

## Influencia de las condiciones ambientales en la presentación de *Ascospheerosis* (*Ascosphaera apis*) o cría de cal en *Apis mellifera* (abeja)

Influence of the weather conditions on the ascospheerosis (*Ascosphaera apis*) or chalkbrood on the *Apis mellifera* (bee)

Álvarez-Ramírez Alejandro<sup>1</sup> [padawan.ann@gmail.com](mailto:padawan.ann@gmail.com), Jiménez-González Lizeth<sup>1</sup>,  
Ortiz-Muñoz Edgardo<sup>2</sup> [eortiz@cualtos.udg.mx](mailto:eortiz@cualtos.udg.mx), Ruíz-García Idalia<sup>2\*</sup>  
[iruiz@cualtos.udg.mx](mailto:iruiz@cualtos.udg.mx), Orozco-Hernández Rogelio<sup>2\*</sup> [rorozco@cualtos.udg.mx](mailto:rorozco@cualtos.udg.mx)

<sup>1</sup>Estudiantes de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Guadalajara. México. <sup>2</sup>Cuerpo Académico Sistemas Pecuarios, Departamento de Ciencias Pecuarias y Agrícolas, Centro Universitario de Los Altos, Universidad de Guadalajara. México. \*Autor responsable y de correspondencia: Ruíz-García Idalia. Centro Universitario de Los Altos, Universidad de Guadalajara. México. Carretera Tepatitlán a Yahualica Km 7.5, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. México.

### RESUMEN

La patología cría de cal es una enfermedad fúngica presente a nivel mundial en apicultura, teniendo un efecto importante en la etapa larvaria de la abeja, con lo que se reduce la producción de miel. Siendo el *Ascosphaera apis* (*A. apis*) la etiología conjunta con un medio ambiente adecuado. Sin embargo, no se han realizado estudios de incidencia en climas como la región de Los Altos de Jalisco. Se supervisaron colmenas para detectar la presencia de la enfermedad durante los meses de julio a octubre, midiendo tanto la temperatura como la humedad, posteriormente los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente. Las colmenas mostraron un promedio de 67.14% de presencia de *A. apis* durante el estudio, tendiendo a reducirse de manera cuadrática ( $P < 0.05$ ) a medida que la temperatura ambiental bajaba. Se observó un fuerte correlación ( $R^2 = 0.78$ ;  $P < 0.05$ ) entre la presencia de *A. apis* y la temperatura ambiental del lugar donde se encontraban ubicadas las colmenas. Además se encontró que la enfermedad se correlacionaba inversamente con la humedad relativa ( $R^2 = -0.431$ ;  $P = 0.050$ ), es decir, a menor humedad relativa, se encontró una disminución en la presencia de la cría de cal. En conclusión, la micosis en la región alteña se observa principalmente en los meses que presentan condiciones ideales para su desarrollo.

**Palabras clave:** Cría de cal, abeja, producción

### ABSTRACT

Chalkbrood is a fungal disease that it is present worldwide in the apiculture, which has an important effect in the larval stage of the bee, reducing this way the honey production. Being The *Ascosphaera apis* (*A. apis*) the etiology agent in association with certain weather factors. Nevertheless, no study has been done with bees produced in Los Altos de Jalisco weather climate. Bee hives were monitored for the disease presentation during the months July to October, temperature and humidity were recorded and data were statistically analyzed. Hives monitored presented 67.14% of *A. apis* attack during the trial, and tended quadratically to be reduced ( $P < 0.05$ ) as the temperature lowers. A strong correlation ( $R^2 = 0.78$ ;  $P < 0.05$ ) was observed among *A. apis* presence and weather temperature where hives were placed. Chalkbrood disease presentation was inverse to the humidity ( $R^2 = -0.431$ ;  $P = 0.050$ ). In conclusion, the mycosis can be observed mainly when weather conditions are ideal for its growth.

