5º; y 3º y 5º. El incremento del contenido de ADN de estadio a estadio en obreras fue más evidente con diferencias significativas encontradas entre el 2º y 3º y el 3º y 4º. Estos autores llegaron a la conclusión que obreras y reinas son genéticamente idénticas y que las variaciones de ADN observadas sugieren que la alimentación diferente de las larvas fue el único factor responsable de esta alteración en el núcleo de las células del corpora allata.

La larva hembra de abeja se puede desarrollar en dos formas fenotípicas distintas. Se establece como causa de la diferenciación hormonal a la diferencia en la nutrición, la cual se traduce en diferencias metabólicas características. El principio determinante reside en la jalea real, porque una larva de dos días alimentada con jalea real puede desarrollarse en reina, obrera o intercasta

(REMBOLD y HANSER, 1964). La función del "principio determinador" (principio que determina una abeja reina) ha sido explicado por REMBOLD y HANSER (1964) referido a superar una diferencia hormonal durante el desarrollo de la larva hembra de abeja.

La influencia de la edad larvaria sobre la efectividad de una dieta determinada está ilustrada por los trabajos de WEAVER (1957) y RHEIN (1933, 1950-51 y 1956).

La naturaleza cuantitativa de la determinación de castas ha sido demostrada mediante varios experimentos (KLEIN, ZANDER y BECKER, citados por RIBBANDS, 1963; SMITH, 1959; VAGT, 1955 y WEAVER, 1957). Según demostraron VAGT (1955) y WEAVER (1957) si se transferían larvas menores de tres días de celdas de obrera a celdas de reina, se producían imagos con ciertos caracteres morfológicos intermedios entre reina y obrera, lo que demuestra que la diferenciación empieza el primer día y es progresiva.

MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. LOCALIZACION.

El trabajo se ha realizado en la Cátedra de Biología del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid durante los años 1994, 1995 y 1996.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se han utilizado abejas de subespecie *Apis mellifica mellifica* L., ubicadas en el colmenar experimental de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M.

3.2.1. Acondicionamiento de los animales.

Las abejas estaban instaladas en colmenas "perfección" y las reinas marcadas en su torax con discos de plástico de colores según el código internacional.

Las reinas de las colmenas experimentales utilizadas fueron reinas nuevas recién fecundadas.

3.2.2. Alimentación.

Las abejas, según el estudio polínico realizado en la miel, disponían de una amplia gama de flora apícola, al ser su principal área de pecoreo el Parque Municipal, antigua Finca Real, de la Casa de Campo, situado en el Noroeste de Madrid, zona rica en arbolado y flora apícola con predominio de leguminosas como la acacia y la sófora.

3.2.3. Control sanitario.

Con el fin de evitar problemas patológicos que podrían producir alteraciones en el desarrollo larvario, se sometió a las colmenas a un riguroso control sanitario, realizando de forma periódica tratamientos anti varroa con fluovalinato (2 tiras impregnadas en fluovalinato por colmena), así como preventivos de loque europea con apiciclina (10 g por colmena durante 10 días).

3.3. FARMACOS Y REACTIVOS.

Apistán (fluovalinato).

Apiciclina (Oxitetraciclina, 0,4%; sultatiazol, 4%; Excipiente (c.s.)

Metanol (70%).

3.4. MATERIAL DE LABORATORIO.

- Lupa estereoscópica Nikon SMZ-2T (10-65 X).
- Balanza Mettler AE200.
- Estufa de cultivo Selecta Mod. 207.
- Termómetro de máxima y mínima.
- Aguja de translarvar.
- Pinzas entomológicas.
- Placas de Petri de distinta medida.

3.5. MATERIAL FOTOGRÁFICO.

- Camara reflex 35mm Nikon F-601.
- Macro 300mm.
- Anillos de aproximación.

3.6. MATERIAL INFORMATICO.

- Ordenador PC con procesador 486.
- Microsoft Windows 3.11.
- Procesador de textos Word Perfect 5.1 y Microsoft Word.
- Procesador de gráficos Harvard Graphics Windows.
- Procesador de imágenes Photo Finish.
- Impresora Hewlett Packard LaserJet IID.
- Impresora Hewlett Packard 550 C.
- Scanner Howtek personal color scanner 300x300 dpi.

3.7. COLMENAS EXPERIMENTALES.

Las colmenas utilizadas para el mantenimiento de los enjambres experimentales reunían una serie de características biológicas relacionadas con la ubicación y dimensiones, para facilitar y hacer posible la obtención de los datos necesarios para la realización de nuestro trabajo.

Estas características eran las siguientes:

1. Características biológicas.

La colmena experimental disponía de un enjambre vigoroso que nos permitía retirar parte de la cría sin que la población de la colmena sufriera una disminución drástica, que pudiera poner en peligro la supervivencia de la misma.

2. Ubicación.

Las colmenas experimentales deben estar lo más cerca posible del laboratorio en el que se encuentra el material necesario para dicha experimentación, con el fin de evitar el enfriamiento de la cría en las distintas manipulaciones a la que deben ser sometidos los cuadros, por ello se colocaron en un laboratorio perfectamente aislado, contiguo al lugar donde se procesaban las muestras.

Las colmenas disponían de una piquera en una de las ventanas de dicho laboratorio con orientación Este.

El laboratorio disponía de un escape de abejas realizado en otra ventana, con orientación Sur, para impedir en lo posible la entrada de abejas procedentes de las colmenas experimentales.

3. Dimensiones y disposición de los panales.

Se utilizaron dos tipos de colmenas experimentales. Una dedicada a la obtención de larvas preoperculadas y otra para la obtención de larvas operculadas.

Las dimensiones de la primera colmena se adaptaron para permitir la utilización de cuadros especiales, tanto de medias alzas "perfección" (48x17 cm) como de núcleos de cría de reinas (12x12 cm)

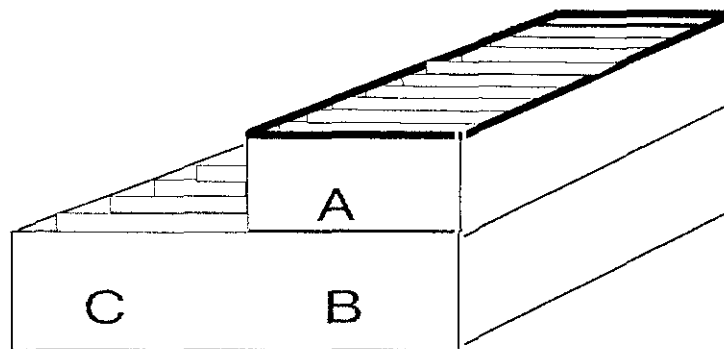
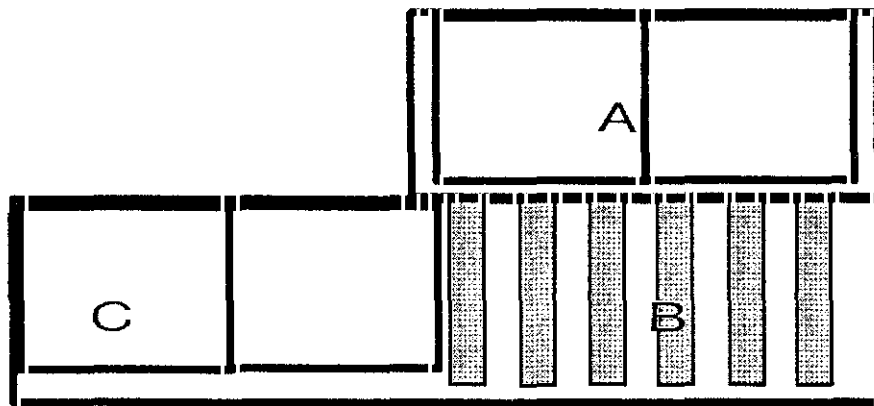
que nos permitieran la obtención de larvas con edades uniformes sin causar graves pérdidas en la población de la colmena.

Con las medidas de los cuadros de medias alzas "perfección" como base (48x17 cm) se construyó una colmena de 12 cuadros de medias alzas, de medidas internas 48x48x17,5 cm, con fondo fijo y una piquera de 2 cm de diámetro en uno de sus laterales. Un alza de 5 cuadros de medias alzas de medidas interiores 48x22x17,5 cm y un excluidor de reinas de 50x24 cm.

La colmena de 12 cuadros disponía de 9 cuadros, medias alzas "perfección", dispuestas longitudinalmente con respecto a la piquera (zona B) y 13 cuadros de 12x12 cm colocados transversalmente a la piquera junto a uno de los laterales, que pueden observarse en la zona C de la figura 4.

El alza dispone de 26 cuadros de 12x12 cm colocados de dos en dos transversalmente a la posición de la piquera (Zona A, fig.5), donde se situó a la reina, separada del resto de la colmena por un excluidor de reinas.

La segunda colmena utilizada para la obtención de larvas operculadas era una colmena "perfección" de doce cuadros.



- A. Cuadros de 12x12 cm. Zona de puesta con reina.
- B. Cuadros de 12x12 cm. Zona de incubación sin reina.
- C. Cuadros "perfección" medias alzas. Zona de alimentación.

Figura 4

3.8. MANEJO DE LAS LARVAS.

Con el fin de obtener larvas y pupas en perfectas condiciones para su posterior estudio utilizamos la siguiente metodología:

Hasta el momento de la operculación las larvas fueron recogidas con una aguja de translarvar especialmente diseñada para obtener los animales sin causarles daños. Una vez recogidas, se colocaban con cuidado sobre una placa de Petri en la que habíamos colocado un papel de filtro húmedo. Esta placa de Petri era la utilizada para las pesadas, habiendo previamente tarado la balanza con el peso de ésta.

Cuando las larvas ya estaban operculadas y su tamaño era considerablemente mayor, se utilizaba para su extracción unas pinzas entomológicas y una aguja de translarvar. Para su posterior pesaje se siguieron los mismos pasos que para las larvas recogidas antes de la operculación. Si alguna de las larvas resultaba dañada por la manipulación se desechaba.

3.9. SONDEO PRELIMINAR.

Con el fin de determinar el número de individuos con los que deberíamos trabajar en los distintos momentos de la experiencia se hizo un sondeo previo para verificar cual era la sensibilidad de la balanza. Con los datos obtenidos se planificó la metodología a seguir.

3.10. CURVA DE CRECIMIENTO DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO.

Para la obtención de la curva de crecimiento durante el desarrollo larvario se realizaron pesadas de 10 larvas cada 24 horas, desde el nacimiento hasta la operculación y cada 6 y 18 horas desde la operculación hasta el momento de su transformación en imago.

Con el fin de unificar la edad de las larvas, con diferencias máximas de 6 horas, fue necesario proceder en dos momentos diferentes:

- A.- Oviposición.
- B.- Operculación.

A.- Para obtener larvas con ± 6 horas de vida, a las 11 h se colocaban en la zona de puesta de la colmena (A) cuadros de 12x12 cm con cera estirada. A las 17 h se revisaban dichos cuadros que habían sido adecuadamente marcados, y se retiraba aquel en el que existiese puesta, colocándolo en la parte inferior de la colmena (C) para impedir que la reina tuviera acceso al mismo.

Transcurridos 3 días se producía la eclosión y a partir de este momento y hasta la operculación, se pesaban diariamente a las 17 h 10 larvas escogidas al azar, en dos lotes de 5 larvas cada uno; introduciéndolas tras la pesada en frascos con metanol al 70% para su conservación y posterior estudio morfológico.

B.- Para llevar un control más riguroso de las 6 horas de margen con que trabajamos, realizamos un segundo control, coincidiendo con el momento de la operculación de las celdas de cría.

Como en el caso anterior se revisaban los cuadros de cría a las 11 de la mañana, se elegía aquel o aquellos en los que las celdas estaban comenzando a opercularse, marcando todas aquellas celdas que en ese momento estuvieran operculadas con laca de uñas de un color determinado. A las 17 h se revisaban el cuadro o cuadros elegidos y se marcaban aquellas celdas recién operculadas con laca de uñas de un color distinto al utilizado en el marcaje hecho por la mañana. Este procedimiento se continuaba, cambiando el color de la marca de las 17 h, de forma diaria, hasta que el cuadro estaba totalmente operculado (aproximadamente 5 días), momento en el cual se sacaba de la colmena y se introducía en una estufa de cultivo a 35°C y 60% de humedad relativa, para pesarlas diariamente cada 6 y 18 horas respectivamente. Este proceso se realizó pesando individualmente 10 larvas elegidas al azar, que como en el caso anterior se introducían en metanol al 70% para su posterior estudio morfológico.

3.11. ESTUDIO MORFOLOGICO

Se realizó un estudio morfológico de larvas y pupas desde la eclosión del huevo hasta el nacimiento.

Para llevar a cabo este estudio se realizaron fotografías, cada 24 horas, de las larvas y pupas en vista dorsal, ventral y lateral, inmediatamente después de ser extraídas del panal y antes de ser introducidas en metanol para evitar modificaciones en la coloración .

Se realizaron zotomías de las distintas pupas independizando cabeza, antenas, aparato bucal, alas, apéndices torácicos y en algunos casos aparato venenífero, tomando fotografías del conjunto y de la cabeza separadamente.

Las cabezas separadas de cada estadio de pupa fueron fotografiadas con lupa estereoscópica, realizándose medidas longitudinales y transversales de éstas, así como medidas longitudinales de las antenas, utilizando para ello un ocular enfocable con rejilla milimétrica previamente calibrada.

3.12. ESTUDIO ESTADISTICO.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un estudio de análisis descriptivo (media aritmética, desviación típica, valores máximos y mínimos y coeficiente de variación).

También se llevó a cabo un análisis de correlación y de regresión lineal y no lineal. Se han tratado los datos de forma independiente según el estadio de desarrollo, separándolo en dos grupos, uno correspondiente a larvas y otro a las pupas. El estadio larvario se ha estudiado en su conjunto y también subdividiéndolo en dos tramos, uno hasta el momento de la operculación y otro hasta que se produce el paso a pupa. En el primer tramo del estadio larvario (tiempo < 116 horas), el peso de las larvas no se ha tratado individualmente debido a que era muy bajo y se optó por pesar en dos grupos de cinco individuos hasta que alcanzaron un peso suficiente, para evitar posibles errores debidos a la sensibilidad de la balanza.

El estudio estadístico se realizó mediante los programas informáticos PAR, P1R y PID "Copyright 1990 by BMDP Statistical Software Inc."

3.13. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE LAS FOTOGRAFÍAS.

Con el fin de facilitar la comprensión de las fotografías obtenidas de las larvas, hemos realizado esquemas de cada una de ellas, resaltando las partes más significativas mediante la asignación de diferentes colores.

La realización de los esquemas se llevó a cabo mediante un escaner de 300x300 pixel, con el que se procesaron las fotografías en escala de grises. Posteriormente mediante el procesador de imágenes Photo Finish se han perfilado y coloreado las distintas estructuras anatómicas.

Terminado el proceso de esquematización, las imágenes obtenidas se han traspasado a un archivo abierto en el procesador de gráficos Harvard Graphics para Windows en el que figuraban las fotografías originales.

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. CURVA DE CRECIMIENTO.

Los resultados correspondientes a las variaciones del peso de las larvas y pupas de *Apis mellifica mellifica L.*, dependiendo de la edad expresada en horas, se han basado en el estudio estadístico de los valores obtenidos durante las 392 horas en las que se llevaron a cabo estos análisis.

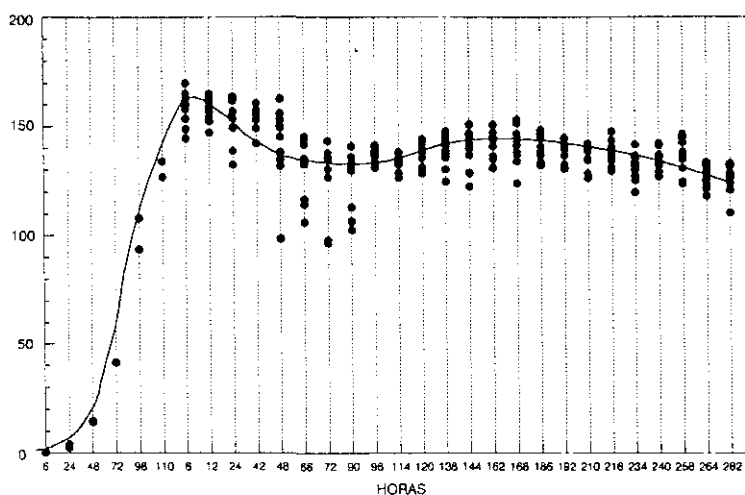
En primer lugar se ha realizado una representación gráfica del peso de los individuos desde las 6 horas del nacimiento de las larvas hasta las 392 horas, momento de la eclosión del imago, dicha gráfica se ha elaborado mediante la unión de los ajustes realizados de forma independiente para los distintos intervalos de crecimiento estimados. (Cuadro 11, Figura 6). En un principio observamos que las larvas sufren un rápido incremento de peso que luego se estabiliza alcanzando un máximo de 157 mg a las 128 horas del nacimiento, para iniciar posteriormente un leve descenso, obteniendo un valor medio de 133,8 mg a las 224 horas del nacimiento. En el estadio de pupa este crecimiento sufre un ligero aumento para después volver a caer oscilando entre valores medios de 141,2 mg a las 278 horas y los 124,9 mg a las 396 horas (6 horas antes de la eclosión del imago). Basándonos en los distintos estadios que presenta este desarrollo hemos dividido los datos en dos grandes grupos: Los correspondientes al estadio larvario y los del estadio pupal. Dentro de los primeros también hemos hecho una subdivisión, estudiando por un lado los datos desde el nacimiento hasta la operculación y por otro desde el nacimiento hasta el paso al estadio de pupa.

Horas	Suma 5 larvas		Suma 5 larvas		Media		
6	0,0013		0,001		0,00023		L1
24	0,0188		0,012		0,00308		L1
48	0,0716		0,0693		0,01415		L2
72	0,2054		0,2055		0,04109		L3
96	0,5385		0,4667		0,10052		L4
110	0,6693		0,633		0,13023		L5

HORAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA	
6	0,158	0,1623	0,1487	0,1651	0,1699	0,1595	0,1488	0,1604	0,1444	0,1536	0,157	L5
18	0,162	0,1472	0,1524	0,1568	0,1544	0,1528	0,1622	0,1648	0,159	0,1592	0,157	L5
24	0,1494	0,1619	0,1385	0,1321	0,1537	0,1632	0,1493	0,1637	0,1563	0,1569	0,1525	L5
42	0,1421	0,1556	0,1561	0,1608	0,1558	0,156	0,153	0,1492	0,1562	0,1574	0,1542	L5
48	0,1627	0,156	0,1345	0,1501	0,153	0,1451	0,1315	0,1379	0,1494	0,0983	0,1418	L5
66	0,1447	0,1331	0,1142	0,1344	0,1453	0,1164	0,1417	0,1351	0,1325	0,106	0,1303	L5
72	0,1361	0,1372	0,1362	0,1303	0,1378	0,0965	0,1346	0,1432	0,0976	0,1265	0,1276	L5
90	0,1302	0,133	0,1408	0,1358	0,113	0,1311	0,1296	0,1065	0,1317	0,1025	0,1254	L5
96	0,1413	0,136	0,131	0,1406	0,1381	0,1371	0,1332	0,1365	0,1391	0,1378	0,1372	L5
114	0,1285	0,1265	0,138	0,1328	0,1348	0,1325	0,1334	0,138	0,138	0,1357	0,1338	P
120	0,1405	0,1441	0,1412	0,1385	0,1295	0,1283	0,1354	0,1382	0,1425	0,1312	0,1369	P
138	0,1301	0,1462	0,1355	0,1424	0,1478	0,1391	0,1379	0,1444	0,1244	0,1413	0,1389	P
144	0,1457	0,1467	0,1509	0,1367	0,1457	0,1285	0,1419	0,1224	0,1399	0,1449	0,1408	P
162	0,1409	0,1446	0,1348	0,1358	0,1441	0,1362	0,1308	0,1471	0,1446	0,1507	0,1409	P
168	0,1237	0,1531	0,1379	0,1424	0,1415	0,1456	0,137	0,1514	0,1465	0,1338	0,1412	P
186	0,1446	0,1334	0,1369	0,1484	0,1327	0,1407	0,132	0,1383	0,1464	0,1465	0,1399	P
192	0,1303	0,1323	0,1365	0,1306	0,1413	0,1318	0,1445	0,1396	0,1394	0,1412	0,1367	P
210	0,1394	0,135	0,1343	0,1386	0,1408	0,142	0,1391	0,1263	0,142	0,1283	0,1365	P
216	0,1365	0,1344	0,1295	0,1342	0,139	0,1435	0,1389	0,1476	0,1309	0,1405	0,1375	P
234	0,1312	0,1363	0,1197	0,1355	0,127	0,1253	0,1334	0,1416	0,1297	0,1319	0,1311	P
240	0,1359	0,1369	0,1421	0,1413	0,127	0,1332	0,132	0,1327	0,1335	0,129	0,1343	P
258	0,1307	0,1427	0,145	0,1245	0,1381	0,1359	0,1464	0,1349	0,1236	0,1361	0,1357	P
264	0,1318	0,1215	0,1285	0,1333	0,1304	0,118	0,1281	0,1228	0,1243	0,1252	0,1263	P
282	0,1238	0,1326	0,1206	0,1317	0,1272	0,1103	0,1278	0,1283	0,1207	0,1261	0,1249	P

VALORES CORRESPONDIENTES AL PESO EN GRAMOS DE LARVAS Y PUPAS
DE *APIS MELLIFICA MELLIFICA*

Cuadro 11



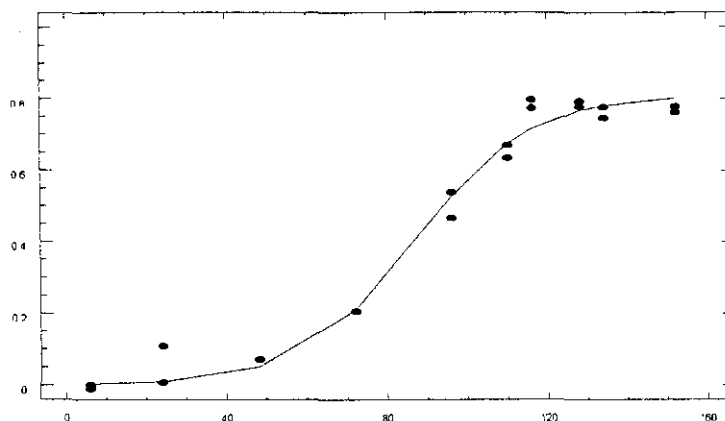
UNIÓN DE AJUSTES INDEPENDIENTES PARA LOS DISTINTOS INTERVALOS DE CRECIMIENTO.

Figura 6

4.1.1. ESTADIO LARVARIO.

A) Larvas desde el nacimiento hasta la operculación.

Los resultados correspondientes a la evolución de los pesos de las larvas desde las 6 horas desde el nacimiento hasta las 110 horas se pueden observar en la Figura 7, en la que se representan los pesos agrupados en dos series, constituidas por los seis datos, obtenidos cada uno de ellos por la media de los pesos de cinco individuos.



EVOLUCIÓN DE LOS PESOS DE LAS LARVAS DE APIS MELLIFICA DESDE LAS 6 HORAS HASTA LAS 110 HORAS.

Figura 7

El modelo matemático que mejor describe este primer estadio larvario es el logístico, definido por la siguiente ecuación:

$$y = \frac{P_1}{1 + \exp(-P_2(t - P_3))}$$

Donde: $P_1=0,17$, es la asíntota superior.

$P_2=0,60$, es el parámetro relacionado con la pendiente o velocidad de crecimiento.

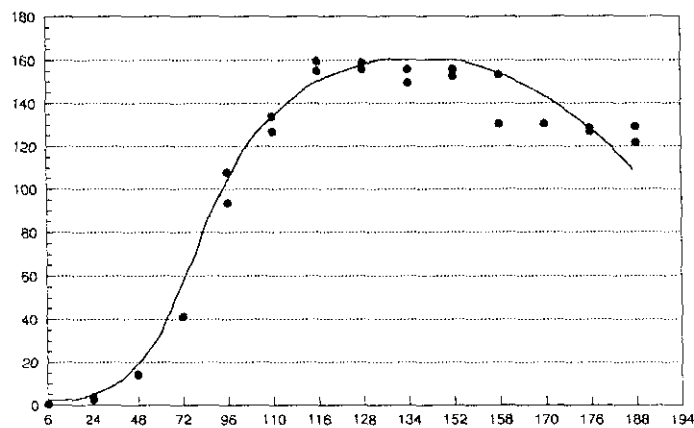
$P_3=90,39$, es la abscisa en el punto de inflexión.

La suma de los cuadrados residuales, SCR es igual a $1,4364 \times 10^{-4}$ y R^2 igual a 0,9952.

B) Larvas desde el nacimiento hasta el estadio de pupa

Los resultados obtenidos desde el nacimiento de las larvas hasta el estadio de pupa se describen en el Cuadro 12.

La representación gráfica de estos resultados se muestran en la figura 8.



REPRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS EN EL INTERVALO
NACIMIENTO-PUPA.

Figura 8

n	SCR	R ²	Nº parámetros	Estimado	SD
28	2,70x10 ⁻³	0,9703	P ₁	-0,007660	0,005141
			P ₂	0,000380	0,000086
			P ₃	-0,012610	0,000084
			P ₄	0,000054	0,000004

RESULTADOS DE LOS AJUSTES PARA EL INTERVALO NACIMIENTO-PUPA

Cuadro 12

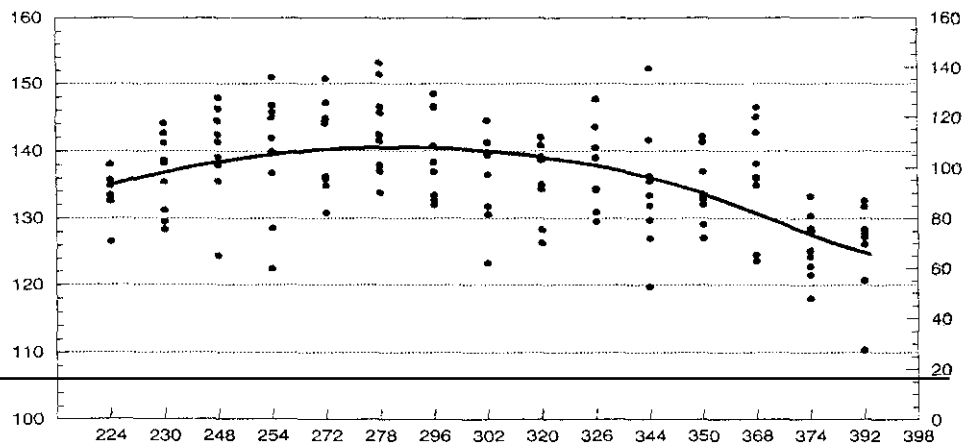
El modelo matemático que mejor describe este estadio es el cociente de polinomios, según la fórmula

$$y = \frac{P_1 + P_2 t}{1 + P_3 t + P_4 t^2}$$

4.1.2. ESTADIO PUPAL.

Los valores obtenidos de los pesos de las pupas durante su desarrollo están representados en la figura 9, donde se observa que los pesos presentan una tendencia de ligero crecimiento positivo hasta las 270 horas, continuando con un progresivo descenso hasta el momento de emergencia del imago.

Este tramo se ajusta a un modelo polinomial de tercer grado con un valor de $R^2 = 0,2957$, a pesar de lo cual resulta significativo y cuya fórmula es: $y = a + bx + cx^3$



REPRESENTACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LOS PESOS DE LAS PUPAS DE APIS MELLIFICA

Figura 9

4.2. ESTUDIO MORFOLOGICO

Para el estudio morfológico de las larvas hemos tenido en cuenta distintos aspectos, referidos a coloración de las distintas partes de su anatomía externa, así como al desarrollo de los tagmas y de sus correspondientes apéndices y estructuras.

4.2.1. Coloraciones corporales.

A partir de observaciones directas corroboradas por las fotografías tomadas, hemos realizado un cuadro en el que se representan las variaciones de color de los tagmas, de los apéndices y estructuras de éstos durante el desarrollo de las pupas (Cuadro 16). Los resultados obtenidos son los siguientes:

La cabeza permanece blanca hasta las 168 horas, pasando a tonos amarillos durante las 192 y 216 horas, alcanzando un color marrón oscuro a las 240 horas, para llegar al negro a las 264 horas (24 horas antes del nacimiento).

Los ojos y ocelos a las 72 horas son blancos, pasando a ser de color rosa a las 96 horas, rojos a las 144 horas, rojos oscuros a las 168 horas y negros a las 240 horas (48 horas antes del nacimiento).

Las antenas permanecen blancas durante las 144 primeras horas, tomando tonalidades amarillas claras entre las 168 y 192 horas; a las 216 horas son de color amarillo oscuro y pasan a negro directamente a las 240 horas.

El aparato bucal, al igual que las antenas, permanece de color blanco hasta las 144 horas, alcanzando tonos amarillos a las 168 horas y llegando al amarillo oscuro entre 192 y 216 horas. A las 240 horas presenta coloraciones marrones, pasando a negro 24 horas después.

Las fotografías seriadas de las cabezas de las pupas, acompañadas de esquemas explicativos están plasmadas en las láminas 1 a 10.

El tórax tiene color blanco durante las primeras 144 horas, oscureciéndose progresivamente durante las 96 horas siguientes, pasando por amarillo, amarillo oscuro y marrón para adquirir el color negro a las 264 horas de la operculación.

Las alas son blancas hasta las 144 horas, momento en el que adquieren un color amarillo claro y después amarillo oscuro e inmediatamente se oscurecen a un tono marrón oscuro pasadas las 264 horas.

Las patas de color amarillo a las 168 horas, pasan a amarillo oscuro a las 216 horas, marrón a las 240 horas y marrón oscuro a las 264.

El abdomen, al igual que el torax, se vuelve a tomar amarillo a las 168 horas, permaneciendo amarillo oscuro entre las 192 y las 216 horas, para adquirir el color marrón oscuro a las 240 horas y negro a las 264.

El aguijón sigue la misma frecuencia que el abdomen, hasta las 216 horas, momento el que presenta un tono marrón para pasar a marrón oscuro 24 horas

después y posteriormente a negro. Todas estas características están resumidas en el cuadro 16.

Días	5	6	7	8	9	10	11	12	13	ADL
cabeza	B	B	B	B	B	A	Ao	Mo	N	N
ojo	A	R	R					N	N	N
ocelo	A	R	R					N	N	N
antena	B	B	B	B	A	A	Ao	N	N	N
mandib	B	B	B	B	A	Ao	Ao	M	N	N
labio ap.buc.	B	B	B	B	A	Ao	Ao	Mo	Mo	N
torax	B	B	B	B	A	Ao	Ao	Mo	N	N
alas	B	B	B	B	A	A	Ao	B	Mo	Mo
patas	B	B	B	B	A	A	Ao	M	Mo	Mo
abdom.	B	B	B	B	A	Ao	Ao	Mo	Mo	Mo
vene.	B	B	B	B	A	Ao	M	Mo	N	N

- B : BLANCO
 A : AMARILLO
 Ao : AMARILLO OSCURO
 R : ROSA
- Rj : ROJO
 ● Rjo : ROJO OSCURO
 ● M : MARRON
 ● Mo : MARRON OSCURO
 ● N : NEGRO

COLORACIONES DE LAS DIFERENTES PARTES DE PUPAS DE *A. mellifera mellifera* L.

Cuadro 16

4.2.2. Características morfológicas

En la larva de 24 horas (1^{er} día), en la zona lateral del tórax, bajo la cutícula larvaria, aparecen unas pequeñas manchas blancas, en forma de media luna, que son los esbozos de las alas imaginales.

En el mismo estadio, se pueden diferenciar lateralmente los esbozos antenales como unas elevaciones redondeadas sobre los también visibles, esbozos mandibulares.

El labio se puede apreciar en vista ventral junto a las maxilas que se sitúan lateralmente.

A las 48 horas (2^o día), los esbozos alares son más prominentes. El labio se aprecia perfectamente, incluso en vista lateral, situado por debajo de las maxilas. Las mandíbulas y los esbozos de las antenas se hacen más marcados. Los espiráculos son fácilmente observables, manteniéndose así hasta el estadio de pupa.

A las 72 horas (3^{er} día), todas las estructuras mencionadas son visibles haciéndose cada vez más manifiestas. El clipeo se comienza a evidenciar, apreciándose mejor en proyección dorsal.

A las 96 horas (4^o día) se detecta un incremento en el tamaño de los esbozos alares, así como un alargamiento y engrosamiento de las piezas

bucales y del clípeo. En la región torácica, por debajo de los esbozos alares empiezan a emerger los esbozos de las patas imaginales.

A las 120 horas (5º día), no existe ninguna modificación reseñable respecto a la larva de 96 horas, excepto un ligero aumento de tamaño de las estructuras descritas.

A las 6 horas de la operculación (5º día), en la región de la cabeza y el torax, la cutícula larvaria transparente, empieza a separarse de la cutícula pupal. El labio se encuentra rodeado de dos palpos labiales y de las maxilas que se extienden cefalicamente. El resto de las estructuras incrementan progresivamente su tamaño.

A las 24 horas de la operculación (6º día), las antenas aparecen como órganos segmentados con forma de "S" localizadas sobre el frontal de la cabeza. Los ojos imaginales empiezan a desarrollarse simultáneamente a ambos lados de la cabeza como estructuras ovales.

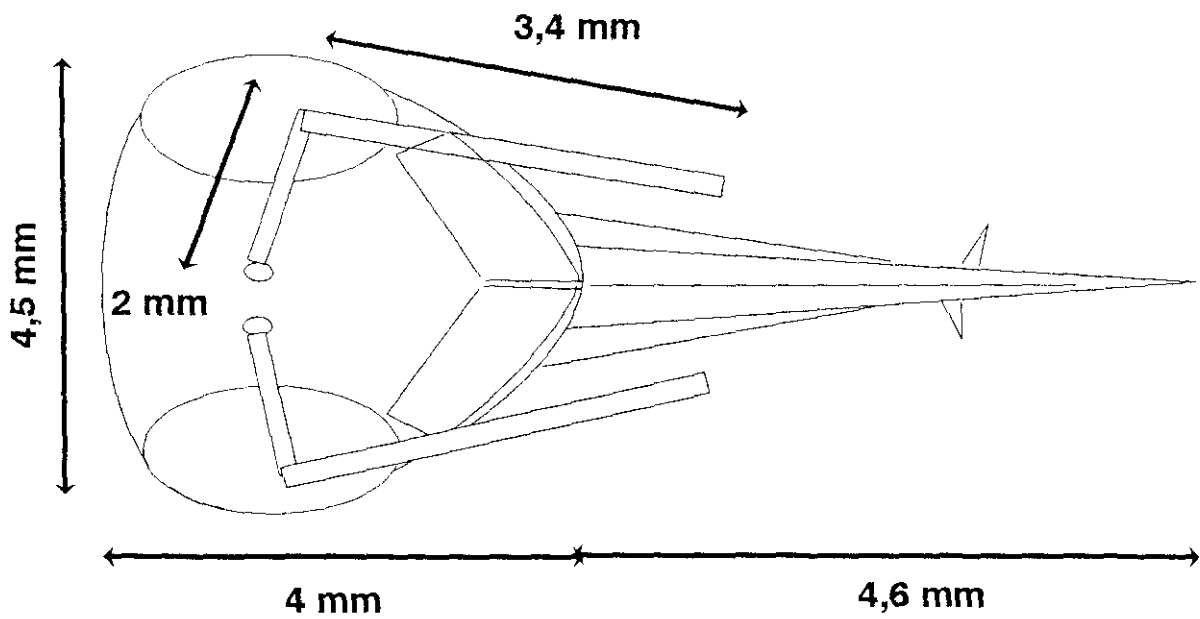
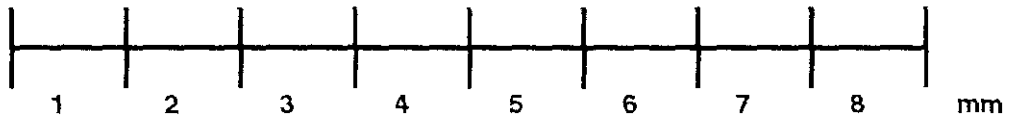
A las 48 horas de la operculación (7º día), la cutícula larvaria se ha separado de la pupal en la cabeza y torax y también en los últimos 4 segmentos abdominales. Las alas son más largas al igual que las piezas bucales y las patas. La cabeza en general es más ancha, las antenas y los ojos son más prominentes. Las fotografías de las larvas, así como el detalle de las mismas, se encuentran plasmadas en las láminas de la 11 a la 18.

A las 66 horas tras la operculación (8º día), se alcanza el climax de la vida larvaria. La cutícula larvaria se separa de la pupal, excepto en las conexiones traqueales (espiráculos), observándose la presencia de un fluido entre ambas, que da a la larva un aspecto gelificante.

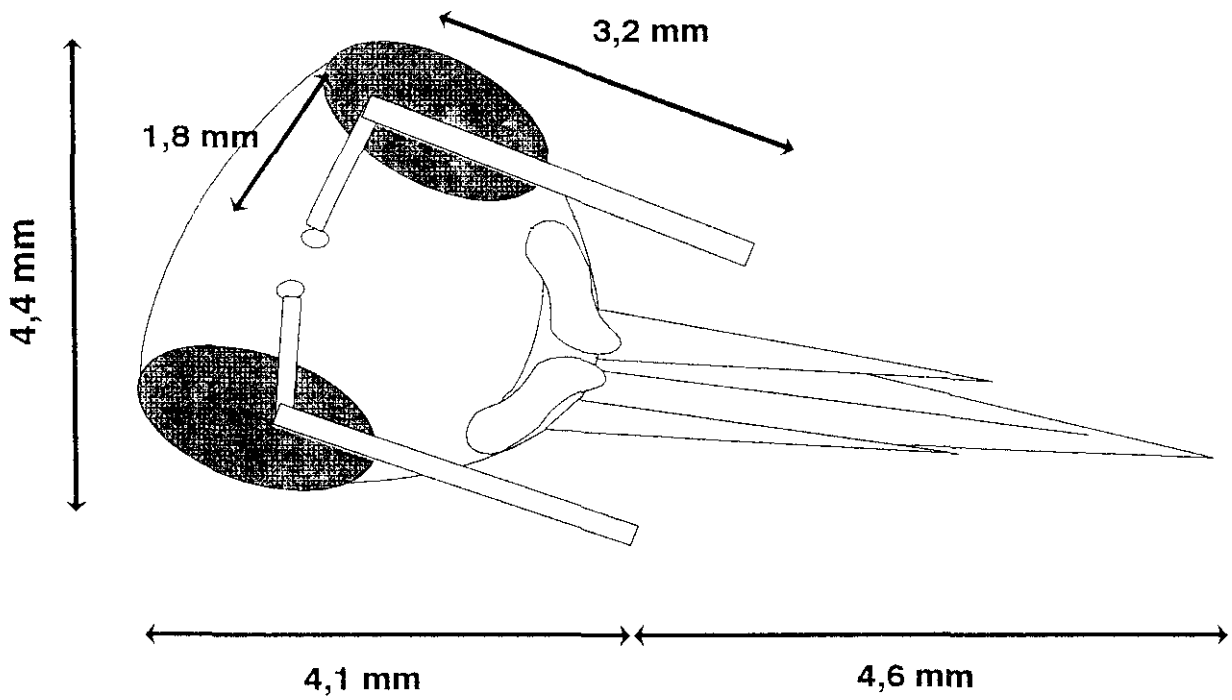
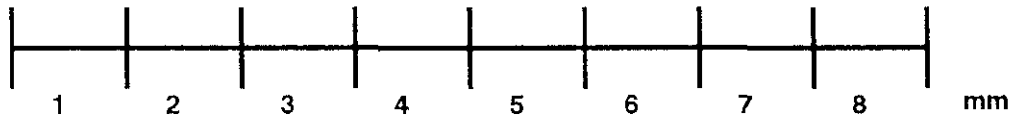
A las 72 horas de la operculación (8º día), la larva se ha transformado totalmente en pupa, siendo visibles las antenas, alas y apéndices locomotores, al igual que las estructuras bucales y el aguijón.

A partir de este momento no hay prácticamente ninguna modificación externa; solamente existen cambios de coloración de las distintas estructuras, que previamente hemos descrito en el apartado anterior.

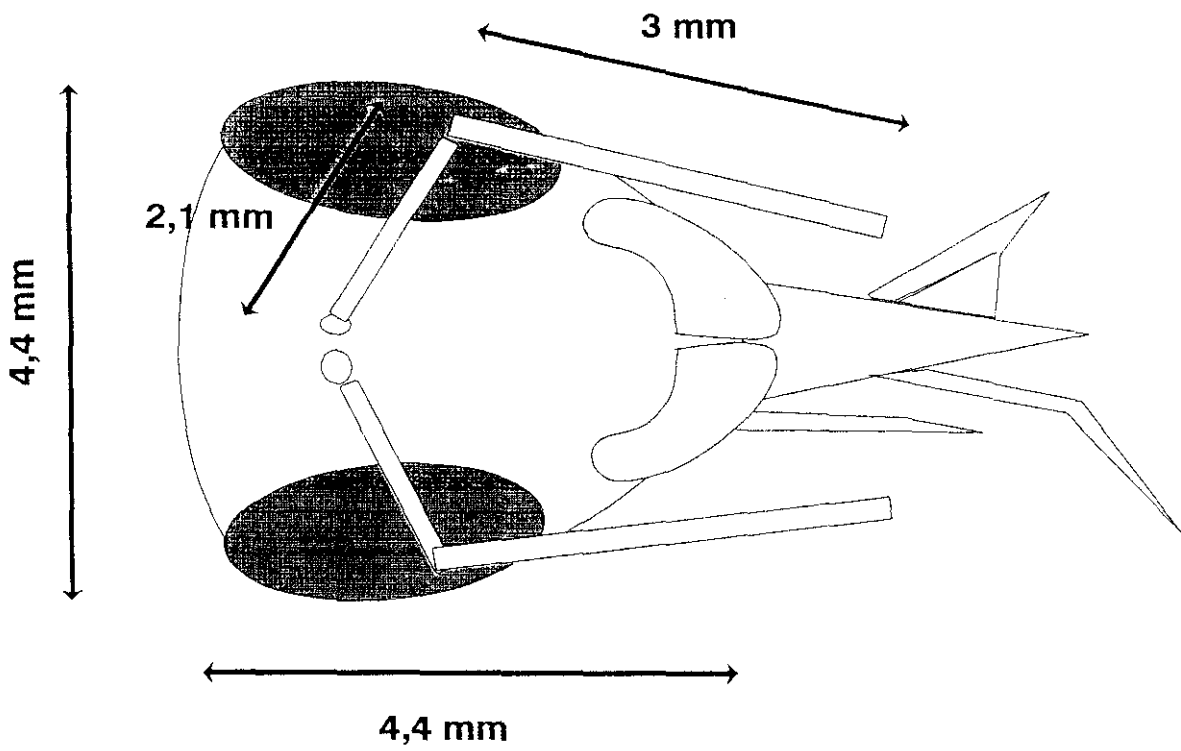
Las fotografías seriadas de las pupas en proyección dorso-ventral, latero-lateral y ventro-dorsal, así como las zootomías de las mismas, acompañadas de esquemas explicativos están plasmadas en las láminas 19 a 38.



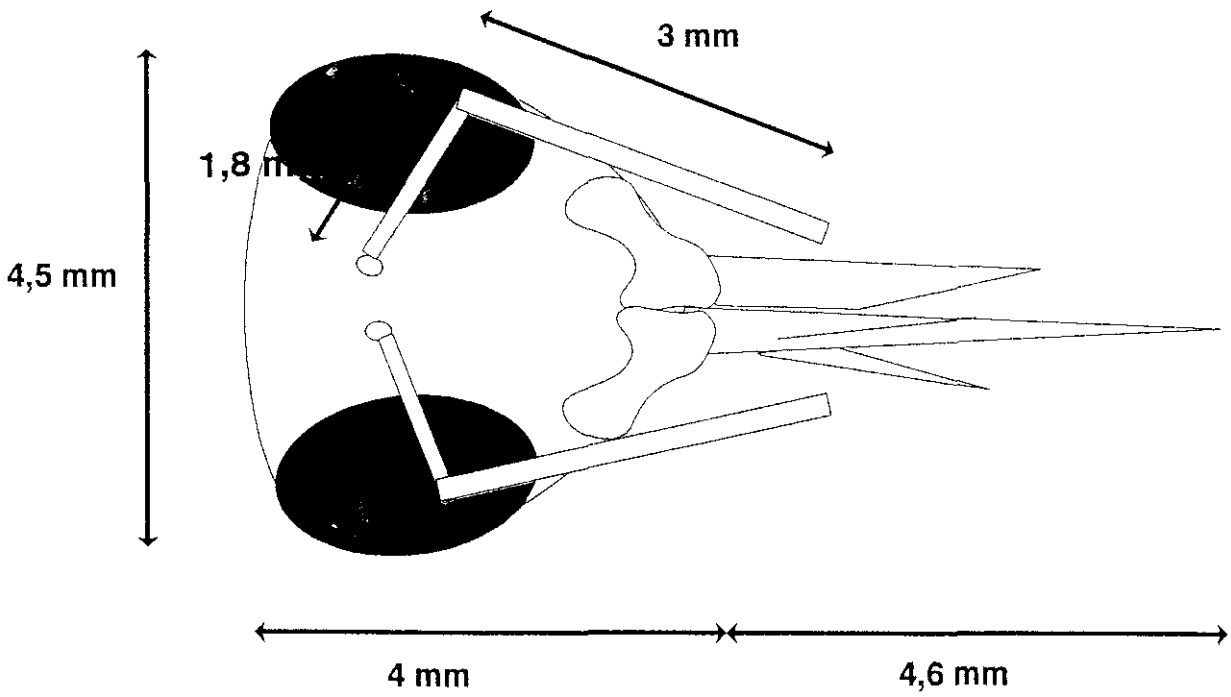
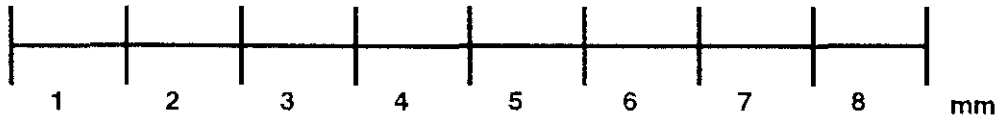
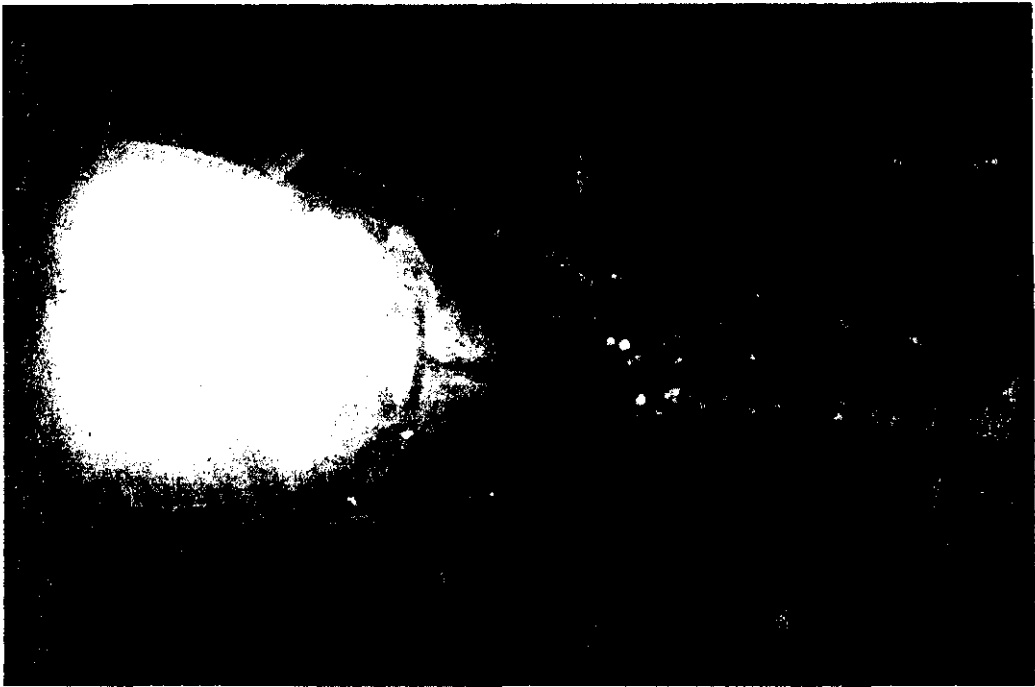
LAMINA 1. PUPA DE 72 HORAS