**Keywords:** chalkbrood, bee, production.

## INTRODUCCIÓN

La apicultura en México, es una actividad de la que dependen aproximadamente 40 mil productores, quienes en conjunto poseen más de 2 millones de colmenas, lo que permite que México sea el quinto país productor y tercer exportador de miel a nivel mundial (SAGARPA, 2014). Jalisco ubicándose en el tercer lugar nacional. La producción apícola, a pesar de la presencia de la abeja Africana (*Apis mellifera scutellata*) e infestación con ácaros (*Varroa destructor*), ha registrado una importante recuperación (crecimiento anual 3%) que se ha sostenido durante los últimos 5 años, superando en los últimos 4 años, las 56,300 toneladas de miel; de las cuales se han exportado cerca de 29,109, principalmente a Europa (Alemania e Inglaterra) y Estados Unidos de Norteamérica (USA), generando ingresos por 32.4 millones de dólares anuales; lo que confirma que la apicultura es fuente de divisas (SAGARPA, 2014).



**Figura I. Apiario en el Municipio de Jalostotitlán, Jalisco; donde se realizaron las observaciones de *Ascosphaera apis***

Además de proveer de miel a la humanidad, las abejas son esenciales en la polinización agrícola a nivel mundial, e incluso producción de cera y propóleo. Pero a pesar de ello se ha observado una reducción de su población, atribuida a factores tales como: predadores, problemas de alimentación, exposición a pesticidas y enfermedades de diferente índole (Vanengelsdorp *et al.*, 2009). Los autores Wu *et al.* (2011) reportan el efecto de residuos de pesticidas en las larvas, lo cual afecta su desarrollo y con ello la producción general de la colmena.

Por otro lado, según los autores (Natsopoulou *et al.*, 2016; Nazzi y Le Conte, 2016) la temperatura y humedad, imperante en la colmena, propician la comunicación entre las abejas, y juegan un papel importante para la presentación de posibles infecciones. Por ejemplo, las abejas como individuo adulto, expuestas a las variaciones medio ambientales y posibles residuos de pesticidas, pueden presentar micosis (*Nosema apis*), que alteran desde su vuelo (Doselli *et al.*, 2016; Fries, 2010; Goulson *et al.*, 2015;

Vanengelsdorp *et al.*, 2009), capacidad polinizadora, hasta su reproducción y desarrollo.



Figura II. Observación de la presencia de *Ascospaera apis* en el apiario de observación.

En cambio, las larvas de la *Apis mellifera*, además de los ácaros, llegan a padecer de la enfermedad micótica, conocida como *Ascosferosis* (Cría yesificada o de cal), cuyo agente etiológico es el hongo *Ascospaera apis* (**A. apis**) que invade a su anfitrión superando su sistema inmune (Albo y Reynaldi, 2010; Aronstein y Murray, 2010; Jensen *et al.*, 2015) reduciendo de manera sustancial la cantidad de abejas productoras.

El *A. apis* es un hongo heterotálico, compuesto por hifas septadas hialinas; no presenta estados conidiales y cuyo cultivo se distingue morfológicamente sólo durante la reproducción (Albo y Reynaldi, 2001; Reynaldi *et al.*, 2003). Como resultado de esta fase se originan los esporocistos, que miden 80  $\mu$  de diámetro en promedio, valor que puede variar por la temperatura y el medio de cultivo. La micosis a nivel mundial presenta indicios de aumento, probablemente por el calentamiento global (Aronstein y Murray, 2010).

Las larvas de la abeja ingieren las esporas del *A. apis* junto con el alimento suministrado por las nodrizas (Reynaldi *et al.*, 2003, 2004); sin embargo, para que se desarrolle un brote de esta enfermedad, es necesario la concurrencia de causas predisponentes; que van a condicionar la proliferación del hongo en el tracto digestivo de las abejas. Una vez que la espора ha germinado en el intestino, las hifas atraviesan la pared intestinal, aprovechando los cambios asociados a la metamorfosis, y se extienden por todo el cuerpo, apareciendo en la superficie corporal cuando la larva alcanza la fase de pre-pupa. En esta superficie se desarrollan los cuerpos fructíferos (ascocistos), que producirán una nueva generación de esporas (Padilla *et al.*, 2014).

Las larvas enfermas están cubiertas por un moho blanco esponjoso, convirtiéndose posteriormente en momias de color gris oscuro o negro, si los cuerpos fructíferos se forman (Reynaldi *et al.*, 2003). Las esporas del hongo son altamente resistentes a condiciones ambientales extremas y pueden sobrevivir durante años (Aronstein y Murray, 2010); esta situación, junto con la necesidad de condiciones predisponentes, que no están bien definidos, implica que los brotes de la enfermedad pueden aparecer fácil e inesperadamente (Reynaldi *et al.*, 2004).