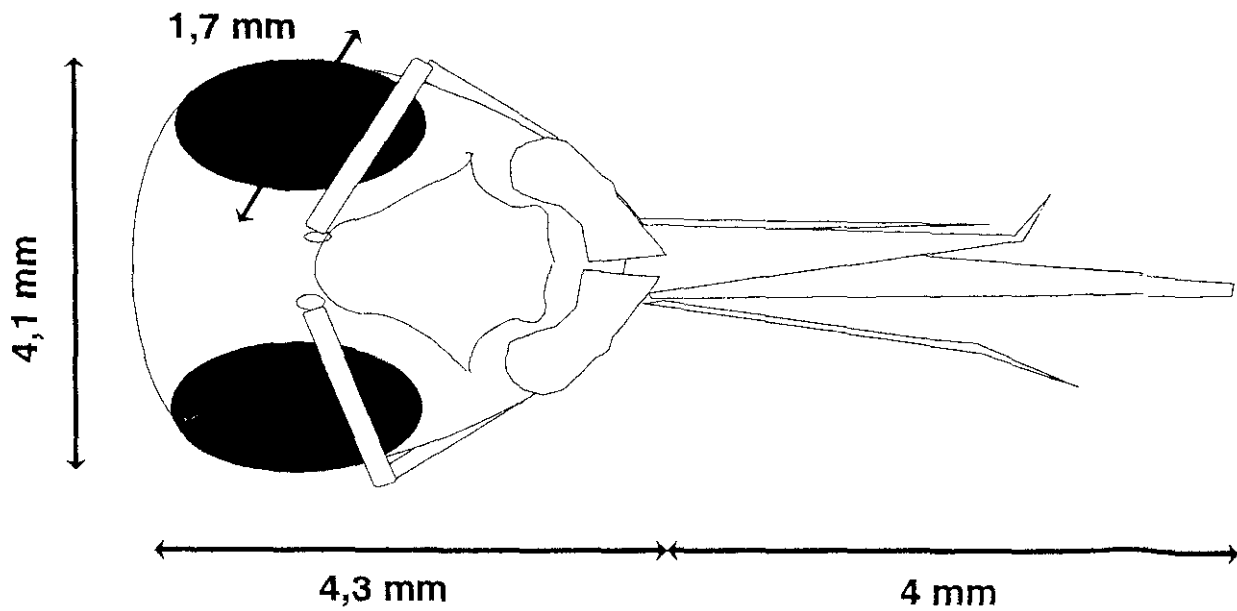
LAMINA 2. PUPA DE 96 HORAS



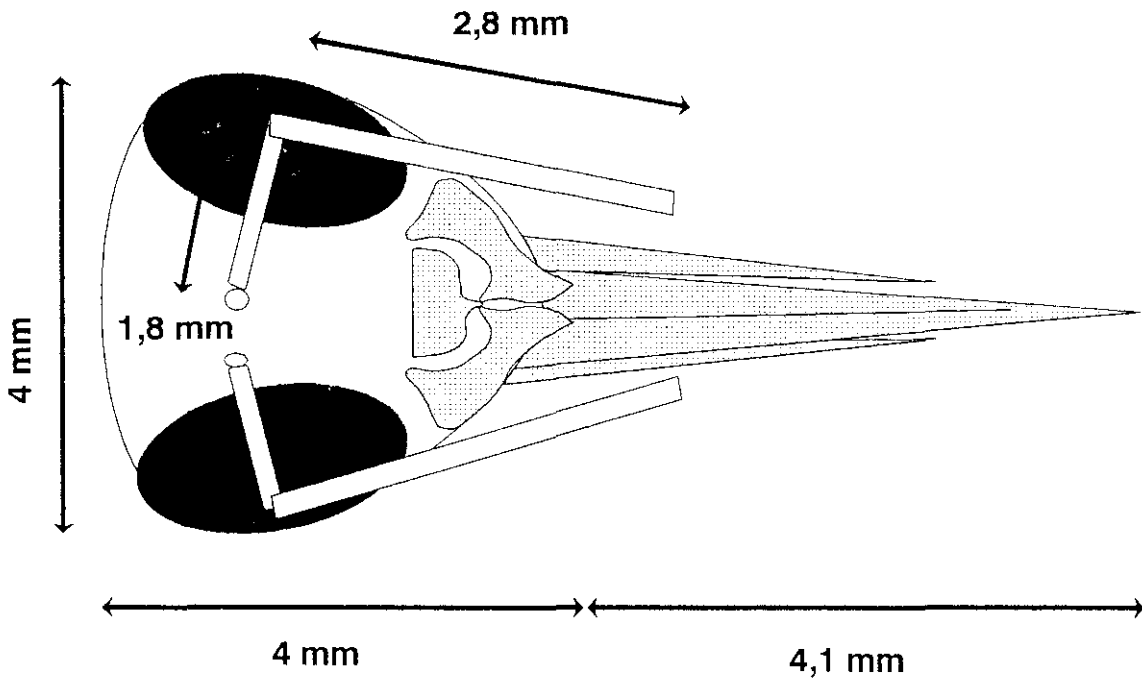
LAMINA 3. PUPA DE 120 HORAS



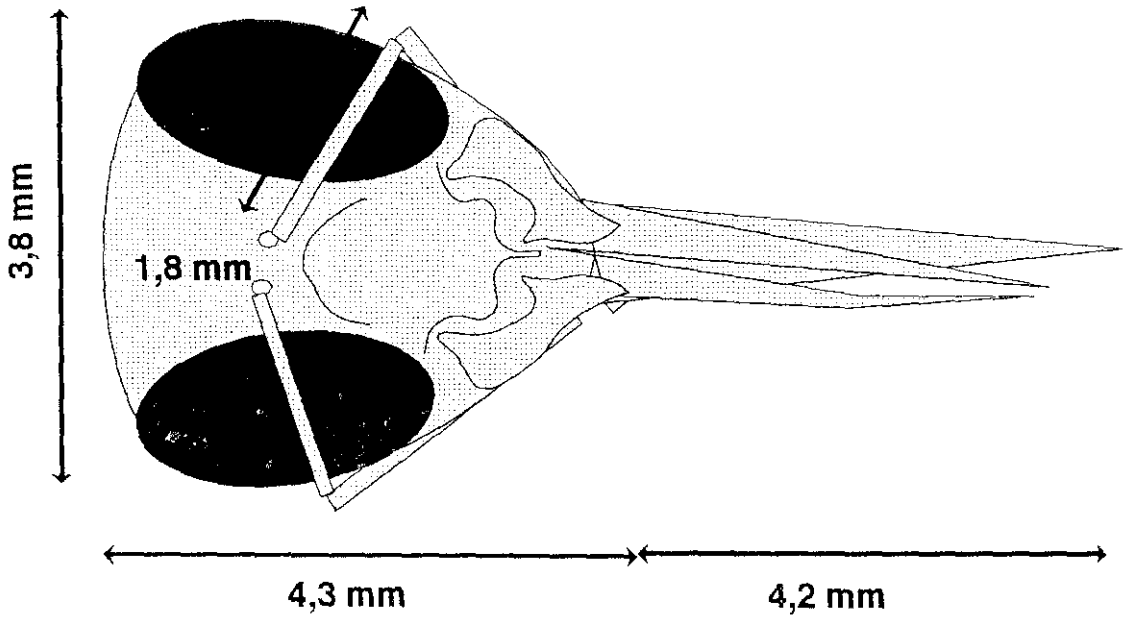
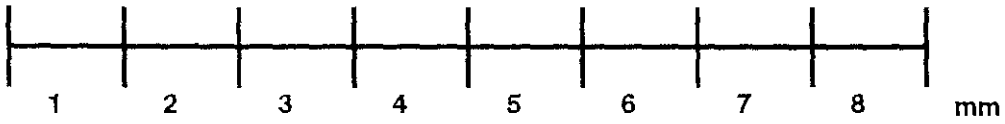
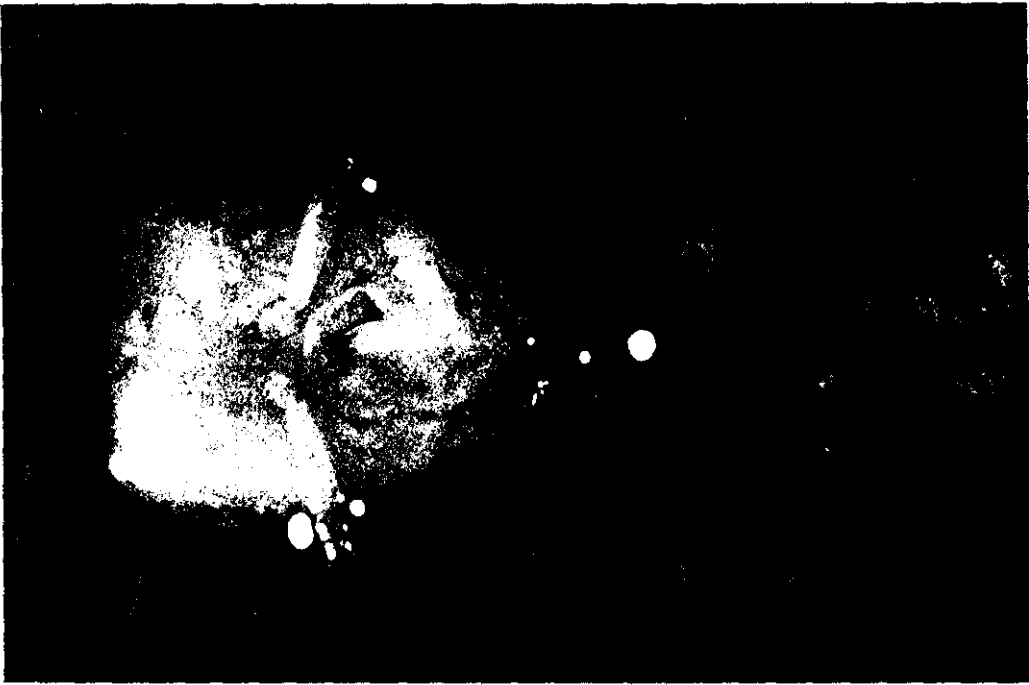
LAMINA 4. PUPA DE 144 HORAS



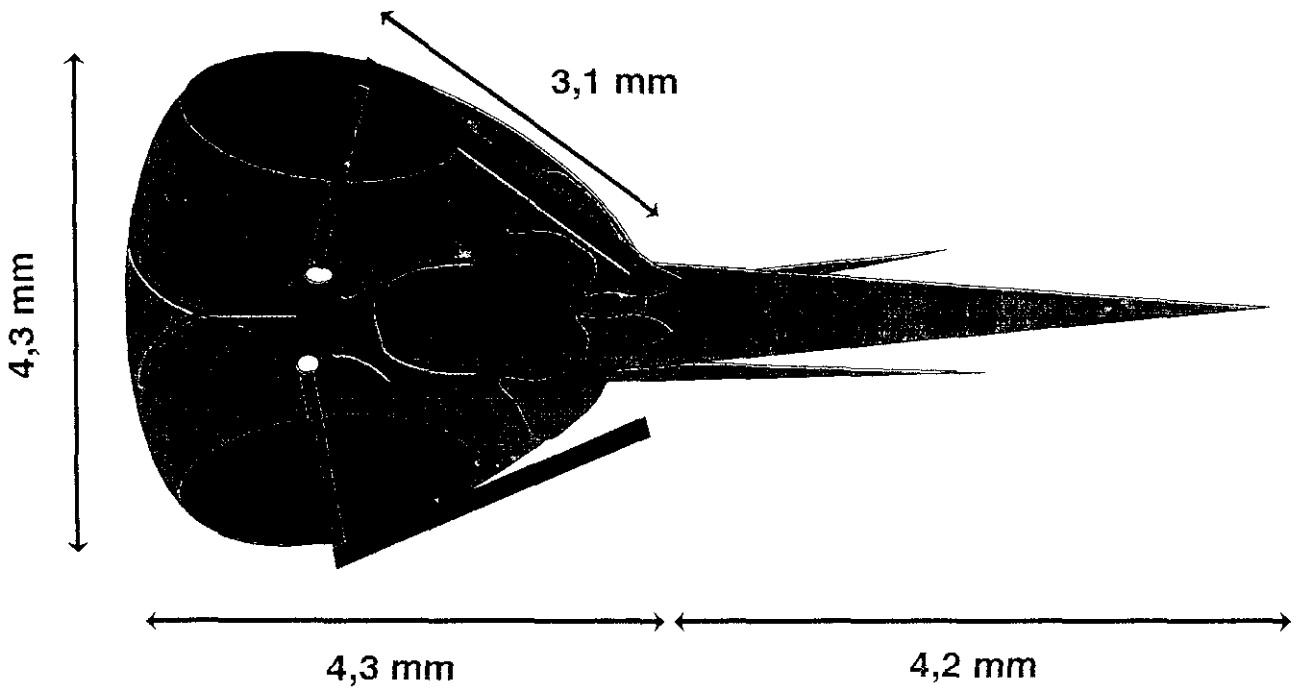
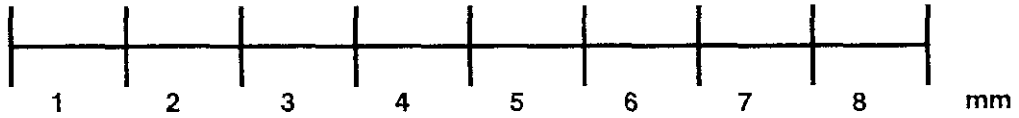
LAMINA 5. PUPA DE 168 HORAS



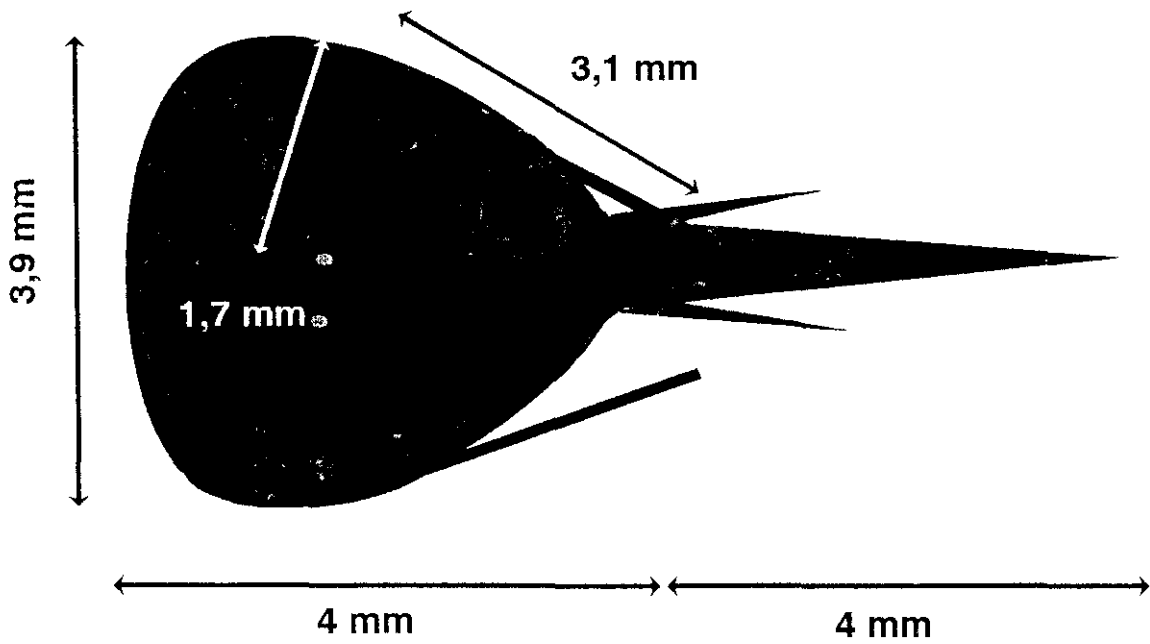
LAMINA 6. PUPA DE 192 HORAS



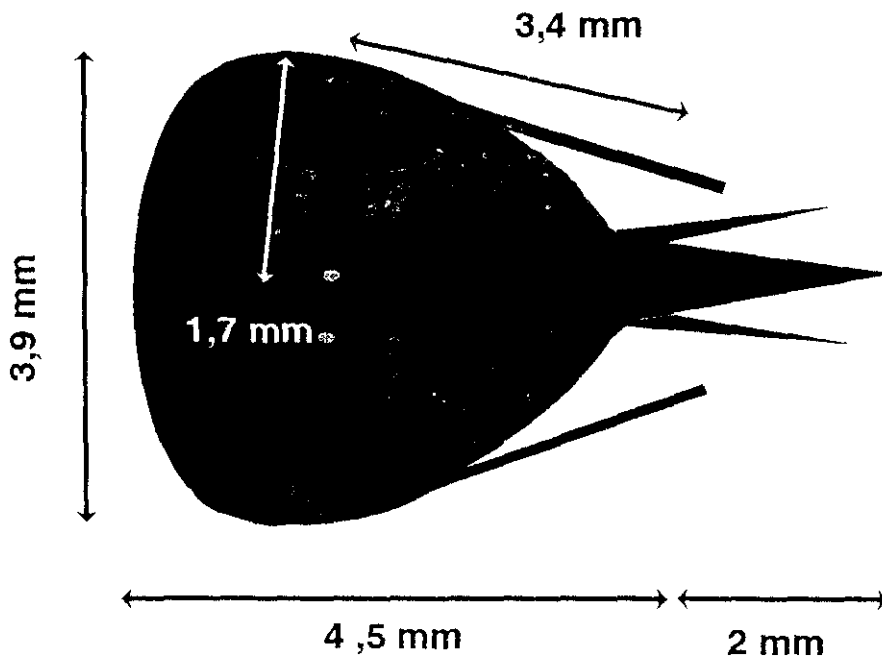
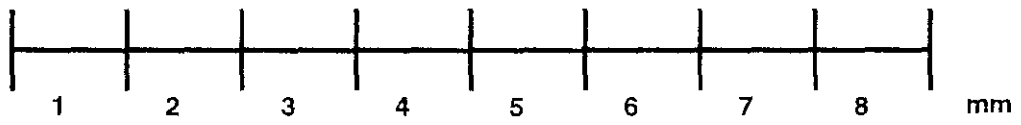
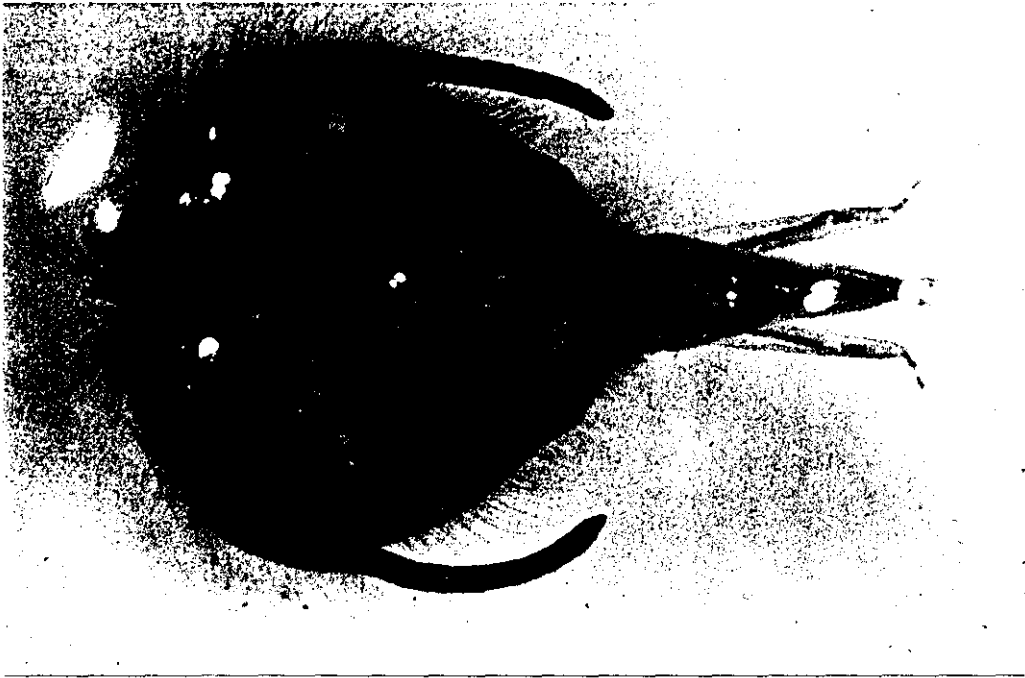
LAMINA 7. PUPA DE 216 HORAS



LAMINA 8. PUPA DE 240 HORAS



LAMINA 9. PUPA DE 264 HORAS



LAMINA 10. IMAGO

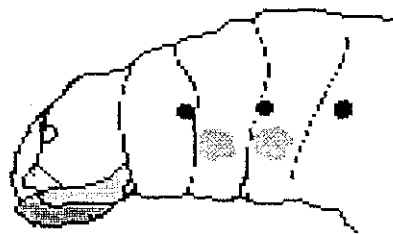
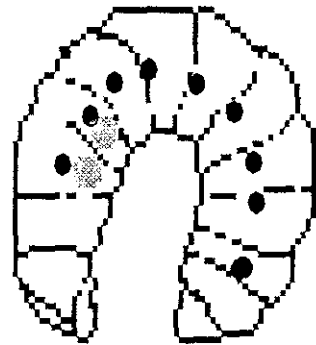
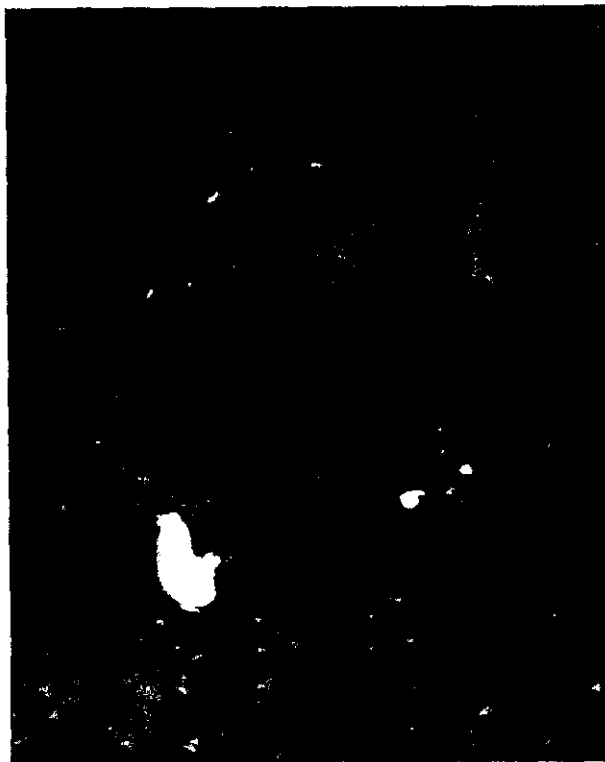
antenas

alas

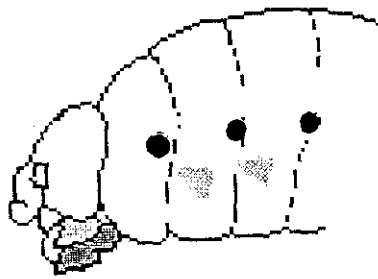
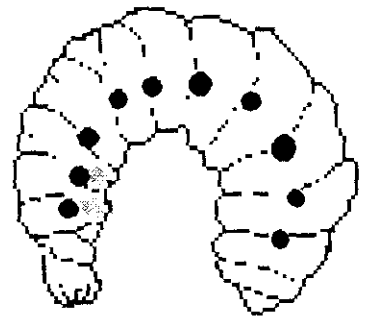
mandíbula

maxila

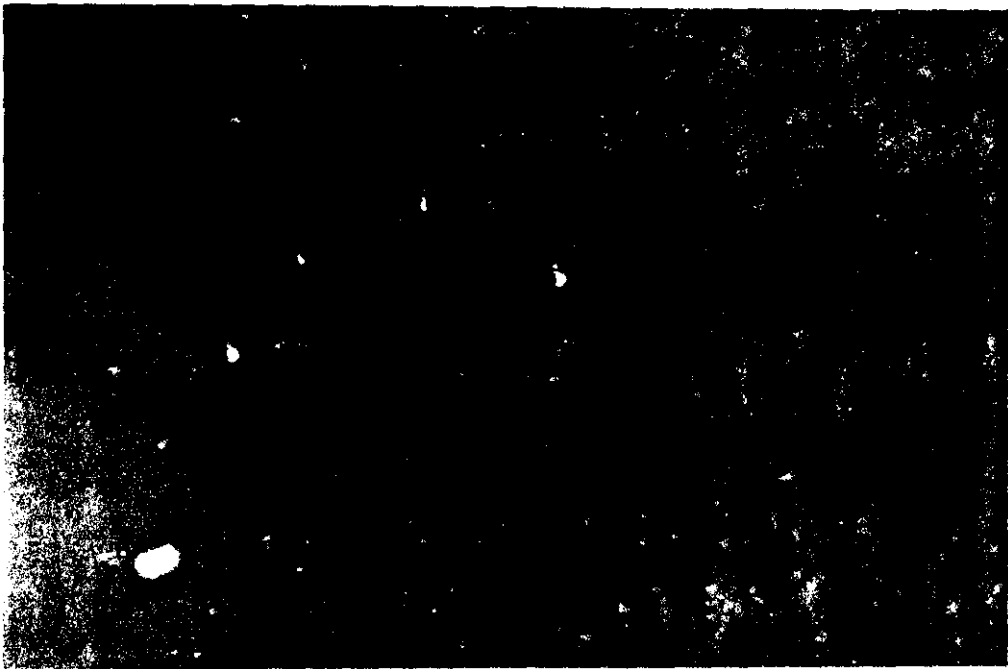
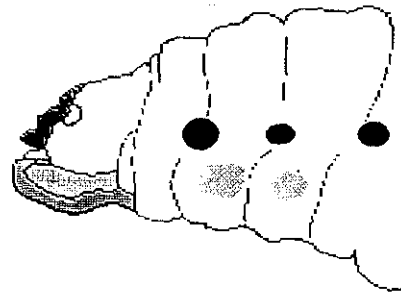
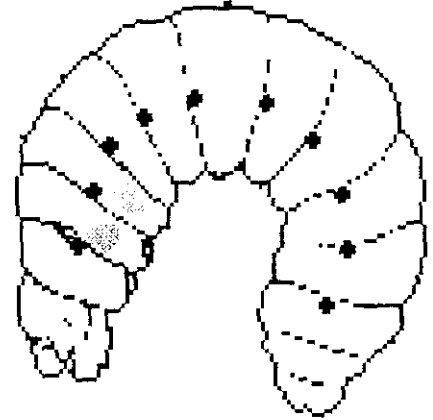
labio



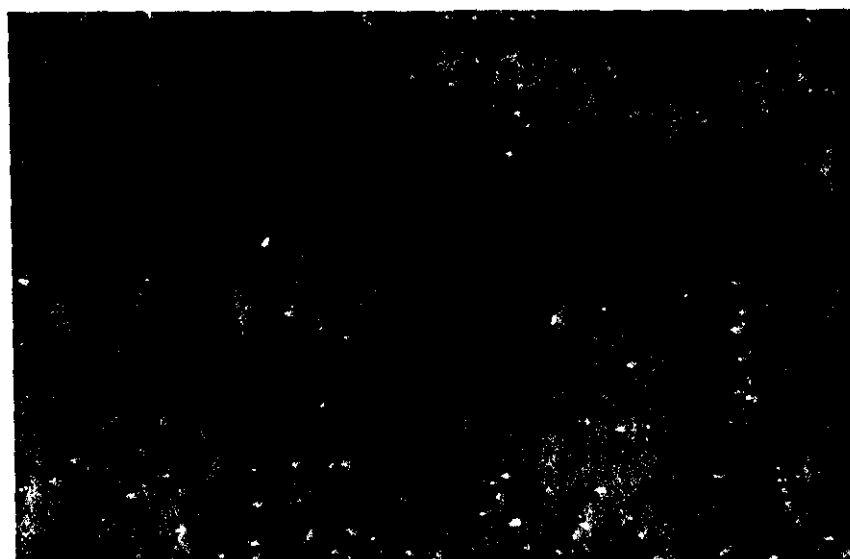
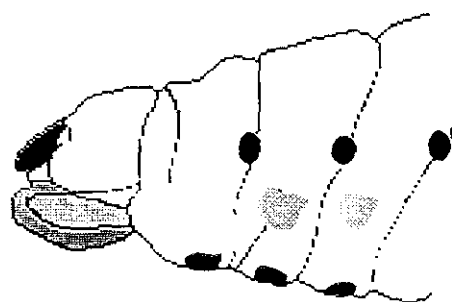
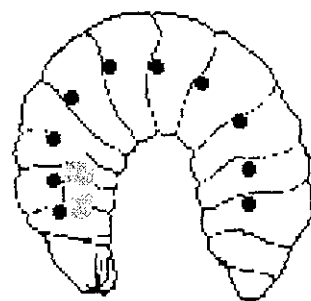
LAMINA 11. LARVA DE 24 HORAS



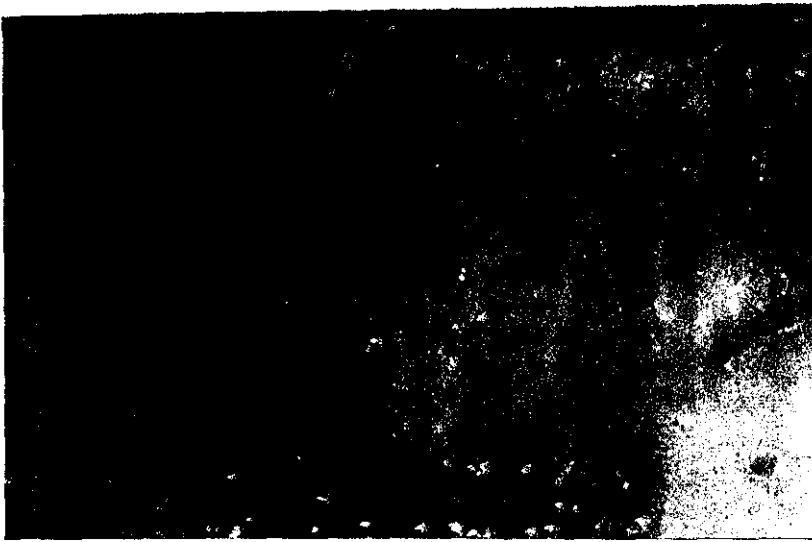
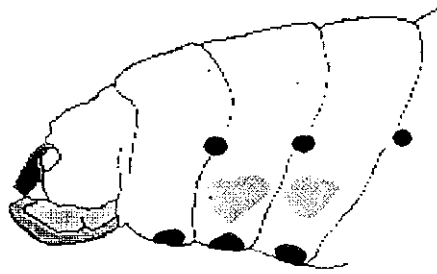
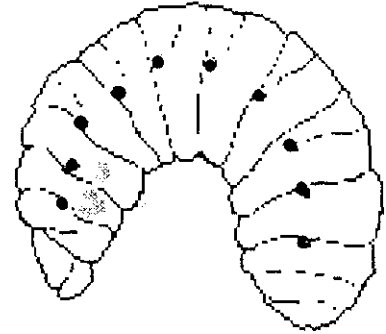
LAMINA 12. LARVA DE 48 HORAS



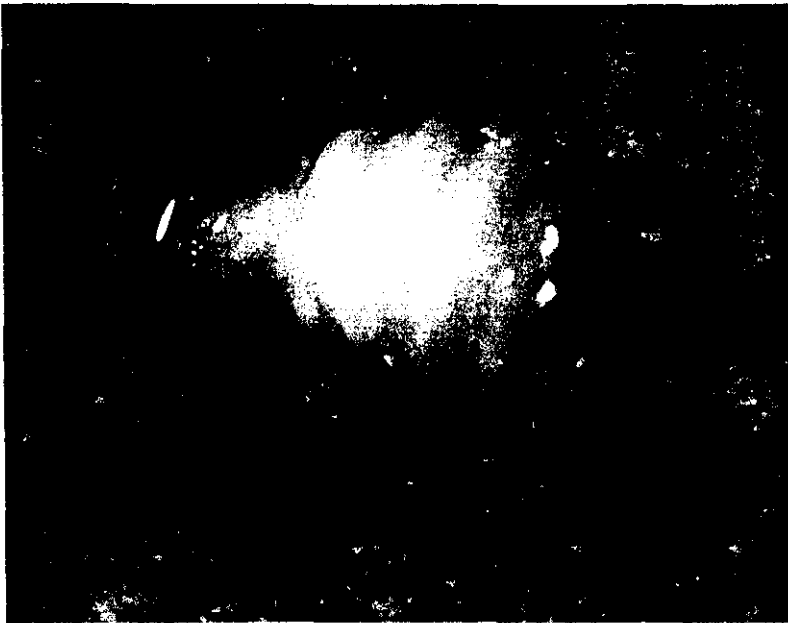
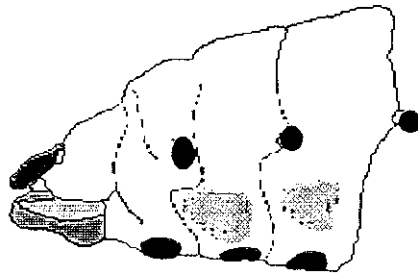
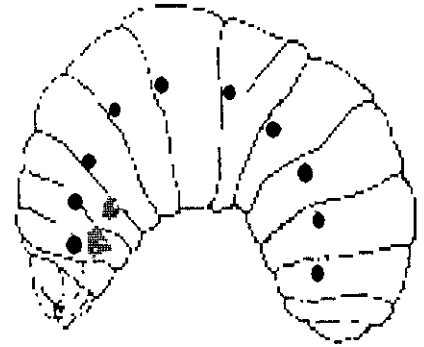
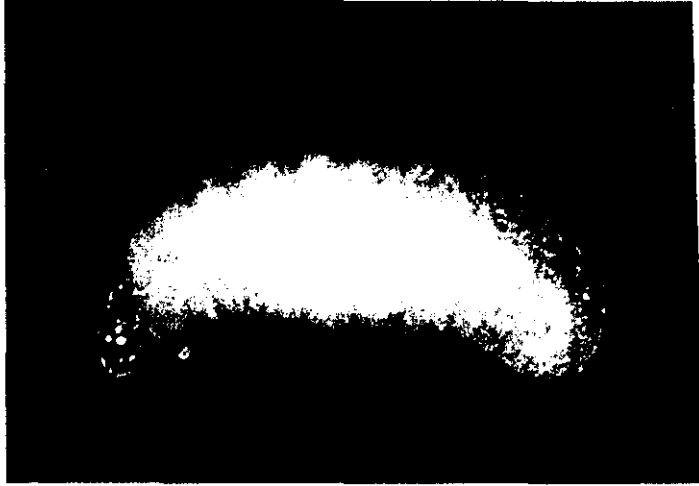
LAMINA 13. LARVA DE 72 HORAS



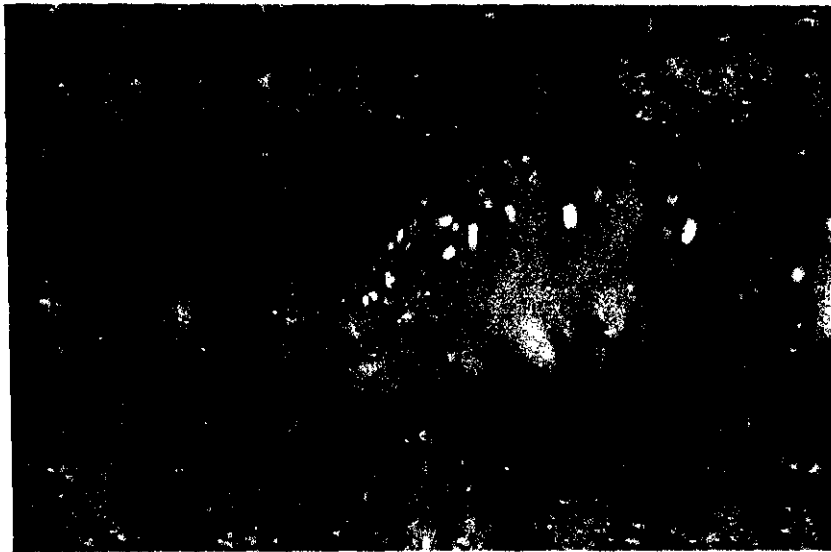
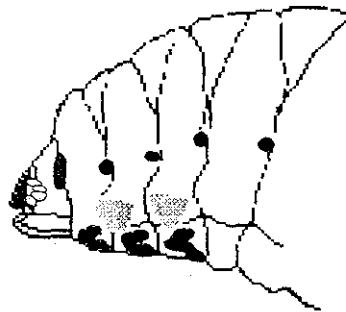
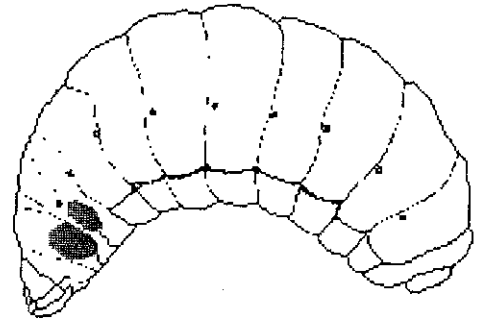
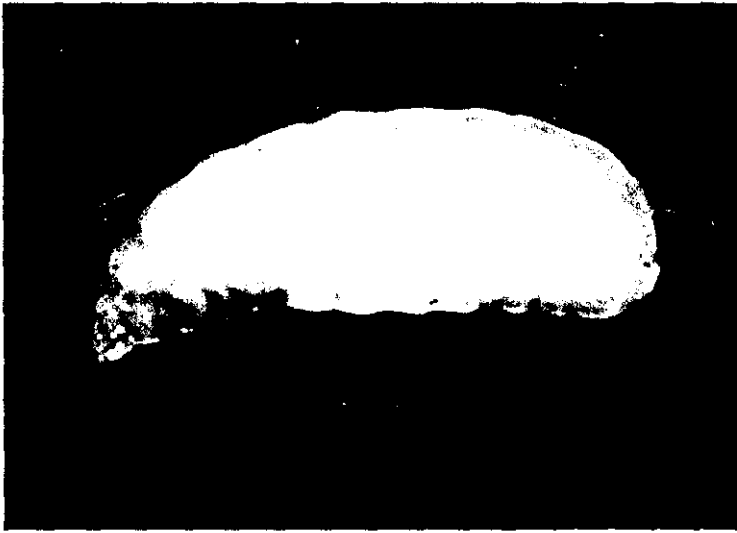
LAMINA 14. LARVA DE 96 HORAS



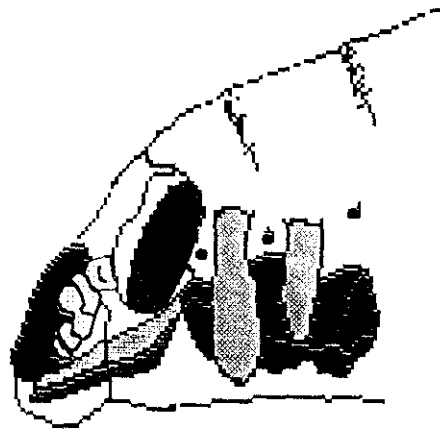
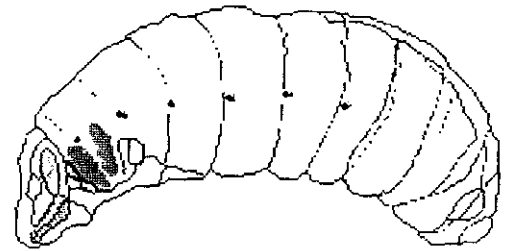
LAMINA 15. LARVA DE 120 HORAS



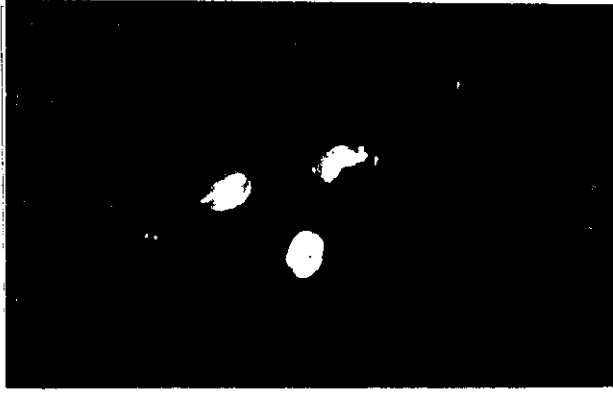
LAMINA 16. LARVA DE 6 HORAS POST-OPERCULACION



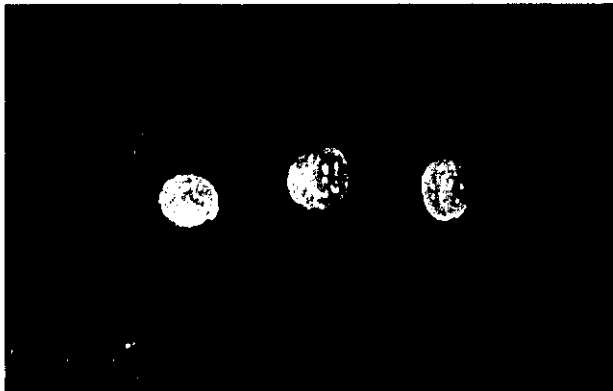
LAMINA 17. LARVA DE 24 HORAS POST-OPERCULACION



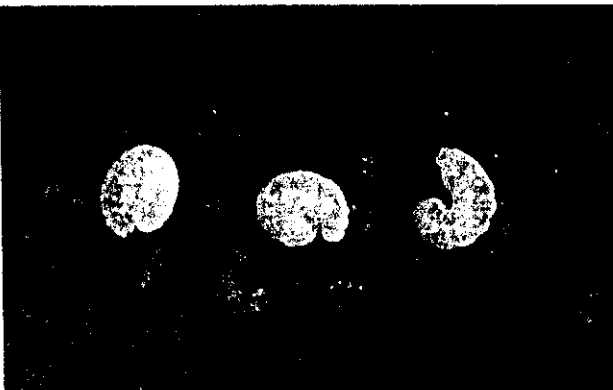
LAMINA 18. LARVA DE 48 HORAS POST-OPERCULACION



L1. 24 HORAS POST-ECLOSION



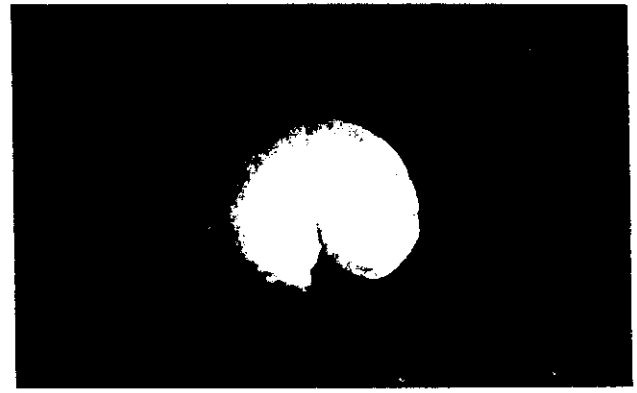
L2. 48 HORAS POST-ECLOSION



L3. 72 HORAS POST-ECLOSION



L4. 96 HORAS POST-ECLOSION



L5. 110 HORAS POST-ECLOSION



L5. 6 HORAS POST-OPERCULACION



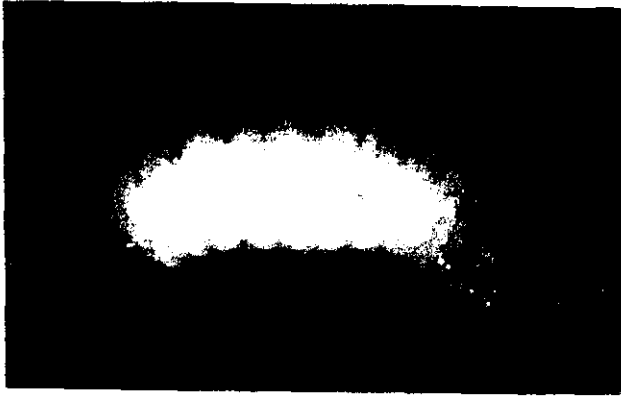
L5. 24 HORAS POST-OPERCULACION



L5. 48 HORAS POST-OPERCULACION

LAMINA 19. LARVAS L1, L2, L3, L4 Y L5

A



patas

alas

cabeza

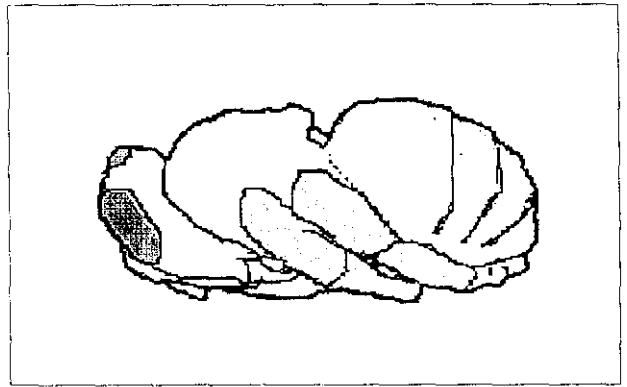
antenas

cuerpo

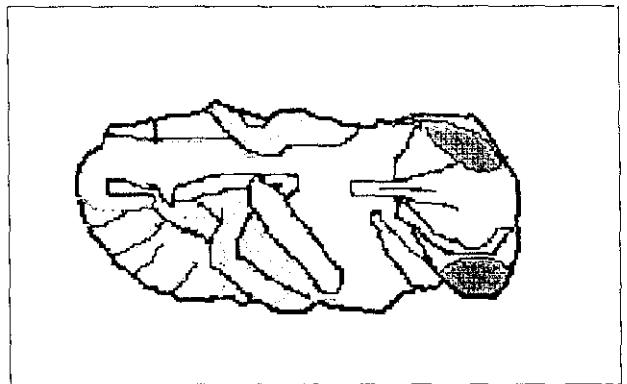
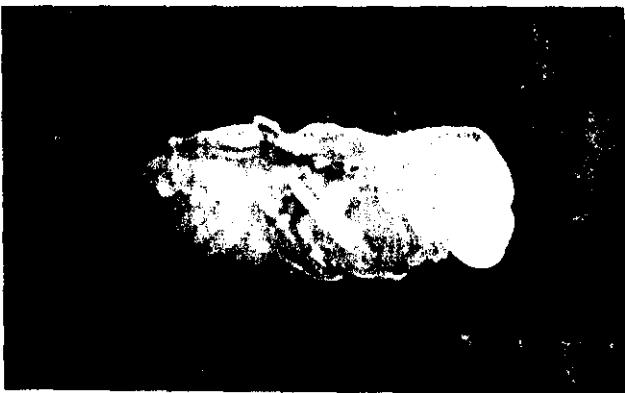


L5. 66 HORAS (POSTOPERCULACION)

B

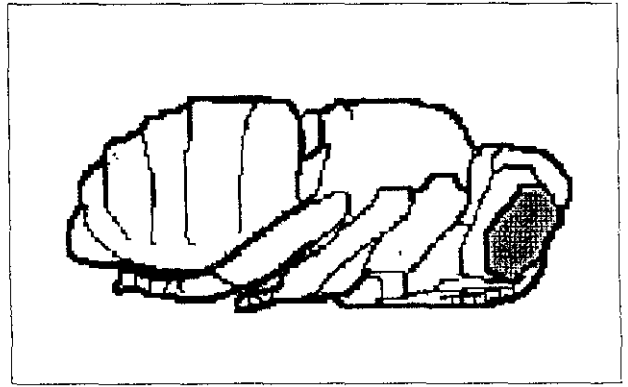


PROYECCION LATERO-LATERAL

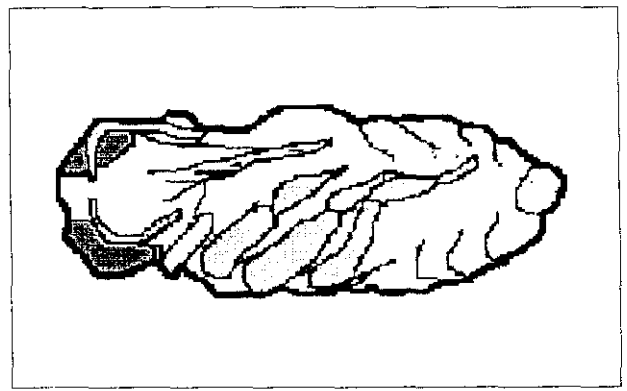


PROYECCION VENTRO-DORSAL

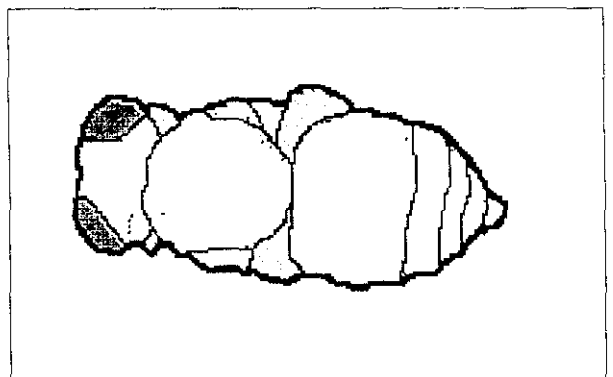
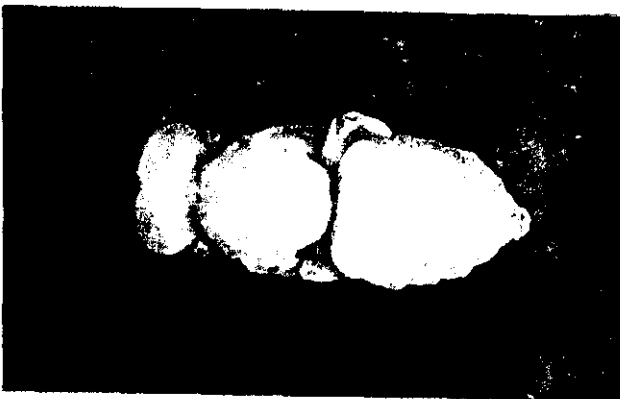
LAMINA 20. A. L5. B. PUPA DE 72 HORAS POST-OPERCULACION