La diseminación de la micosis (conocida como; cría de cal o yesificada), puede estar relacionada a la trashumancia de colmenas, con el objetivo de realizar multiplicación temprana del colmenar, para así incrementar la producción de miel y polinizar; de igual forma colabora la importación de pies de cría de zonas infectadas (Higes *et al.*, 1998; Reynaldi y López, 2003).

Según los autores Padilla *et al.* (2014), los brotes de *A. apis* se observan en primavera y otoño principalmente, ya que su aparición está asociada a los factores antes mencionadas, que pueden variar en las diferentes regiones productoras. La región de los Altos de Jalisco como productora de miel, se caracteriza por la variación de climas y ambientes, pero no se han encontrado datos sobre la presencia de *A apis*.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la periodicidad en que se presentan las condiciones ambientales para el desarrollo del agente etiológico de ascosferosis (Cría de cal).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Descripción del área de estudio

La actual investigación se realizó en el municipio de Jalostotitlán, Jalisco, México; localizado en el noroeste del estado de Jalisco, donde la temperatura media anual es de 19.1°C., con precipitación promedio de 620.9 milímetros, con régimen de lluvias en los meses de junio y julio (INEGI, 2003).

### Diseño experimental

El presente estudio se realizó del mes de julio a octubre del 2016, periodo durante el cual se supervisaron 42 colmenas habitadas de abejas (Figura I), provenientes de la cruce de las variedades; Carniola (*Apis mellifera carnica*), Italiana (*Apis mellifera ligustica*) y Africana (*Apis mellifera scutellata*). Las colmenas de tamaño y características Jumbo, fueron separadas en 3 grupos, con 14 colmenas (repetición) cada uno, y durante el ensayo, éstas se ubicaron en lugares separados con un mínimo de 6 km, uno de otro. Se llevó el registro de las colmenas afectadas a nivel larvario, con etiología a la *A. apis.*, estableciendo la posible relación entre las condiciones ambientales y la presencia de enfermedad fúngica (Figura II).

Durante el seguimiento de la infección, se realizó la revisión de cada colmena, 3 veces por semanas; además del monitoreo continuo de la temperatura y humedad en la zona donde se ubicaron las cámaras de cría, con un higrómetro PCE- THB 40® (rango de medición de la primera fue: 0 a 50°C, resolución de 0.1°C, y de la segunda de 10 a 90%, con resolución de 0.1%). Los datos se registraron en la tarjeta de memoria de larga duración de los higrómetros, y cada 15 días se copiaron en un archivo de monitoreo de temperatura y humedad en una computadora; procedimiento que se realizó quincenalmente, desde la fecha de inicio de la infección (mes de julio), hasta su desaparición mes de (octubre).

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron transformados a logaritmo natural, y sometidos a un análisis de varianza con medidas en el tiempo, empleando el programa estadístico SAS; para establecer relación entre la presentación de micosis con las variables ambientales.