PROYECCION LATERO-LATERAL

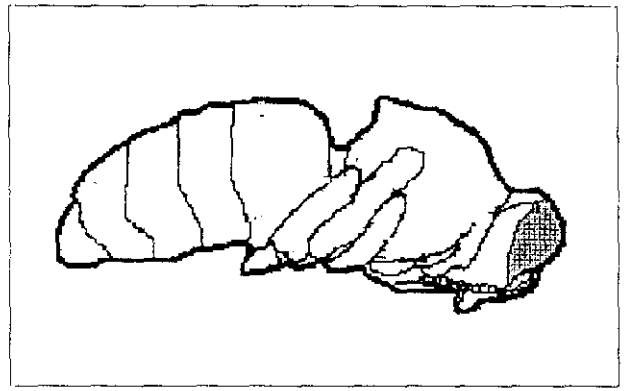


PROYECCION VENTRO-DORSAL

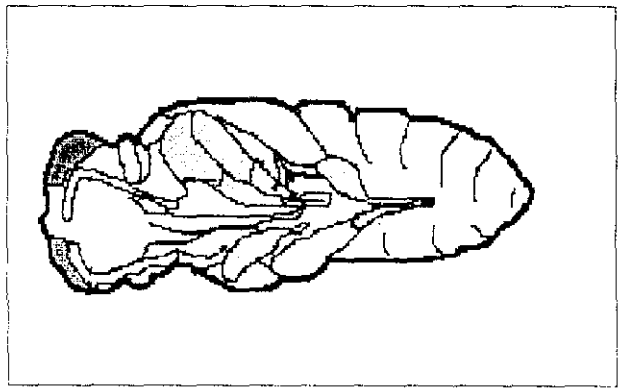


PROYECCION DORSO-VENTRAL

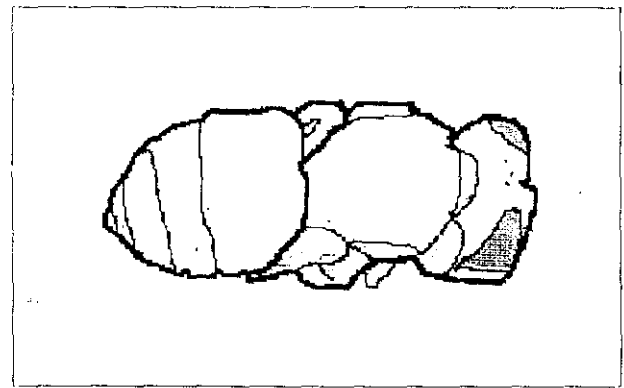
LAMINA 21. PUPA DE 96 HORAS POST-OPERCULACION



PROYECCION LATERO-LATERAL

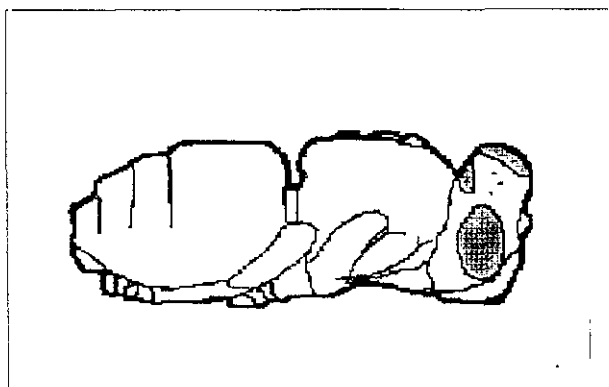
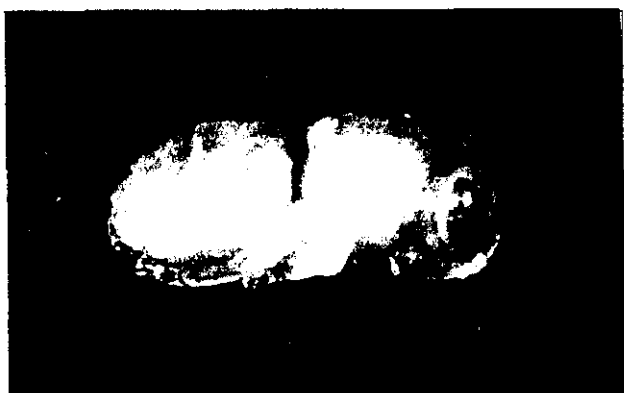


PROYECCION VENTRO-DORSAL

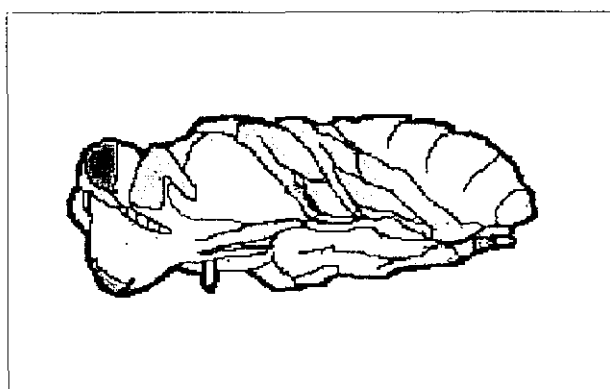
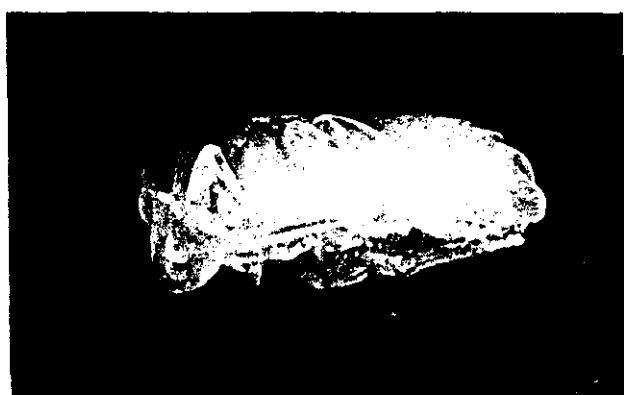


PROYECCION DORSO-VENTRAL

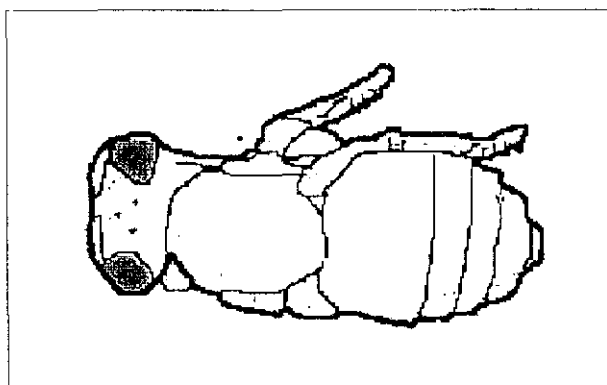
LAMINA 22. PUPA DE 120 HORAS POST-OPERCULARCION



PROYECCION LATERO-LATERAL

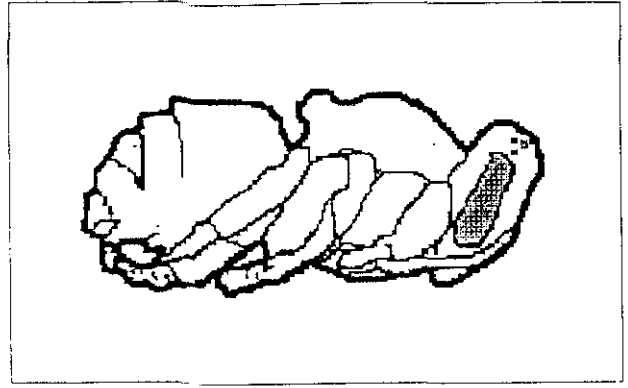


PROYECCION VENTRO-DORSAL

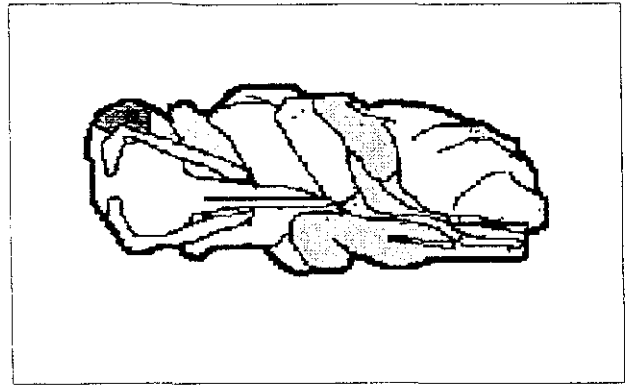


PROYECCION DORSO-VENTRAL

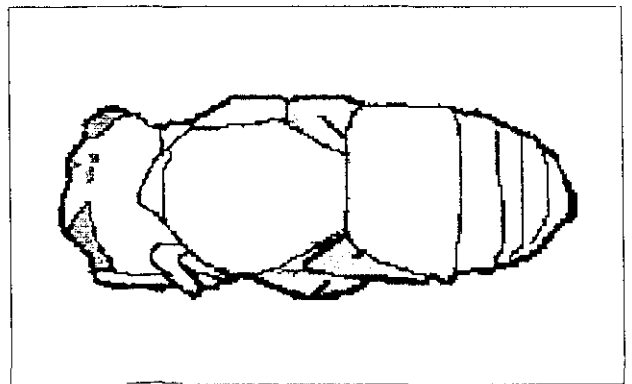
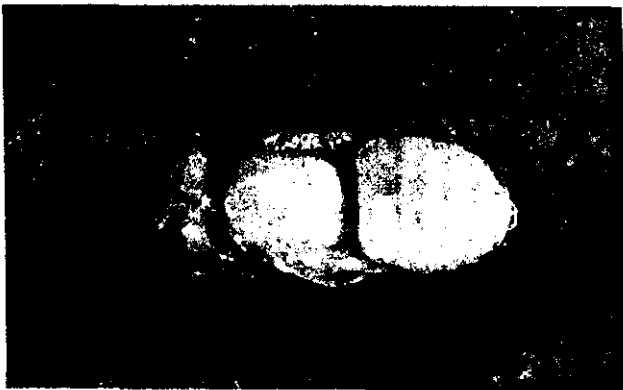
LAMINA 23. PUPA DE 144 HORAS POST-OPERCULACION



PROYECCION LATERO-LATERAL

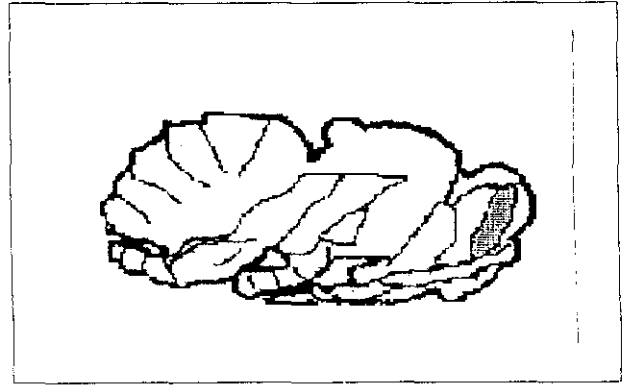


PROYECCION VENTRO-DORSAL

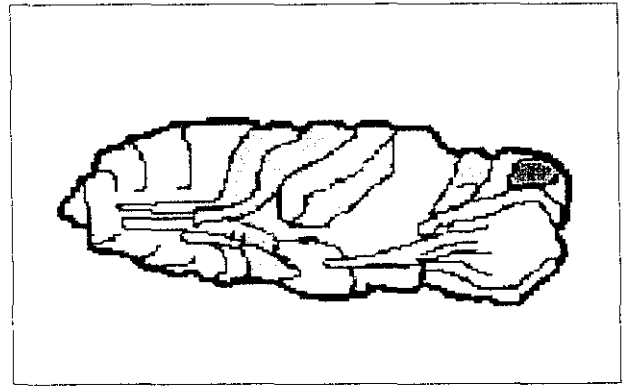


PROYECCION DORSO-VENTRAL

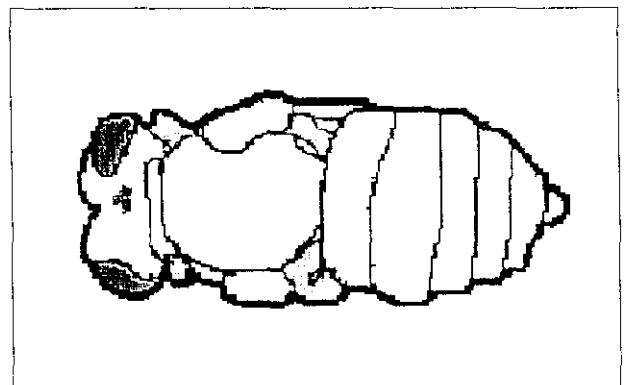
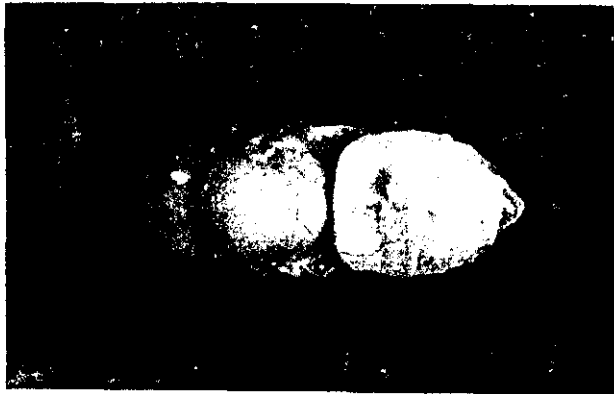
LAMINA 24. PUPA DE 168 HORAS POST.OPERCULACION



PROYECCION LATERO-LATERAL

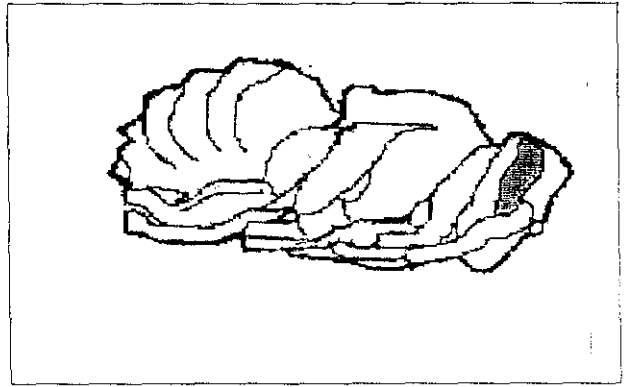


PROYECCION VENTRO-DORSAL

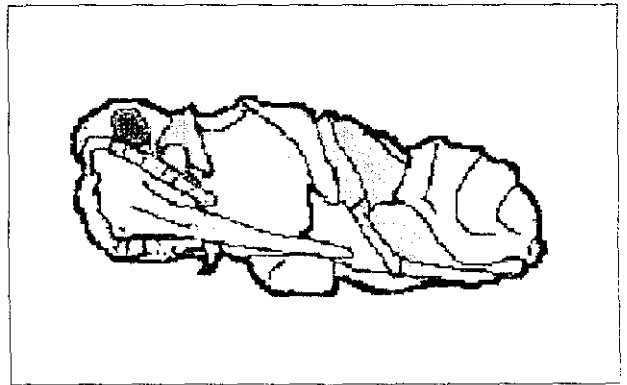
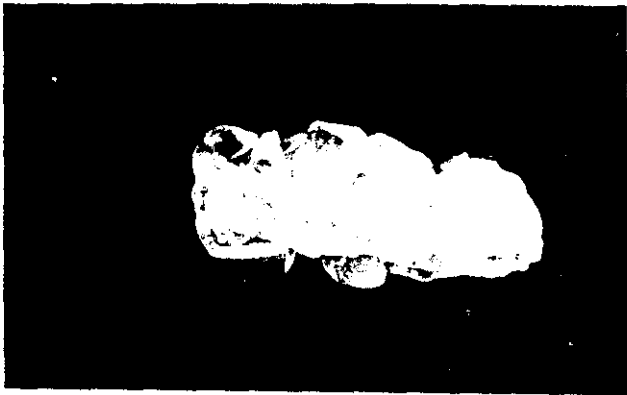


PROYECCION DORSO-VENTRAL

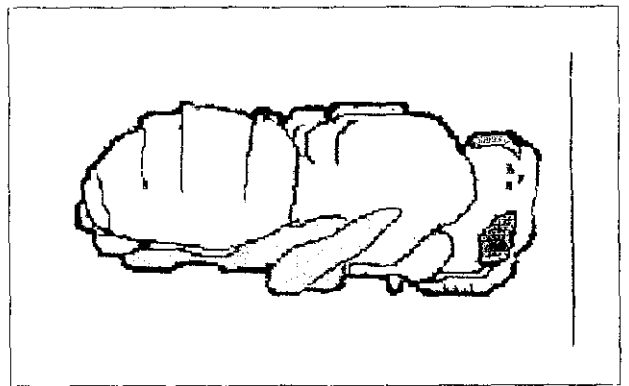
LAMINA 25. PUPA DE 192 HORAS POST-OPERCULACION



PROYECCION LATERO-LATERAL

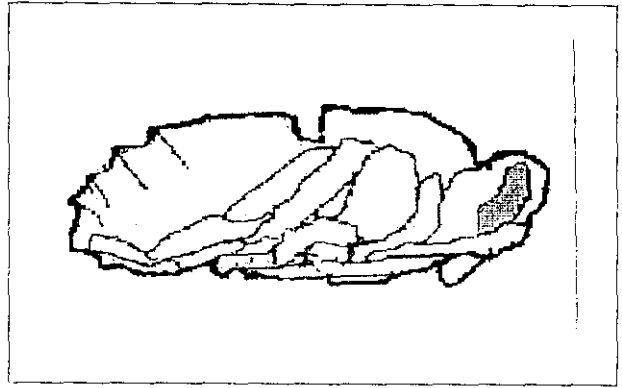


PROYECCION VENTRO-DORSAL

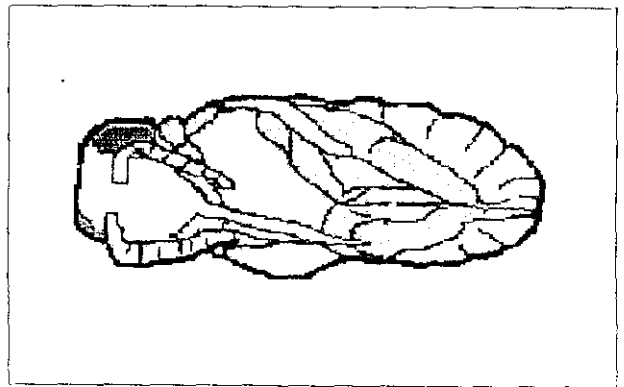


PROYECCION DORSO-VENTRAL

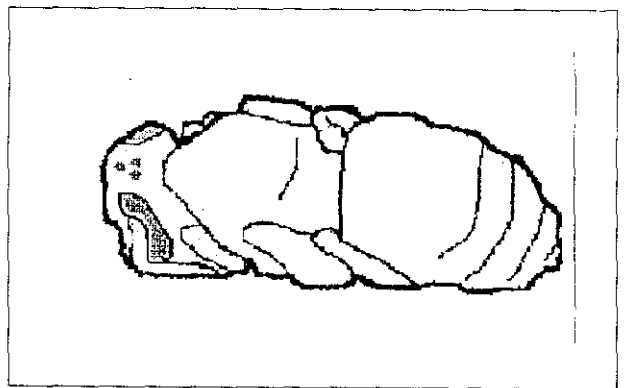
LAMINA 26 PUPA DE 216 HORAS POST-OPERCULACION



PROYECCION LATERO-LATERAL

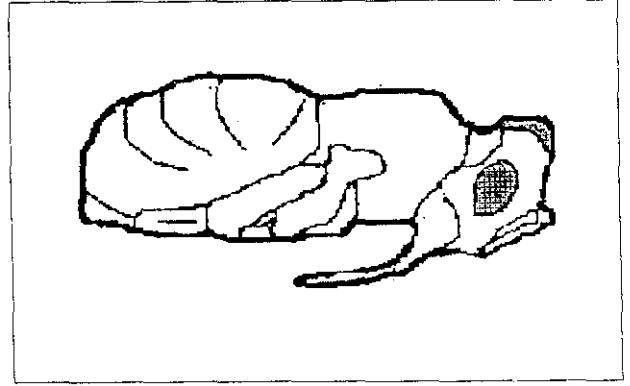


PROYECCION VENTRO-DORSAL

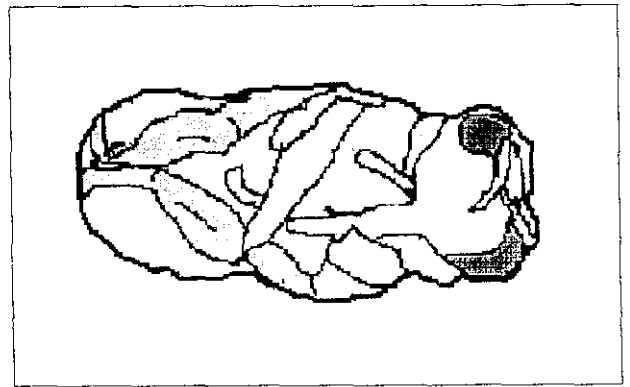


PROYECCION DORSO-VENTRAL

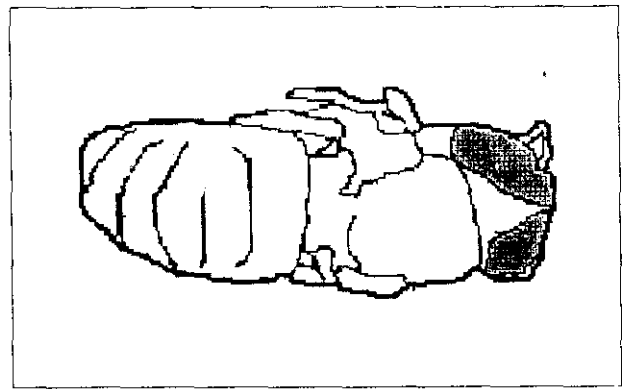
LAMINA 27. PUPA DE 240 HORAS POST-OPERCULACION



PROYECCION LATERO-LATERAL

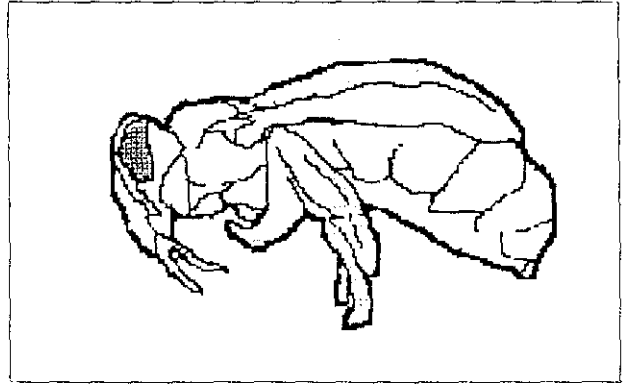


PROYECCION VENTRO-DORSAL

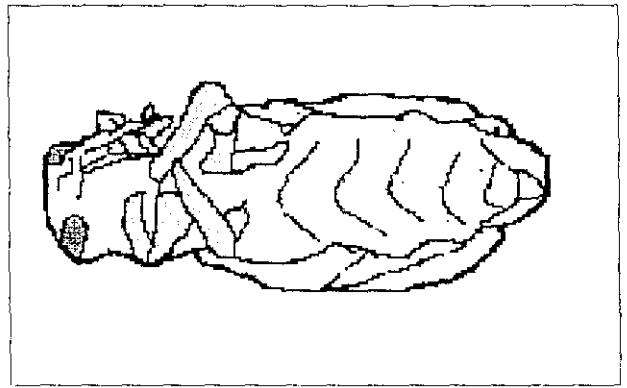
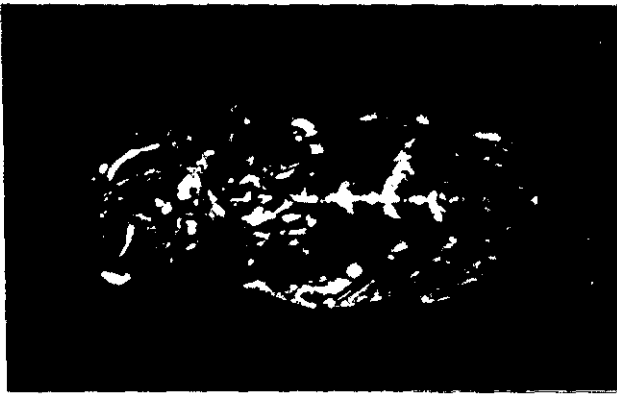


PROYECCION DORSO-VENTRAL

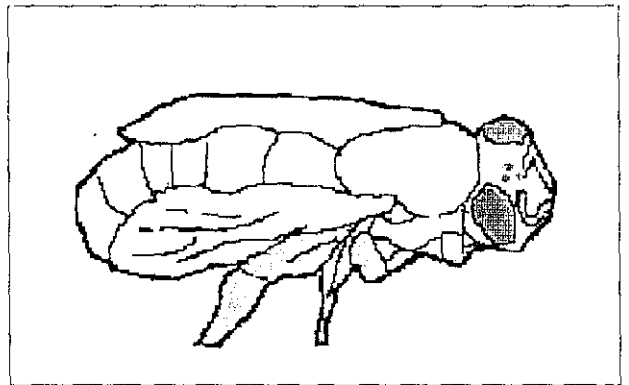
LAMINA 28. PUPA DE 264 HORAS POST-OPERCULACION



PROYECCION LATERO-LATERAL

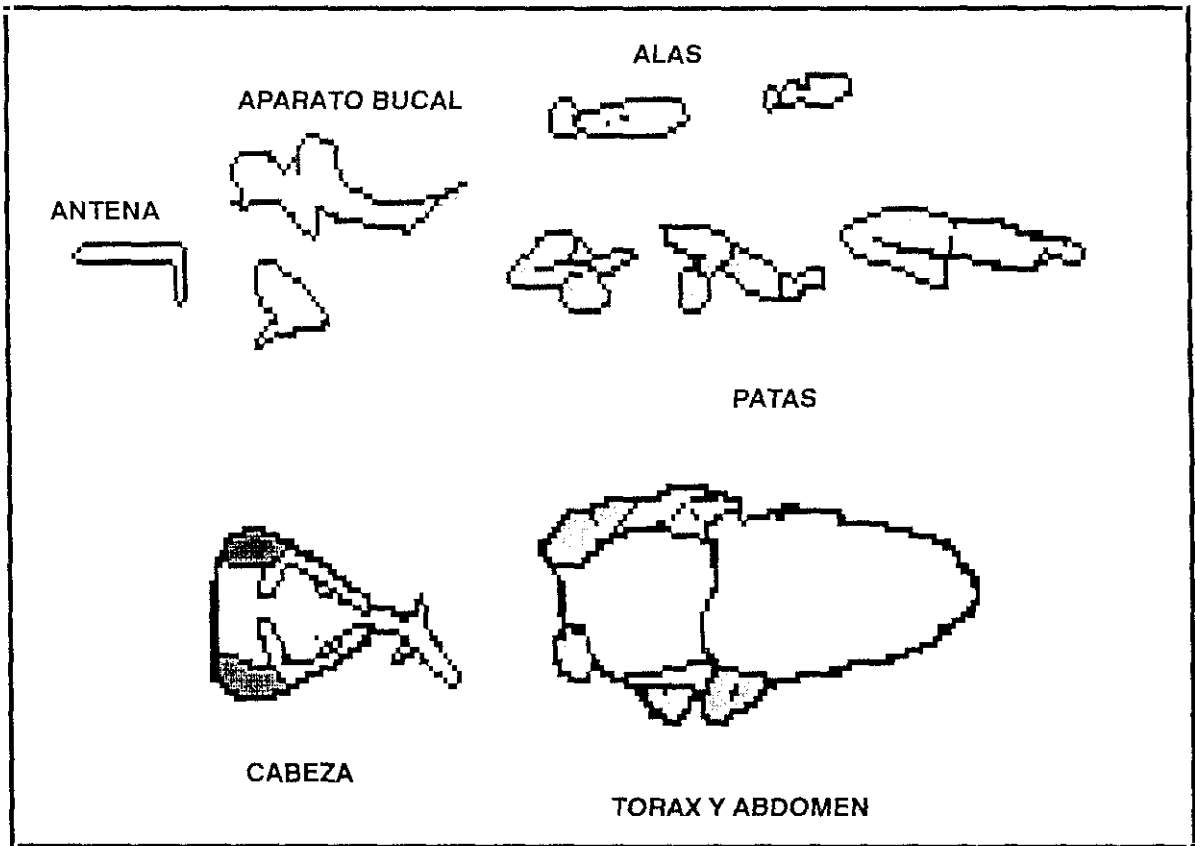
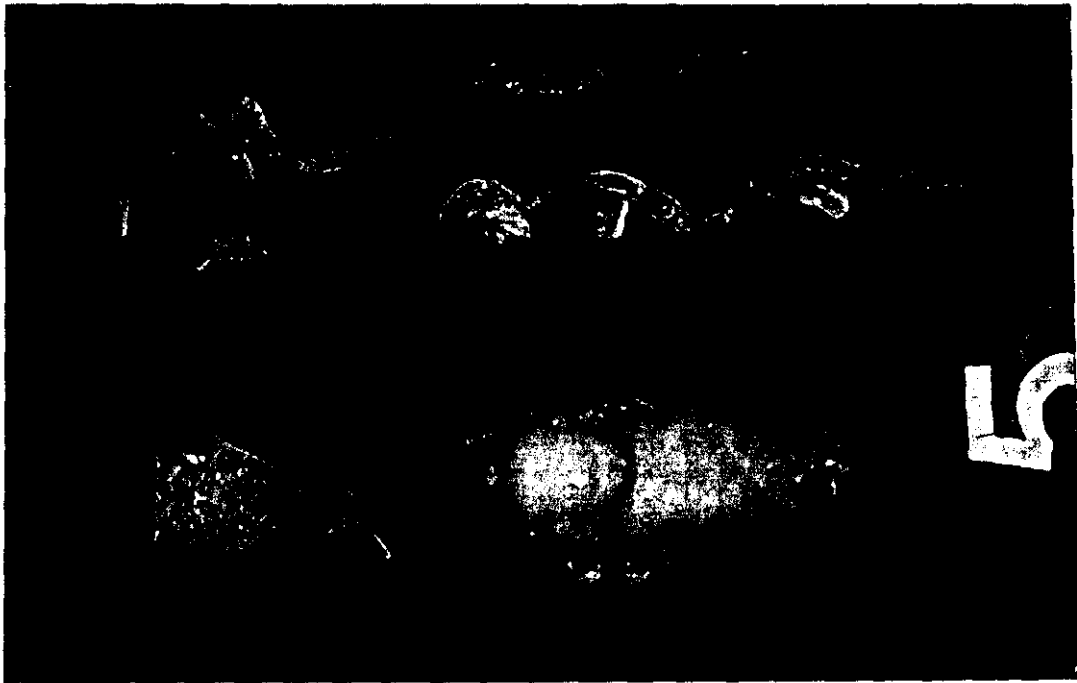


PROYECCION VENTRO-DORSAL

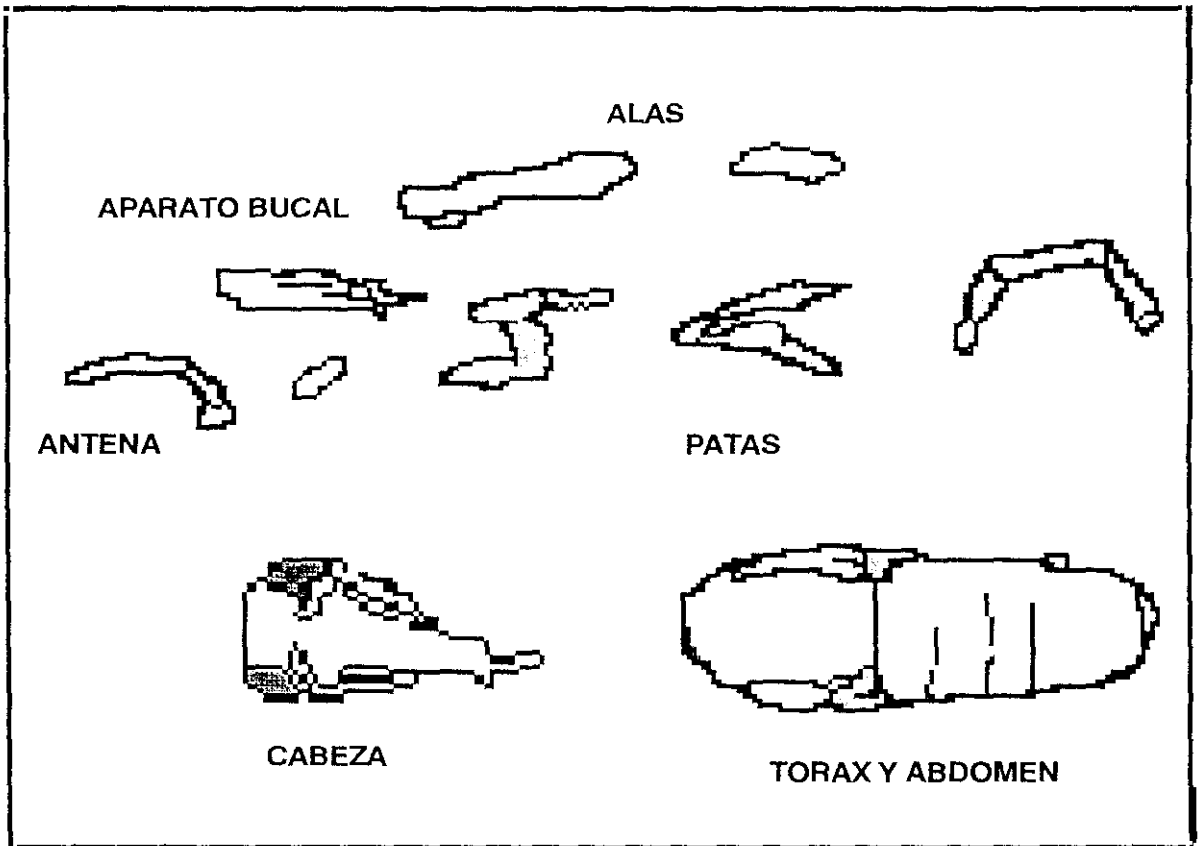


PROYECCION DORSO-VENTRAL

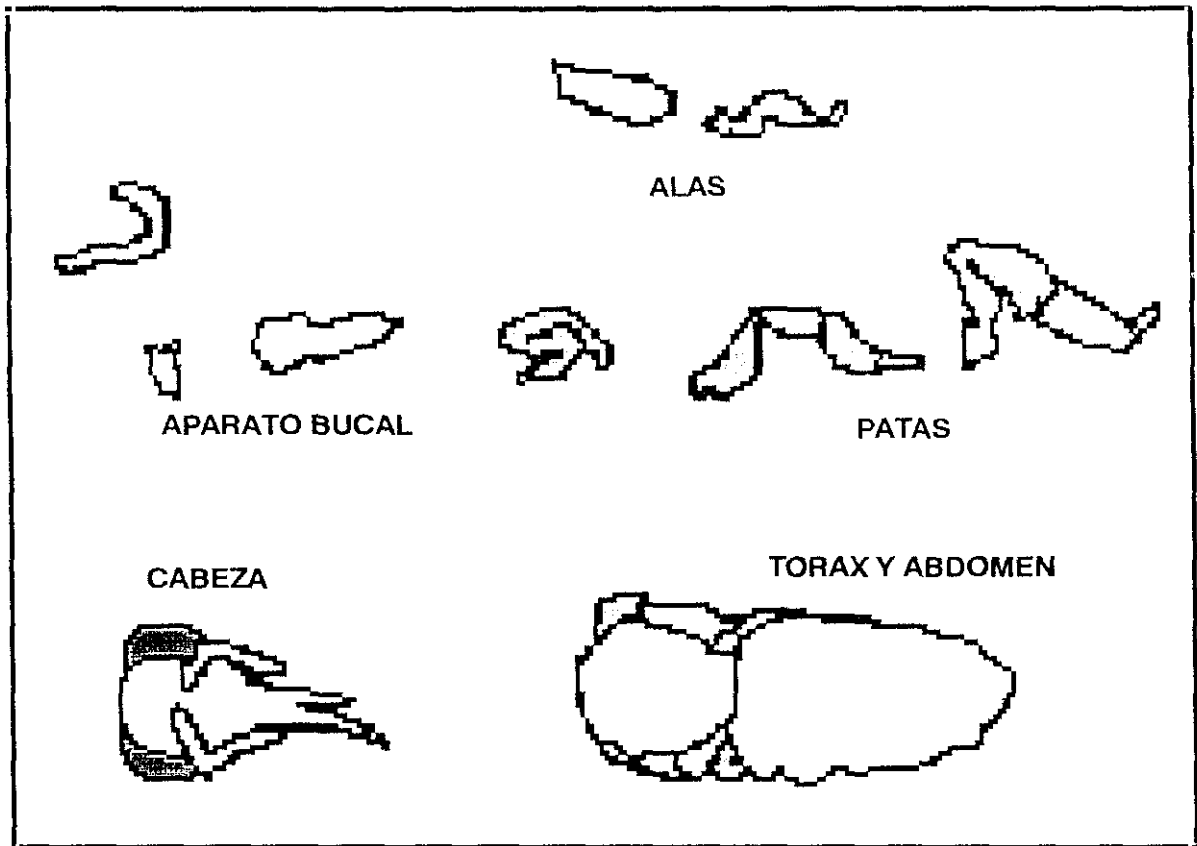
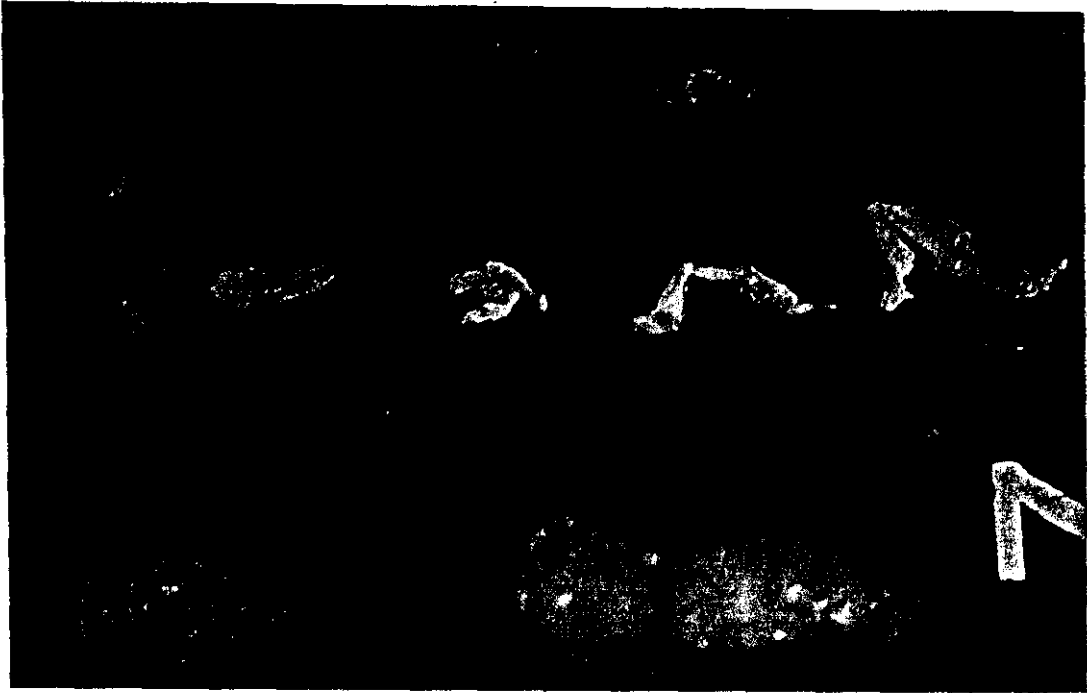
LAMINA 29. PUPA DE 288 HORAS POST-OPERCULACION



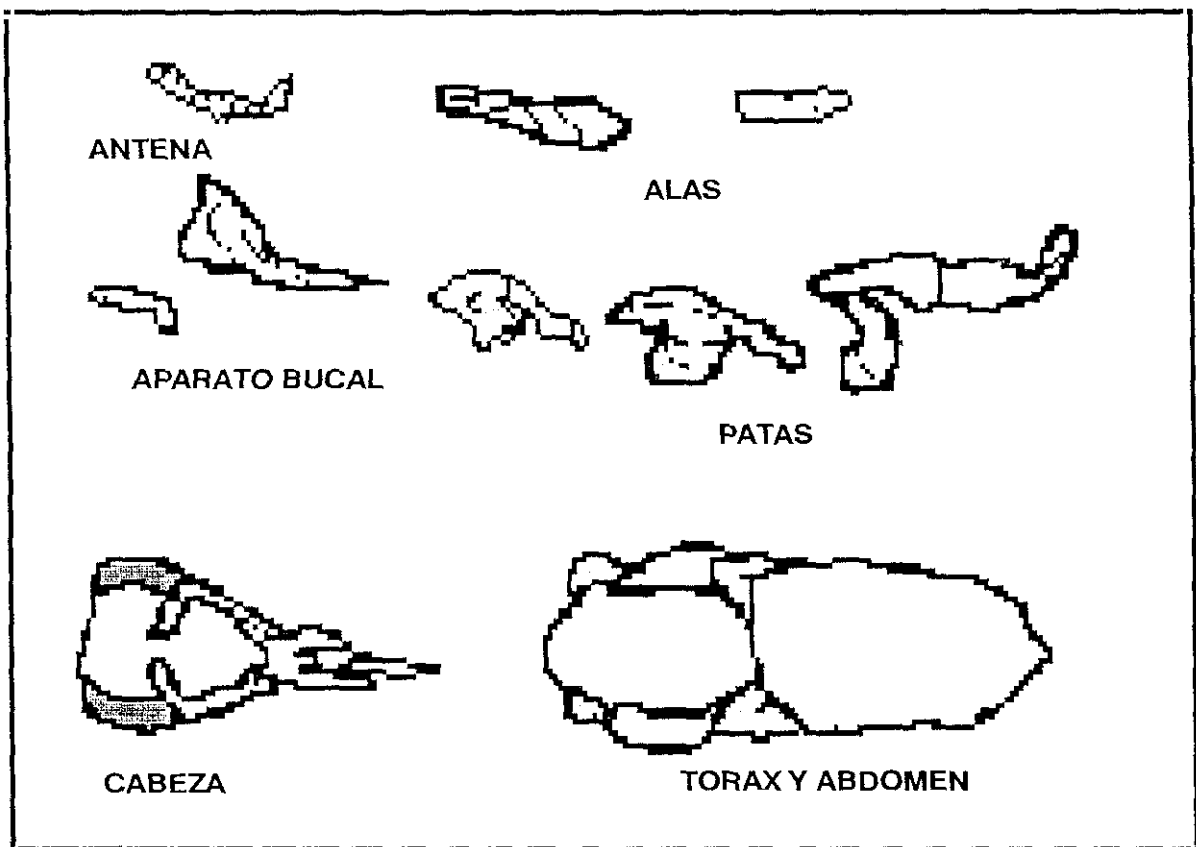
LAMINA 30. PUPA DE 72 HORAS POST-OPERCULACION



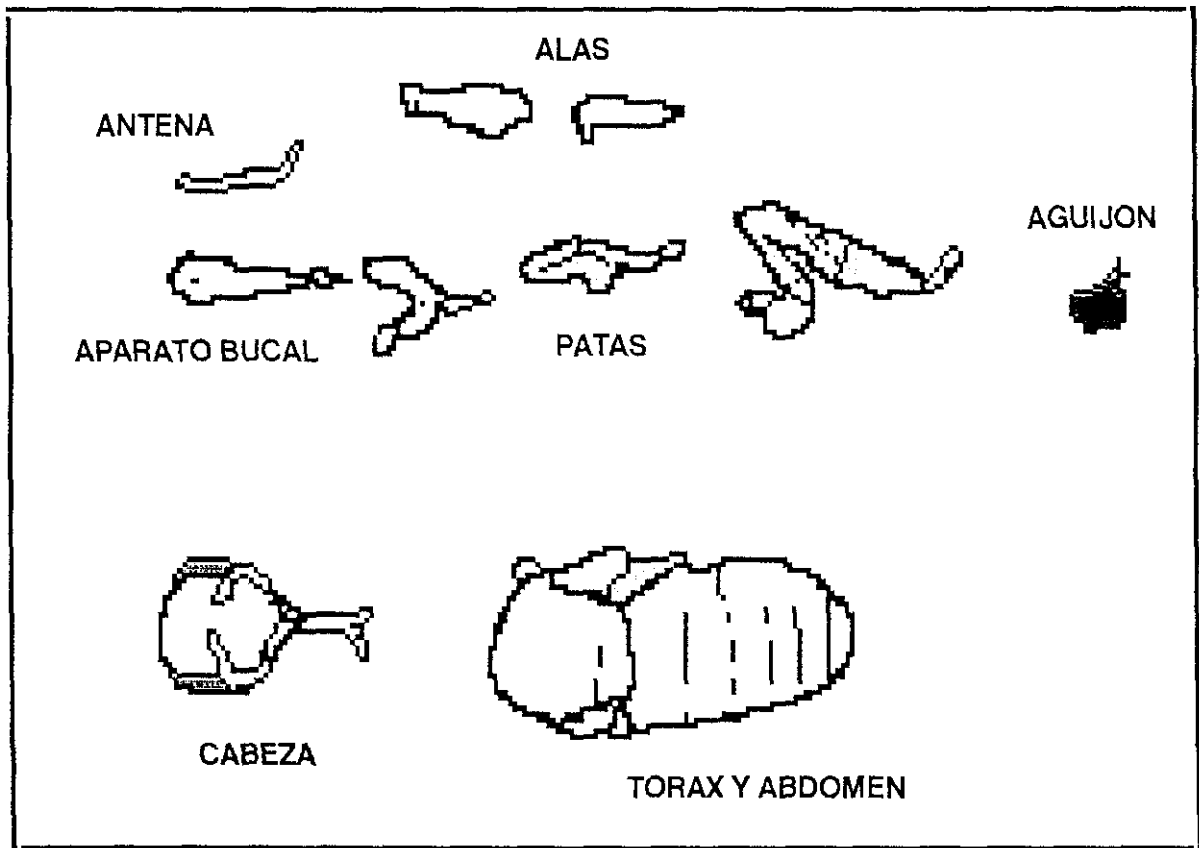
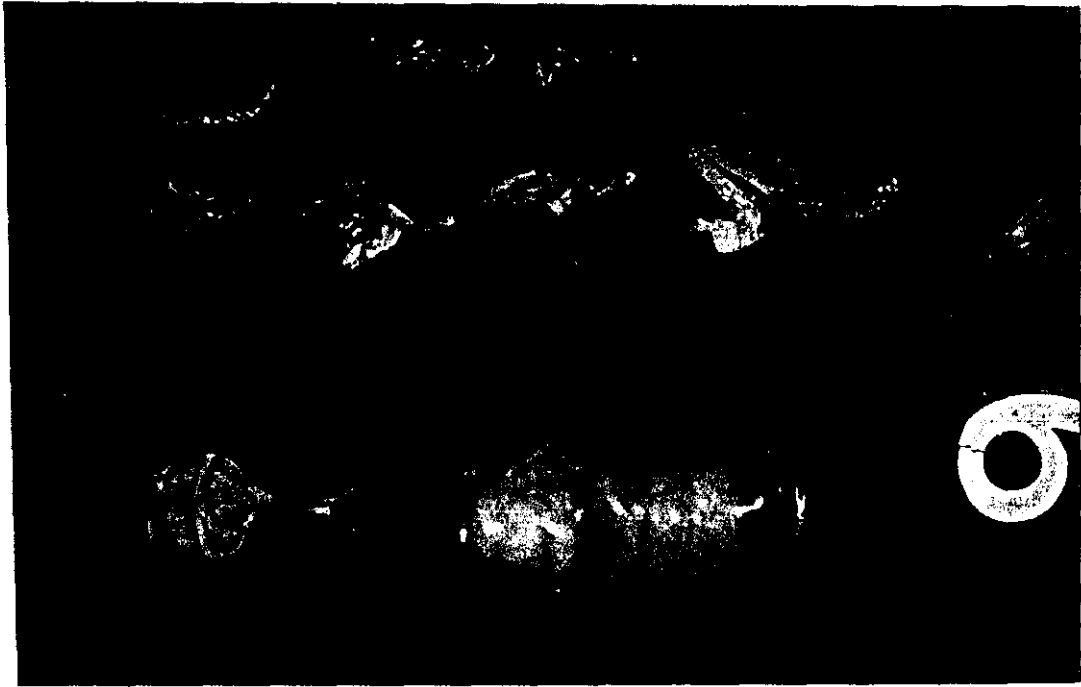
LAMINA 31. PUPA DE 96 HORAS POST-OPERCULACION