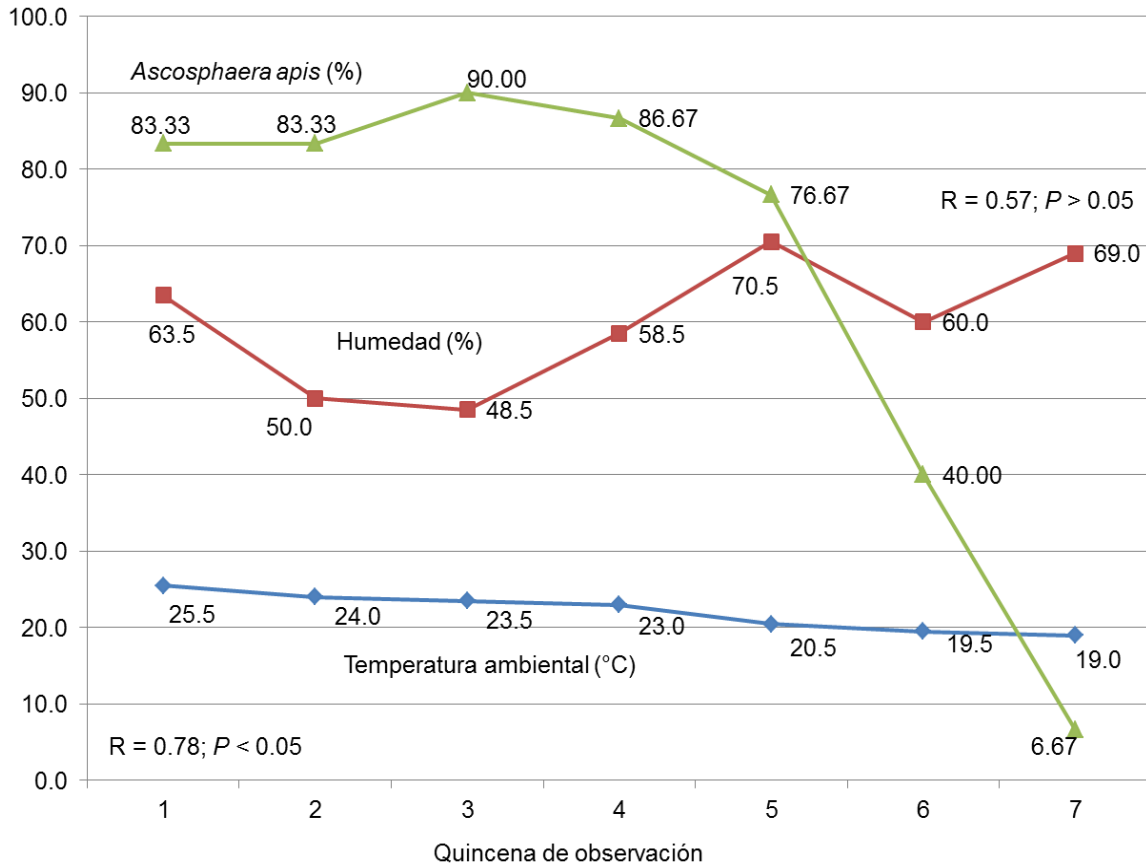
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados de la influencia de la temperatura ambiental, así como de la humedad imperante en el sitio de ubicación de la colmena, se presentan en la gráfica número 1, que a continuación se presenta. Como se puede observar en la misma gráfica, la cantidad de colmenas que resultaron positivas a la presencia de ascosferosis (%), disminuyó cuadráticamente, conforme avanzaba la quincena de medición ( $P < 0.05$ ); y a medida que disminuía de manera lineal la temperatura del medio ambiente donde se encontraban las colmenas; con relación estadística significativa con la enfermedad de las larvas de abeja ( $R^2 = 0.78$ ;  $P < 0.05$ ).

También en la Figura III, se puede ver que la humedad ambiental mostró un comportamiento cuadrático, el cual fue inverso a la presentación de la micosis, sobre todo a medida que avanzaba el tiempo de supervisión realizada ( $P > 0.05$ ). Jensen *et al.* (2009) encontraron que, bajo ciertas condiciones ambientales favorables, el *A. apis* puede conservarse por periodos prolongados y continuar siendo patógeno. Yoder *et al.* (2016) observaron que ambientes cálidos y condiciones de baja humedad están relacionadas con el desarrollo de la cría de cal, permitiendo se mantengan saludables las colmenas. Por otro lado, los hallazgos del actual estudio, coinciden con lo reportado por los autores Padilla *et al.* (2014), quienes relacionaron la época del año con el incremento del padecimiento de la cría de cal o yesificada.

Se han probado diferentes fungicidas para el control de *A. apis*, pero ninguno ha resultado ser totalmente eficaz en condiciones de campo y con potencial efecto residual, tanto en la larva como en los productos apícolas. El-Shafai (2012) sugiere el empleo de extractos acuosos de ciertos vegetales para su control *in vitro*. De igual manera Sahinler y Kurt (2004), encontraron que el empleo de ácidos orgánicos y

propóleo *in vitro* pueden ser alternativas en el tratamiento. Por otro lado, Vojvodic *et al.* (2012) en su trabajo sobre especies fungicas y la presentación de la patología, reporta una posible resistencia de la colmena de *Apis mellifera*, cuando hay presencia de poblaciones simbióticas, como de levadura (*Saccharomices cerevisiae*) o de bacilos.



**Figura III. Relación de la temperatura y humedad ambiental con la presentación (%) de *A. apis* en larvas de abeja.**

La única opción práctica es aplicar medidas de manejo; como por ejemplo, empleo de genética resistente, la renovación de los cuadros para evitar la acumulación de esporas, o evitar abrir la colmena cuando las condiciones climáticas sean adversas (Padilla *et al.*, 2014). Otros autores han relacionado las condiciones climáticas con la presencia de enfermedades relacionadas con parásitos del tipo microsporidios, como por ejemplo del género *Neosema* (Fries, 2010; Klee *et al.*, 2007).

Cremer *et al.* (2007), así como los autores Evans y Spivak (2010), mencionan que los patógenos de las abejas alteran el comportamiento social de la colmena, lo que facilita la transmisión. Sin embargo, también pueden cambiar su estrategia a una defensiva y eliminadora del agente, reduciendo su efecto. Tal vez este fenómeno tuvo lugar en

las colmenas analizadas en este estudio, ya que como se observa en la gráfica, la presencia de crías de cal, en las colmenas afectadas, tendieron a disminuir con el tiempo, pasando de 90 a 6.67%; observándose además el retiro de las larvas momificadas fuera de la colmena, comportamiento similar a lo reportado por los autores Palacio *et al.* (2010), así como por Evans y Spivak (2010), como una medida higiénica por parte de la comunidad.

Como se observa de manera general, la presentación de la *A. apis* en las colmenas de apiarios alteños es elevada, pudiendo ser de hasta 90%, como lo encontrado; siendo un problema económico para el productor, pues reduce sus ingresos. Los investigadores Reynaldi *et al.* (2015), reportan que la *A. apis* también afecta a los estadios larvarios de otros géneros de abejas, como la denominada carpintera, lo que favorece su transmisión y con ello se reduce la polinización agrícola; aunque la presentación tiende a ser estacional y asociada a la temperatura imperante en la ubicación de las colmenas, resolviéndose posteriormente, aunque se pueden implementar medidas que favorezcan la recuperación.

## CONCLUSIÓN

Al comparar y analizar los datos, es posible determinar que la zona de Jalostotitlán tiene los factores que permiten el crecimiento del *A. apis* en larvas de *Apis mellifera*, cuando la temperatura ambiental se encuentra entre los 25.5 y 20.5°C con humedad relativa entre 48.5 y 70.5%.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Asociación de Apicultores de Jalostotitlán por la ayuda prestada a la realización del trabajo de investigación, aportando los materiales y el apiario.

## LITERATURA CITADA

- ALBO GN, Reynaldi FJ. 2010. *Ascosphaera apis*, agente etiológico de la cría yesificada de las abejas. Revista Argentina de Microbiología. 42:80. ISSN: 0325-7541. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325).
- ALBO GN, Reynaldi FJ. 2001. Caracterización morfológica y enzimática de aislamientos de *Ascosphaera apis* de distintos orígenes de Argentina. Revista Argentina de Producción Animal. 22:1-11. ISSN: 2314-324X. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v42n1/v42n1a16.pdf>.

ARONSTEIN KA, Murray KD. 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103(Suppl.): S20-S29. ISSN: 0022-2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.018>.

CREMER S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P. 2007. Social immunity. *Current biology*. 17:R693-R702. ISSN: 0960-9822. DOI:10.1016/j.cub.2007.06.008.

DOSSELLI R, Grassl J, Carson A, Simmons LW, Baer B. 2016. Flight behaviour of honey bee (*Apis mellifera*) workers is altered by initial infections of the fungal parasite *Nosema apis*. *Scientific Reports*. 6:36649. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep36649.

EL-SHAFI AAF. 2012. *In vitro* control of *Ascosphaera apis* fungus by some plant extracts. Master of Biological Sciences. Islamic University of Gaza. <http://library.iugaza.edu.ps/thesis/102771.pdf>. 112 p.

EVANS JD, Spivak M. 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103:S62-S72. ISSN: 0022-2011. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.019.

FRIES I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 103 (Suppl. 1):S73-S79. ISSN: 0022-2011. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.017.

GOULSON D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. 347(6229):1255957. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1255957.

HIGES P, Suárez Robles J, Llorente Martínez MJ, Payá V, Montaña AV. 1998. Eficacia del aceite esencial de ajedrea (*Satureja montana*) en el control de la ascosferosis de la abeja (*Apis mellifera*) en condiciones de campo. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15:151-154. ISSN: 1130-1406. <http://www.reviberoammicol.com/1998-15/151154.pdf>.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2003. Climatología; carta de climas.