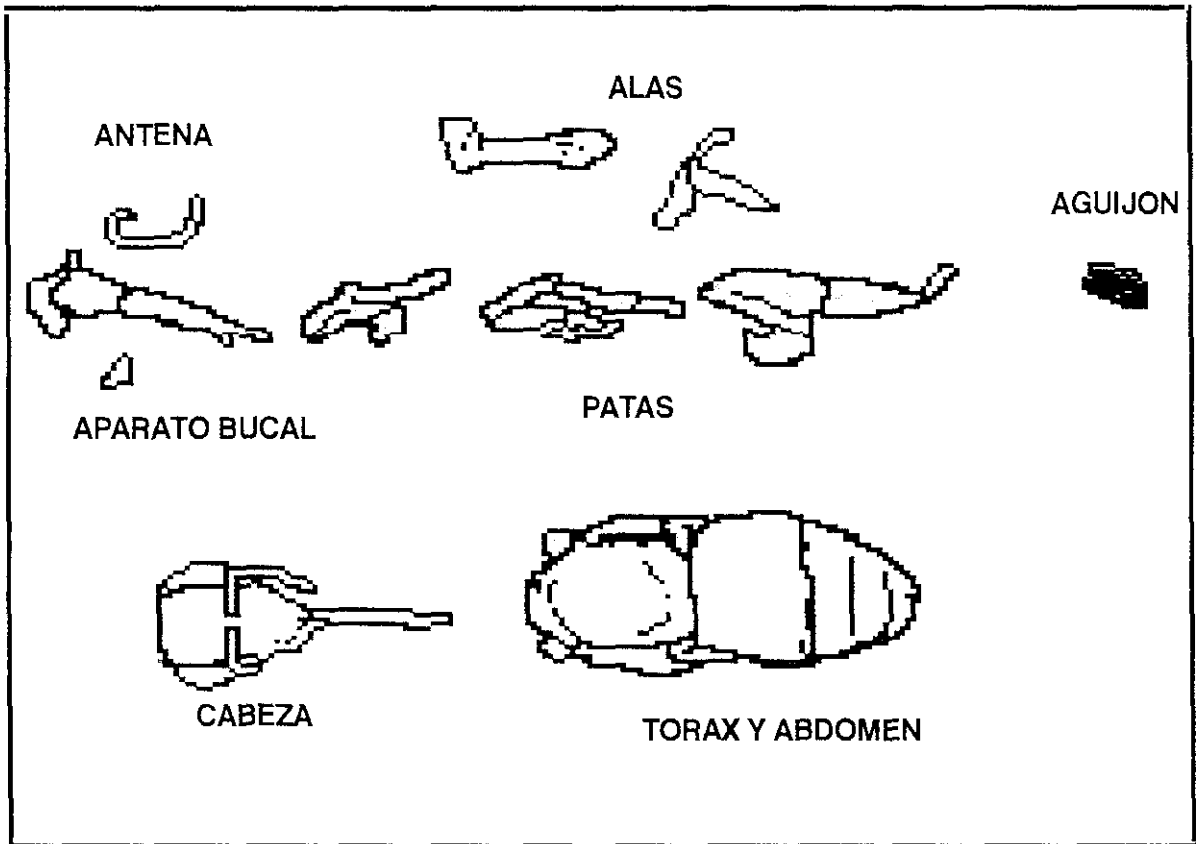
LAMINA 32. PUPA DE 120 HORAS POST-OPERCULACION



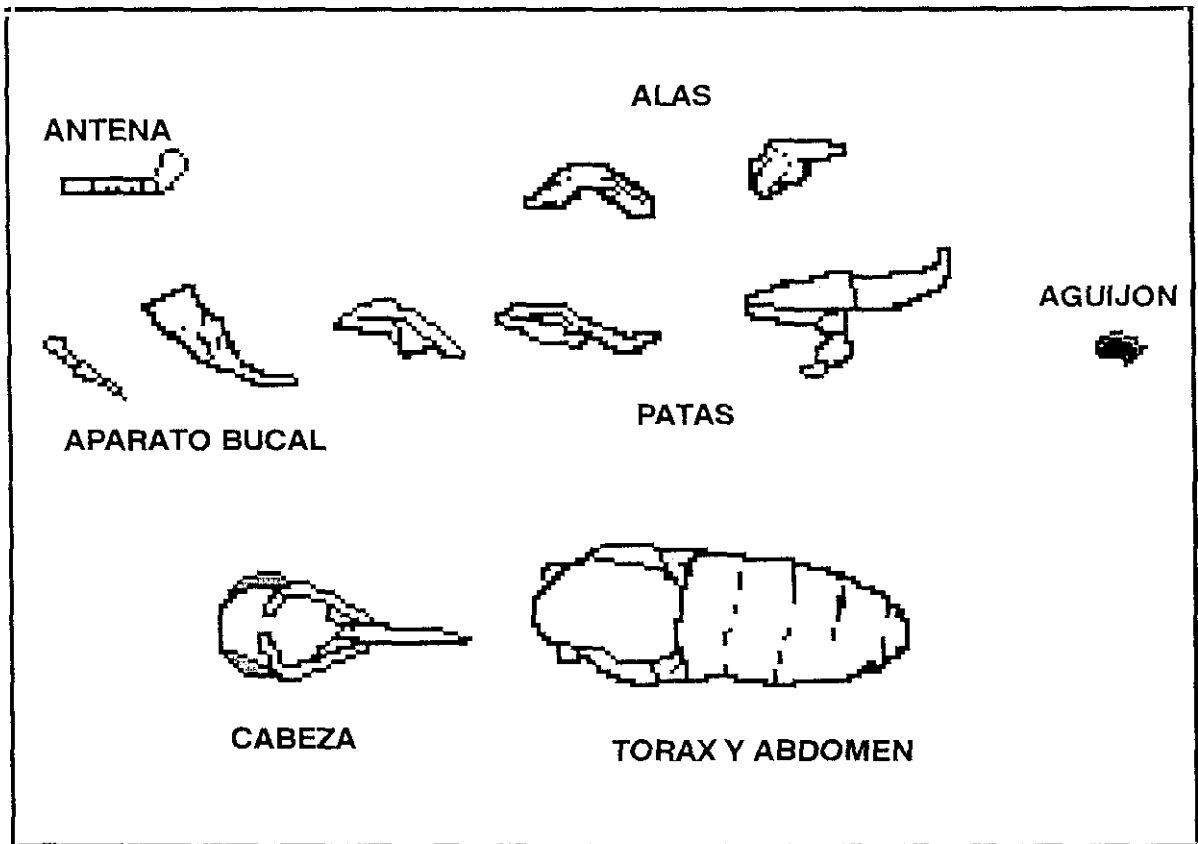
LAMINA 33. PUPA DE 168 HORAS POST-ECLOSION



LAMINA 34. PUPA DE 192 HORAS POST-ECLOSION



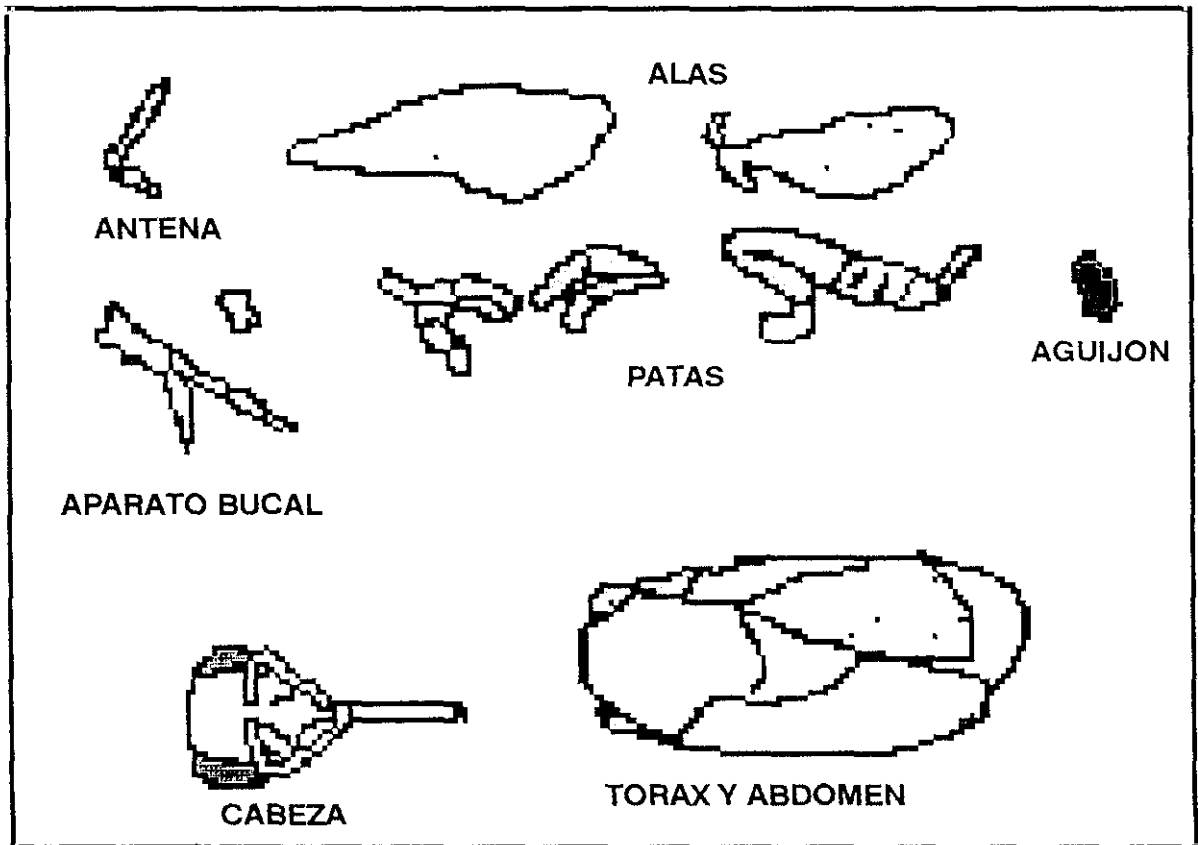
LAMINA 35. PUPA DE 216 HORAS POST-OPERCULACION



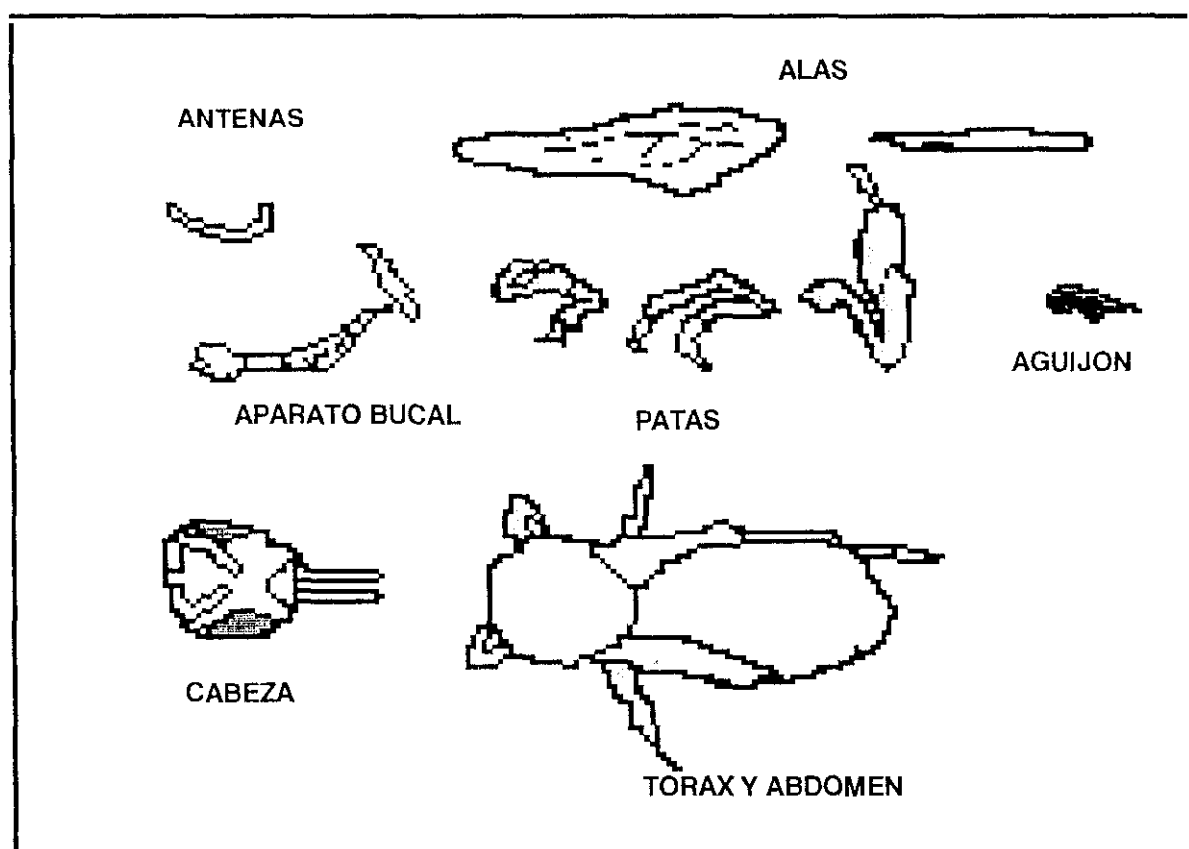
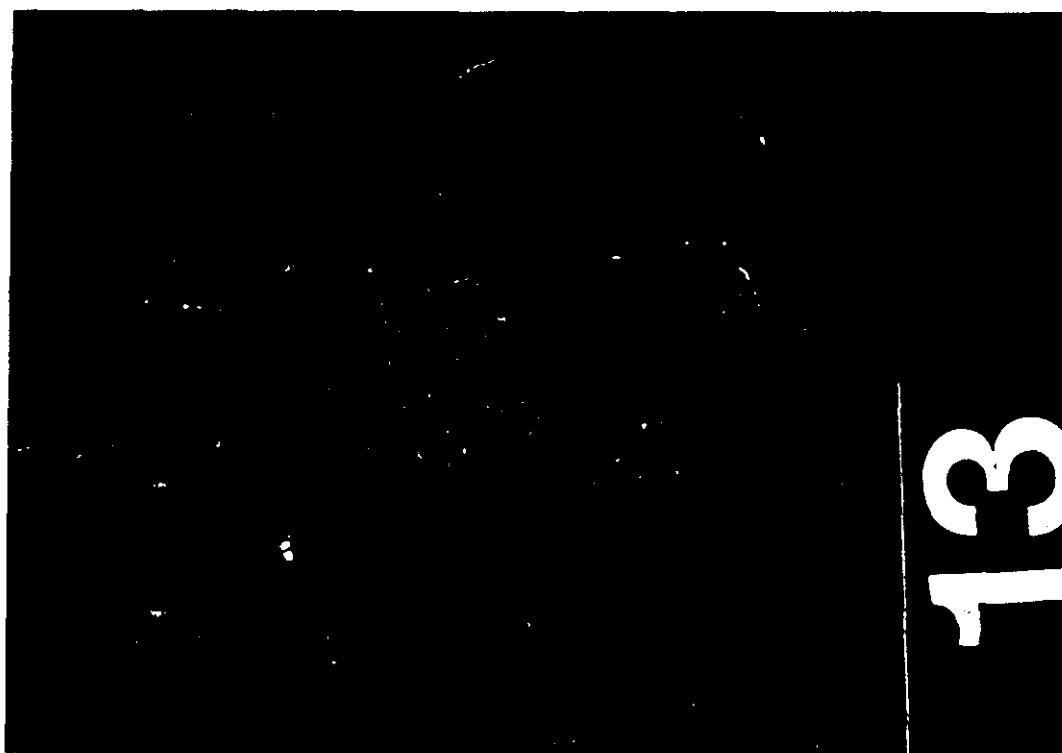
LAMINA 36. PUPA DE 240 HORAS POST-OPERCULACION



12



LAMINA 37. PUPA DE 264 HORAS POST-OPERCULACION



LAMINA 38. PUPA DE 288 HORAS POST-OPERCULACION

DISCUSSION

5. DISCUSION.

5.1. CONSIDERACIONES PREVIAS.

El desarrollo holometábolo de las abejas útiles para el hombre, como son las pertenecientes al Género *Apis* y los híbridos de éstas, ha sido estudiado por numerosos autores que basaron sus investigaciones en el desarrollo embrionario de los huevos de abejas, en los mecanismos de las mudas sufridas por las larvas de estos insectos o en los cambios experimentados por las larvas y pupas de abejas, desde los puntos de vista ponderal y morfológico.

Nuestras investigaciones se han centrado fundamentalmente en el estudio de las variaciones de peso sufridas por las larvas y pupas de *Apis mellifica mellifica* L. desde el nacimiento hasta la eclosión del imago, así como las modificaciones morfológicas que tienen lugar durante este periodo de tiempo.

5.2. DISCUSION DEL METODO.

La obtención de las larvas y pupas de abejas ha sido objeto de distintos estudios pudiendo realizarse por varios métodos. En nuestro trabajo, hemos seguido dos metodologías de trabajo diferentes, según el estadio en que se encontraban las mismas.

Cuando se trataba de larvas sin opercular utilizábamos al igual que Gray agujas de translarvar, a diferencia de Brey et al. que las obtenían mediante

corrientes de aire de 36.000 a 40.000 ml/min, con lo que conseguía desplazar las larvas de sus celdas sin producir daños en las mismas y Gilliam et al. que combinaron el método de Gray con la utilización de pinzas para agilizar la extracción de las larvas. La elección de este método se ha basado en los buenos resultados obtenidos con él en investigaciones anteriores, así como en la facilidad y rapidez de extracción de las larvas y el escaso porcentaje de daños que sufrían los individuos obtenidos de esta forma.

Cuando se trataba de larvas operculadas o de pupas se utilizaba para su extracción pinzas entomológicas junto con una aguja de translarvar. El método consistía en separar la larva del capullo con las pinzas para despejarla de su celda y así facilitar la entrada de la aguja de translarvar hasta el fondo de la misma y poder extraerla. En el caso de pupas la extracción se realizaba directamente con las pinzas entomológicas, lo que disminuye en gran medida el tiempo de obtención y por lo tanto el tiempo que los cuadros permanecen fuera de la estufa de cultivo o de la colmena.

La especie de abeja utilizada varía de acuerdo con las distintas investigaciones. Nosotros hemos utilizado la variedad *Apis mellifica mellifica* L. a diferencia de Rembold et al. que utilizaron *Apis mellifica carnica* L. o Thrasyvoulou y Benton que utilizaron *Apis mellifica ligustica* L. o Wang que trabajó con un híbrido de razas caucásicas e inglesas, denominado ZX. Igualmente se aprecian diferencias en el tipo de colmena y en el sistema de marcaje de las larvas. Nosotros marcamos las celdas operculadas siguiendo las pautas de Myser con laca de uñas de distintos colores. En las celdas sin opercular se identificaban los cuadros y se colocaban en la parte inferior (C) de la colmena experimental (descrita en el apartado 3.11), para

impedir que la reina tuviera acceso a los mismos. Los cuadros operculados se mantenían, en una estufa de cultivo a 35°C y 60% de humedad relativa a diferencia de Rembold et al. que incubaron las larvas en colmenas nodriza sin reina. Stabe, en cambio alojó las larvas en colmenas de observación con excluidor de reinas de zinc entre la parte superior y la inferior, realizando el marcaje con tacos de madera que usaba como marcas temporales y mediante laca de secado rápido aplicada con un pincel en las caras de las celdas. El control de la puesta lo llevaba a cabo mediante observación directa de la reina durante 2 horas.

Thrasylvoulou y Benton, utilizaron colmenas de observación con aproximadamente 454 g de abejas. Wang, trasladó las larvas a cúpulas artificiales y las introdujo en colmenas nodrizas.

Jay para la observación de las larvas durante la formación del capullo en celdas recién operculadas, sustituyó los opérculos por papel celofán perforado. Posteriormente una vez completado el capullo, colocaba las larvas en cápsulas de gelatina perforadas y las mantenía a 35°C y 80% de humedad relativa.

La metodología seguida para la obtención de los valores correspondientes al peso de las larvas ha sido muy variada según los distintos autores consultados. En nuestro trabajo hemos establecido lotes uniformes de cinco individuos en las larvas de menos de 110 horas y pesadas individuales de diez individuos en las larvas de más de 110 horas y en las pupas, para poder llevar a cabo un estudio estadístico lo más racional y fiable posible, mientras que Stabe pesaba lotes de abejas cuyo número oscilaba entre 8 y 70 individuos, realizando la media de las

mismas. Bounias utilizaba lotes entre 10 y 106 individuos y Wang realizaba pesadas en lotes que variaban entre 16 y 32 individuos.

5.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

5.3.1. Curva de crecimiento.

Han sido varios los autores que han estudiado las variaciones de peso de las larvas de abejas. Stabe, trabajando con *Apis mellifica* estableció el rango de crecimiento de las larvas de obrera desde la eclosión del huevo, hasta las 144 horas, en que alcanzaban su máximo peso. Según este autor las larvas presentan un incremento de peso cuya representación gráfica corresponde a una clásica curva sigmoidea, conclusión a la que también habían llegado Nelson y Sturdevant en 1924 y que concuerda totalmente con los resultados obtenidos por nosotros para ese periodo de tiempo.

Thrasylvoulou y Benton, mostraron el crecimiento de las larvas de obrera durante las primeras 90 horas de su desarrollo, resultados que coinciden con los obtenidos por Wang, pero no con los de Stabe.

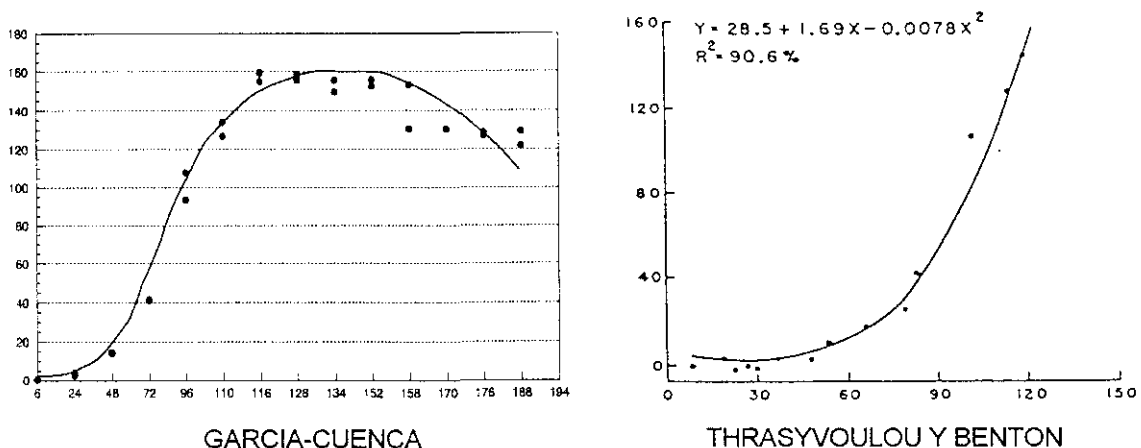


Figura 10

En la figura 10 se compara la representación gráfica defendida por nosotros con la obtenida por Thrasyvoulou y Benton en 1982.

Otros autores como Jay, Bounias, Melampy o Rembold y Kremer al realizar estudios sobre larvas de abejas, pero no específicamente sobre el crecimiento de peso a lo largo del desarrollo larvario, establecen pesos de larvas en momentos muy significativos, sin que podamos establecer relaciones muy marcadas con nuestros resultados ya que en muchos casos no se ajustan como los obtenidos por nosotros a horas fijas, sino que como en los trabajos de Melampy, están relacionados con las distintas mudas expresando el tiempo en días, o las de Rembold y Kremer que las relaciona con el diámetro de la cabeza o Bounias que los establece con arreglo a la distribución de los estadios larvarios.