<http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/prodyserv/cartas/climatol.cfm?c=320>  
. Consultado el 20 de febrero 2017.

JENSEN AB, James RR, Eilenberg J. 2009. Long-term storage of *Ascosphaera aggregata* and *Ascosphaera apis*, pathogens of the leafcutting bee (*Megachile rotundata*) and the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 101(2):157-160. ISSN: 0022-2011. DOI: 10.1016/j.jip.2009.03.004.



- JENSEN AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M. 2015. Standard methods for fungal brood disease research. *Journal of Apicultural Research*. 52(1):1-20. ISSN: 2078-6913. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.13>.
- KLEE J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96(1):1-10. ISSN: 0022-2011. DOI: 10.1016/j.jip.2007.02.014.
- NATSOPOULOU ME, McMahon DP, Paxton RJ. 2016. Parasites modulate within-colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 70(7):1019-1031. ISSN: 1432-0762. DOI: 10.1007/s00265-015-2019-5.
- NAZZI F, Le Conte Y. 2016. Ecology of varroa destructor, the major ectoparasite of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*. 61:417-32. ISSN: 1545-4487. DOI: 10.1146/annurev-ento-010715-023731.
- PADILLA F, Flores JM, Campano F. 2014. Control de la ascosferosis (*Ascosphaera apis*) mediante el uso de fondos higiénicos de rejilla. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal (AICA)*. 4: 289-291. ISSN: 2253-9727. [http://www.uco.es/dptos/zoologia/Apicultura/trabajos.../2014\\_Control%20ascosferosis.pdf](http://www.uco.es/dptos/zoologia/Apicultura/trabajos.../2014_Control%20ascosferosis.pdf).
- PALACIO MA, Rodriguez E, Goncalves L, Bedascarrasbure E, Spivak M. 2010. Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. *Apidologie*. 41(6): 602-612. ISSN: 1297-9678. DOI:10.1051/apido/2010022.
- REYNALDI FJ, de Giusti MR, Alippi AM. 2004. Inhibition of the growth of *Ascosphaera apis* by *Bacillus* and *Paenibacillus* strains isolated from honey. *Revista Argentina de Microbiología*. 36(1): 51-55. ISSN: 1851-7617. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v36n1/v36n1a11.pdf>.
- REYNALDI FJ, López AC, Albo GN, Alippi AM. 2003. Differentiation of *Ascosphaera apis* isolates by rep-PCR fingerprinting and determination of chalkbrood incidence in Argentinean honey samples. *Journal of Apicultural Research*. 42:68-76. ISSN: 2078-6913. <http://dx.Doi.org/10.1080/00218839.2003.11101096>.
- REYNALDI FJ, Lucia M, Genchi Garcia ML. 2015. *Ascosphaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): First report in South America. *Revista Iberoamericana de Micología*. 32:261-264. ISSN: 1130-1406. DOI: 10.1016/j.riam.2015.01.001.

SAGARPA. Manual de buenas prácticas de producción de miel. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20de%20Buenas%20Prcticas/Attachments/1/mbpp.pdf>. Consultado el 13 de mayo de 2015.

SAHINLER N, Kurt S. 2004. A study on antifungal activity of formic acid and propolis extract against chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis*. Journal of Animal and Veterinary Advances. 3:554-556. ISSN: 1993-601X. DOI: javaa.2004.554.556.

VANENGELSDORP D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. PLoS One. 4:e6481. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0006481.

VOJVODIC S, Boomsma JJ, Eilenberg J, Jensen AB. 2012. Virulence of mixed fungal infections in honey bee brood. Frontiers of Zoology. 9: 5. ISSN: 1742-9994. DOI: 10.1186/1742-9994-9-5.

YODER JA, Nelson BW, Leighanne RM, Lorenz AL, Jajack JA, Aronstein KA. 2016. Water activity of the bee fungal pathogen *Ascosphaera apis* in relation to colony conditions. Apidologie. Pág. 1-9. ISSN: 1297-9678. DOI:10.1007/s13592-016-0461-7.

WU JY, Anelli CM, Sheppard WS. 2011. Sublethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. PLoS One. 6:e14720. ISSN: 1932-6203. DOI:10.1371/journal.pone.0014720.