La comparación de los resultados de los distintos autores en relación a los obtenidos en nuestras investigaciones se muestran en el cuadro siguiente:

HORAS	STABE	WANG	BOUNIAS	GARCIA-CUENCA
6	0,17 mg	0,24 mg	----	0,23 mg
24	0,52 mg	0,59 mg	----	3,18 mg
48	3,03 mg	3,31 mg	----	14,15 mg
72	20,6 mg	18,5 mg	----	41,09 mg
96	80,2 mg	64,4 mg	----	100,52mg
108	138,9 mg	117,4 mg	137,1 mg	130,23mg
126/128	152,38mg	----	----	157 mg
138/134	141,83mg	----	----	152,5 mg
152	----	163 mg	139,05mg	154,2 mg
174/176	----	160 mg	----	130,3 mg
192/200	----	151,5 mg	----	125,4 mg

Podemos apreciar una mayor similitud con los resultados de Stabe y Bounias, ya que en ambos casos han trabajado con *Apis mellifica L.* mientras que Wang trabajó con el híbrido ZX. Así podemos comprobar que a las 6 horas del nacimiento los pesos son prácticamente iguales, existiendo en este caso mayor coincidencia con Wang que da un valor de 0,24 mg, frente a 0,23 mg que damos nosotros, mientras que Stabe obtiene un valor de 0,17 mg. A las 24 horas existe un desfase considerable entre nuestros datos y los de otros autores, siendo nuestro resultado de 3,18 mg mientras que los de Stabe y Wang son de 0,52 mg y 0,59 mg respectivamente. Esta diferencia se mantiene a las 48 horas con pesos medios de

3,03 mg para Stabe, 3,31 mg para Wang y 14,15 mg para nosotros. A las 72 horas los pesos que obtuvimos siguen siendo significativamente superiores a los de los otros autores. En cambio, a las 96 horas Stabe obtiene un valor de 80,2 mg, frente a los 100,52 mg de nuestra experiencia o los 64,4 mg de Wang. Estas diferencias se amortiguan a las 108 horas en que nuestros datos (130,23 mg) coinciden prácticamente con los de Stabe (138,9 mg) y los de Bounias (137,1 mg), alejándose sin embargo de los de Wang (117,4 mg). A partir de este estadio es difícil establecer comparaciones reales, ya que las horas a las que se han obtenido los resultados no son coincidentes con las de los otros autores.

Las diferencias observadas en los estadios de 24, 48, 72 y 96 horas pueden ser debidas a la metodología utilizadas por Stabe y Wang, ya que al obtener larvas cada 6 horas, es muy probable que la cría sufriera cambios térmicos durante la manipulación que retrasasen su desarrollo, porque a estas edades, como afirmaron Harbo y Holten, las modificaciones en la temperatura influyen significativamente en el desarrollo.

En nuestro trabajo hemos establecido los coeficientes de correlación (R^2) en tres intervalos concretos correspondiente a los periodos entre las 6 horas y las 152 horas post-eclosión, entre las 6 y 212 horas post-eclosión y entre las 116 horas y las 212 horas post-eclosión, obteniendo resultados comparables a los obtenidos por Thrasylvoulou y Benton.

Thrasylvoulou y Benton establecieron los coeficientes de correlación (R^2) y las ecuaciones de regresión para sus datos y también para los obtenidos por Wang y Stabe. Las estimaciones de edades predecidas por las ecuaciones eran

más altas durante las primeras 36 horas y descendían después de las 48 horas en los tres estudios.

5.4. ESTUDIO MORFOLOGICO.

La caracterización de los distintos estadios post-embriónicos, se basa principalmente en las modificaciones de color que presentan los tagmas cefálico, torácico y abdominal, así como sus correspondientes apéndices, incluyendo los ojos y ocelos, del diámetro de la cabeza de las pupas y de los cambios en la estructura externa.

Nosotros, a diferencia de Rembold y Kremer, que siguieron el desarrollo pupal de *Apis mellifica carnica* solamente por la pigmentación de los ojos compuestos y el tórax, hemos estudiado las variaciones de coloración de los ocelos, que siguen un camino paralelo al de los ojos compuestos, el de las antenas, mandíbulas, labio, tórax, alas, patas, abdomen y aparato venenífero, con resultados semejantes a los obtenidos por ellos y que están plasmados en el cuadro 16 del apartado de resultados 4.2.1. Como se puede observar en este cuadro, la cabeza permanece blanca hasta el noveno día post-operculación, en cambio algunos apéndices cefálicos como antenas, mandíbulas y labio se tornan amarillos 24 horas después que el resto de la cabeza. El tórax, alas, patas, abdomen y aparato venenífero, también permanecen blancos hasta el octavo día post-operculación. Los ojos compuestos y los ocelos tienen un tono amarillo desde el quinto día post-operculación, pasando el sexto día a presentar un tono rosa. En el octavo día post-operculación ambas estructuras adquieren color rojo, pasando a

rojo oscuro el noveno día, y a negro el duodécimo día, 48 horas antes del nacimiento del imago.

El resto de las estructuras mencionadas como apéndices cefálicos y torácicos, así como el propio tórax y abdomen, siguen un proceso de oscurecimiento más o menos paralelo, pasando por amarillo (noveno día), amarillo oscuro (décimo-undécimo día), marrón (duodécimo día) y negro (decimotercer día post-operculación). Algunas estructuras como las alas, patas y abdomen, no llegan a adquirir la coloración negra, permaneciendo de color marrón oscuro.

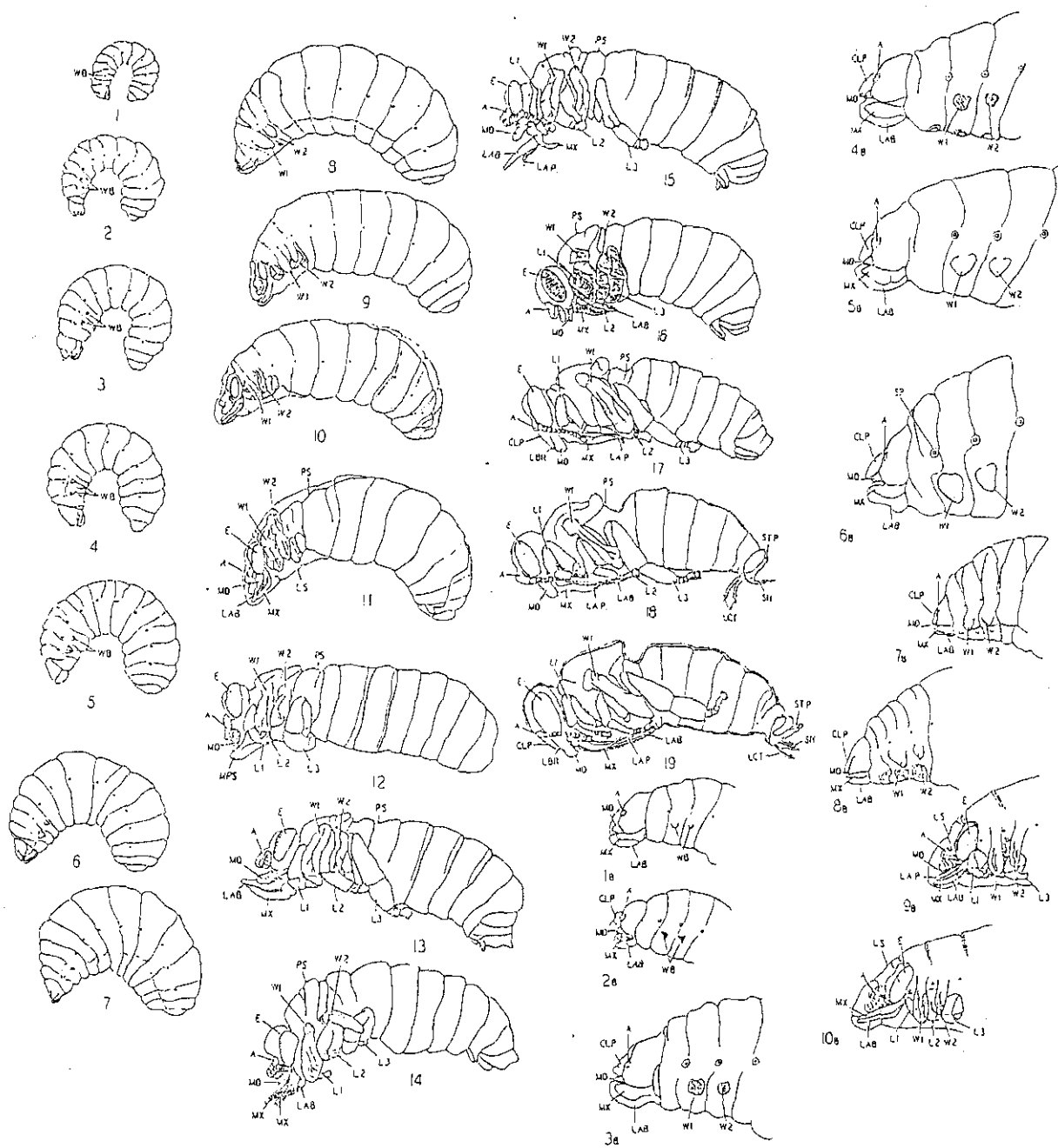
En nuestro estudio sobre las características morfológicas de *Apis mellifica mellifica* L. hemos establecido de acuerdo con Myser, los cambios en la estructura externa durante el desarrollo larvario y pupal, cambios que en nuestro estudio han sido fotografiados y esquematizados mediante distintos colores, quedando plasmados en las 38 láminas que figuran en el apartado correspondiente a los resultados. A lo largo de estas láminas se pueden observar los esbozos de las estructuras imaginales. En la larva de 24 horas y al igual que describió Myser, se observan bajo la cutícula larvaria, unas pequeñas manchas blancas en forma de media luna, que corresponden a los esbozos de las alas imaginales. Lateralmente se aprecian los esbozos de las antenas y también de las mandíbulas. El labio se aprecia en la proyección ventral y los espiráculos se observan perfectamente a las 48 horas, permaneciendo visibles hasta el estadio de pupa.

A medida que las larvas envejecen los esbozos se van haciendo más prominentes y así, a las 72 horas se puede observar el clipeo. A las 96 horas en la región torácica empiezan a hacerse visibles los esbozos de las patas imaginales, y

al igual que sucede con las otras estructuras mencionadas, van desarrollándose progresivamente hasta completar el individuo adulto.

A las 24 horas post-operculación, como ya describió Myser, las antenas aparecen como órganos segmentados y los ojos compuestos empiezan a desarrollarse. El punto culminante del desarrollo larvario se alcanza a las 66 horas post-operculación (octavo día).

Todos los resultados correspondientes a las modificaciones estructurales que tienen lugar durante el desarrollo larvario, coinciden con los obtenidos por Myser y que resumimos en la figura.11



MODIFICACIONES ESTRUCTURALES DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO
 (MYSER, 1954)
 Figura 11

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. El incremento de peso de las larvas de *Apis mellifica mellifica* desde el nacimiento hasta la operculación se ajusta a un modelo matemático cuya representación gráfica es una curva logística.
2. La variación de peso de las larvas de *Apis mellifica mellifica* desde el nacimiento hasta el estadio de pupa esta definido por la ecuación matemática formada por un cociente de polinomios.
3. Las variaciones de peso durante el estadio de pupa están matemáticamente definidos por una ecuación polinomial de tercer grado.
4. Las larvas de *Apis mellifica mellifica* alcanzan su peso máximo a las 128 horas del nacimiento coincidiendo con el momento de la operculación.
5. La edad de las larvas no operculadas de *Apis mellifica mellifica* se puede determinar con un error inferior a 12 horas mediante su peso. En cambio no es posible utilizar este método para las larvas operculadas ni para las pupas.
6. La edad de las pupas de *Apis mellifica mellifica* se puede determinar con un error máximo de 24 horas mediante el color de los ojos compuestos y de las distintas estructuras corporales.

RESUMEN

RESUMEN

La importancia económica y social de la cría de abejas han encaminado en los últimos años las investigaciones sobre este insecto hacia la necesidad de conocer más en profundidad su ciclo holometábolo.

En este trabajo se utilizan abejas *Apis mellifica mellifica* L.. En primer lugar se realiza un estudio bibliográfico exhaustivo sobre la biología de este insecto.

Como primer paso para el desarrollo del trabajo se establece la metodología adecuada para la obtención del material biológico necesario, mediante el diseño de una colmena experimental y el marcaje de las celdas, que nos han permitido obtener larvas y pupas con un margen de edad conocido.

Se ha procedido a la obtención de los pesos de las larvas y pupas desde el nacimiento hasta la eclosión del imago. Los datos recogidos se someten a un tratamiento estadístico para la obtención de una representación gráfica que evidencia la evolución del peso de los individuos en relación al tiempo, primero en su totalidad por la unión de los ajustes realizados de forma independiente para cada intervalo de crecimiento estimado y después, de forma individualizada, para cada tramo, estableciendo unas divisiones que van desde el nacimiento hasta la operculación, desde el nacimiento hasta el estadio de pupa y finalmente el estadio pupal en su conjunto.

Por otro lado se ha realizado un estudio morfológico de los mismos individuos usados para el estudio métrico. Este estudio se lleva a cabo mediante el tratamiento informático de las fotografías obtenidas en cada estadio. Mediante estas imágenes se han realizado esquemas que pretenden ser lo más coincidentes posibles con la realidad.

Del estudio realizado con los pesos de larvas y pupas de *Apis mellifica mellifica L.* se obtienen una serie de resultados de los que destacaremos que las larvas sufren un rápido incremento de peso que luego se estabiliza, alcanzando un máximo de 157 mg a las 128 horas del nacimiento, para posteriormente sufrir un leve descenso obteniendo un valor medio de 133,8 mg a las 224 horas. En el estadio de pupa este crecimiento sufre un ligero aumento para después volver a caer oscilando entre valores medios de 141,2 mg a las 278 y 124,9 mg a las 396 horas del nacimiento (6 horas antes de la eclosión del imago).

A partir de estos datos se estudian los modelos matemáticos para cada intervalo considerado. Así desde el nacimiento hasta la operculación se ajusta a un modelo cuya representación gráfica es una curva logística. Desde el nacimiento hasta el estadio de pupa el crecimiento está definido por la ecuación matemática formada por un coeficiente de polinomios, y finalmente las variaciones de peso durante el estadio de pupa están definidas por una ecuación polinomial de tercer grado.

De los estudios ponderales y morfológicos relativos a las distintas coloraciones corporales podemos decir que la edad de las larvas no

operculadas se puede determinar con un error inferior a 12 horas mediante su peso y la de las pupas, con un error máximo de 24 horas por el color de los ojos compuestos y de las distintas estructuras, no pudiendo ser el peso de las mismas un método fiable para determinar su edad.

BIBLOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

- ARNHART, L. 1931. Das Puppenhäuschen der Honigbiene. Arch. Bienenk., 12(7/8):290-304.
- BEIG, D. 1971. Desenvolvimento embrionario de abelhas operarias de *Trigona* (*Scaptotrigona*) *postica* Latreille (Hymenoptera, Meliponinae). Archos. Zool. Est. S. Paulo, 30:179-234.
- BELZUNCES, L.P.; GAUTHIER, M.; COLIN, M.E. 1992. Acetylcholinesterase in *Apis mellifera* head during post-embryonic development. Existence of a glycoinositol-anchored membrane forma at early pupal stages. Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem., 103(1):57-63.
- BERTHOLF, L.M. 1925. The moults of the honeybee. J. Econ. Ent., 18(2):380-384.
- BOUNIAS, M. 1978. Intraglycemic relations occurring during the development of honeybee worker *Apis mellifica*. Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol., 61(1):13-18.
- BREY, P.T.; NORRIS, D.M.; ERICKSON, E.H. 1980. A simple method for extracting larval honeybees (*A. mellifera*) from uncapped cells. J. Apic. Res., 19(3):200-201.

-
- CANETTI, S.J.; SHUEL, R.W.; DIXON, S.E. 1964. Studies in the mode of action of royal jelly in honeybee development. IV. Development within the brain and retrocerebral complex of female honeybee larvae. Can. J. Zool., 42:229-234.
- DIXON, S.E.; SHUEL, R.W. 1958. Studies on the mode of action of royal jelly in honeybee development. I. Changes occurring in fresh royal jelly determined by Cartesian diver respirometry. Can. J. Zool., 36:197-204.
- DOGRA, G.S.; ULRICH, G.M.; REMBOLD, H. 1977. A comparative study of the endocrine system of the honeybee larvae under normal and experimental conditions. Z. Naturforsch. Sect. C. Biosci. 32(7-8):637-642.
- DUPRAW, E.J. 1967. The honey bee embryo. In F.H. Wilt and N.K. Wessells (eds). *Methods in Developmental Biology*. Th. Y. Crowell Co., Nueva York. 183-217.
- DYAR, H.G. 1890. The number of moults of Lepidopterous larvae. Psyche V.,:420-422.
- FLEIG, R. 1985. Scanning electron microscopic analysis of morphometric movements during embryogenesis of the honeybee. Annual meeting of the working group of the Apicultural Institutes in West Germany, Bonn. Mar. 12-14 1985. Apidologie. 16(3):230-232.
-

-
- FLEIG, R.; SANDER, K. 1985. Blastoderm development in honeybee *Apis mellifera* embryogenesis as seen in the scanning electron microscope. Int. J. Invertebr. Reprod. 8(4-5):279-286.
- FLEIG, R.; SANDER, K. 1986. Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifica* L. Hymenoptera Apidae and sem study. Int. J. Insect. Morphol. Embryol. 15(5-6):449-462.
- GARY, N.E. ; FICKEN, R.W.; STEIN, R.E. 1961. Honey bee larvae (*Apis mellifera* L.) for bird food. Avicult. Mag. 67:27-32.
- GILBERT, L.I. 1964. In *The Physiology of insecta*. Vol. I. Edited by M. Rockstein. Academic Press, New York. 149-225.
- GILLIAM, M.; TABER, S.; III; BRAY, R.J. 1978. Chalkbrood disease of honeybees (*Apis mellifera* L.). Apidologie 9(1):75-89.
- GONTARSKI, H. 1957. Die Orientierung der larve von *Apis mellifica* in der geschlossenen zelle 1. Dorso-ventrale orientierung. Z. Bienenforsch. 3(9):216-220.
- HARBO, J.R.; BOLTEN, A.B. 1981. Development times of male and female eggs of the honeybee (*Apis mellifera*). Ann. Entomol. Soc. Am. 74(5):504-506.
- JAY, S.C. 1962a. Prepupal and pupal ecdyses of the honeybee. J. Apic. Res. 1:14-18.
-

-
- JAY, S.C. 1962b. Color changes in honeybee pupa. Bee Wild., 43(4):119-122.
- JAY, S.C. 1965. The cocoon of the honeybee *Apis mellifera* L. Can. Entomol., 96:784-792.
- KOEHLER, A. 1923. Über de postembryonale Entwicklung der Honigbiene. Landw. Jb. Schweiz, 37:183-192.
- LATHAM, A. 1954. ABC and XYZ of bee culture. Medina Ohio:Root.
- LINEBURG, B. 1924. The feeding of honeybee larvae. Bull. U.S. Dep. Agric., 1222:25-37.
- LUKOSCHUS, F. 1955. Utersuchungen zur Metamorphose der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). Insectes Sociaux, 2:147-162.
- LUKOSCHUS, F. 1956. Untersuchungen zur Entwkklung der Kastermerkmale bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). Ztschr. Morph. u. Oekol. Tiere, 45:157-197.
- MELAMPY, R.M.; WILLIS, E.R.; McGREGOR, S. 1940. Biochemical aspects of the differentiation of the female honeybee. Physiol. Zool., 12:283-293.
- MICKEY, G.H.; MELAMPY, R.M. 1941. Cytological studies on fat cells in the larval honeybee (*Apis mellifera* L.). Anat. Rec., 81 suppl. 53.
-

-
- MILNE, C.P.; PHILLIPS, J.P.; KRELL, P.J. 1988. A photomicrographic study of worker honeybee embriogenesis. J. Apic. Res., 27(2):69-83.
- MILUM, V.G. 1930. Variations in time development of the honeybee. J. Econ. Entomol., 23(441-447).
- MYSER, W.C. 1954. The larval and pupal development of the honeybee *Apis mellifera* L. Ann. Entomol. Soc. Amer., 47(4):683-711.
- NELSON, J.A. 1915. The embriology of the honey bee. Princenton University Press.
- NELSON, J.A. 1924. Morphology of the honeybee larva. J. Agric. Res., 28:1167-1213.
- NELSON, J.A.; STURTEVANT, P. 1924. The rate of growth of the honeybee larvae. Bull. U.S. Dept. Agr., 1222:1-24.
- NIJHOUT, H.F.; WHEELER, D.E. 1982. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphism. Q. Rev. Biol., 57:109-133.
- OCHIAI, S. 1960. Comparative studies on embriology of the bees *Apis*, *Polistes*, *Vespula* and *Vespa* with special reference to the development of the silk gland. Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ. 13-45.
- PFLUGFELDER, O. 1948. Volumetrische Untersuchungen an der Corpora allata der Honigbiene *Apis mellifica* L. Biol. Zentralbl., 67:223-241.
-

-
- PRELL, A. 1923. Further investigations concerning the development of the honeybee. Bee World, 5(6):96-97.
- PRELL, A. 1924a. Beiträge zur Kenntnis der Honigbiene. Märk. Bienenztg., 5:74-78; 7:112-114; 8:127-129.
- PRELL, A. 1924b. Der Kocoon der Honigbiene. Erlanger Jb. Bienenk., 2:176-189.
- RAL. 1976. Übersichtskarte RAL F2 zum Fabregister RAL 840HR (RAL. Ausschuss für Lieferbedingungen und Gütesicherung ed.) Muster Schmidt K.G. Göttingen.
- REINHARDT, E. 1960. Kernverhältnisse Eisystem und Entwicklungsweise von Drönen und Arbeiterinnenöiern der Honigbiene (*Apis mellifica*). Zool. Jb., 78:67-234.
- REMBOLD, H.; HANSER, G. 1964. Über den Weiselfuttersaft der Honigbiene. VIII. Nachweis der determinierenden Prinzipien in Füllersaft der Königinnenlarven. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 339:251-254.
- REMBOLD, H.; KREMER, J.P. 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee *Apis mellifera*. Apidologie, 11:29-38.

-
- RHEIN, W. 1933. Über die Entstehung des weiblichen Dimorphismus in Bienenstaaten. Roux' Arch. Entwmech. Organ., 129:601-665.
- RHEIN, W. 1950-51. Ueber die Entstehung des weiblichen Fimorphismus in Bienenstaaten und ihre Beziehung Zum Metamorphoseproblem. Verh. Dtsch. Zool. Ges., 99-101.
- RHEIN, W. 1956. Ueber die Ernährung der Arbeitermade von *Apis mellifica* L. insbesondere in der Altersperiode. Insectes Sociaux, 3:205-212.
- RIBBANDS, R. 1953. The behaviour and social life of honeybees. Bee Res. Assoc. Ltd. London.
- SHUEL, R.W.; DIXON, S.E. 1960. The early establishment of dimorphism in the female honeybee *Apis mellifera* L. Insectes Soc., 7(5):266-282.
- SMITH, M.V. 1959. Queen differentiation and the biological testing of royal jelly. Mem. Cornell. Agric. Ext. Sta., n°356.
- SNODGRASS, R.E. 1956. Anatomy of the honeybee. Ithaca, N.Y.: Cornell University Press.
- STABE, H. 1930. The rate of growth of worker, drone and queen larvae of the honey bee. J. Econ. Entomol., 3:447-453.
-

-
- STRAUSS, J. 1911 . Die chemische zussammensetzung der Arbeitsbienen und Drohnen während ihrer verschiedenen Entwicklungsstadien. Z. Biol., 56:347-397.
- THOMSEN, M. 1954. Neurosecretion in some Hymenoptera. K. Danske. Vidensk. Selsk. Biol. Skr., 7(5):1-24.
- THRASYVOULOU, A.T.; BENTON, A.W. 1982. Rates of growth of honeybee larvae. J. Apic. Res., 21(4):189-192.
- VAGT, W. 1955. Morphologische Utersuchungen an Nachschaffungsköniginnen von *Apis mellifica* die aus verschieden alten larven gezuchtet wurden. Z. Bienenforsch. 3(4):73-79.
- VELICH, A.V. 1930. Entwicklungsmechanische Studien an Bienenlarven. Z. Wiss. Zool., 136:210-222.
- WANG, D.I. 1965. Growth rates of young queen and worker honey bee larvae. J. Apic. Res., 4(1):3-5.
- WEAVER, N. 1957. Effects of larval age on dimorphic differentiation of the female honeybee. Ann. Entomol. Soc. Amer., 50:283-294.
- WEIPPL, T. 1931. Der kokon der Bienenlarven. Arch. Bienenk., 12:305-314.
-

-
- WIGGLESWORTH, V.B. 1964. In *Advances in insect Physiology*. Vol. 2. J.W.L. Beament, J.E. Terheme and V.B Wigglesworth. Academic Press. London. 248-336.
- WIRTZ, P.; BEETSMA, J. 1972. Induction of caste differentiation in the honeybee (*Apis mellifera*) by juvenile hormone. *Entomologia exp. appl.*, 15:517-520.
- WINSTON, M. 1987. *The biology of the honeybee*. Harvard University Press. Cambridge. Massachusetts.
- YAGINUMA, E.N.; MORALES, R.L.; CRUZ-LANDIM, C. 1990. Cytophotometric evaluation of corpora allata DNA during the development of larvae of workers and queen *Apis mellifera* L. *J. Apic. Res.*, 29(3):121-125.
- ZANDER, E.; LÖSCHEL, F.; MEIER, K. 1916. Die Ausbildung des Geschlechtes bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Z. Angew. Ent.*, 3:1-74.