

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 502**

51 Int. Cl.:

A23K 50/00 (2006.01)

A01K 51/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2015 PCT/US2015/019543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138361**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2015 E 15714701 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3110260**

54 Título: **Soluciones fúngicas integrales para la protección de las abejas**

30 Prioridad:

10.03.2014 US 201461967117 P

07.04.2014 US 201414247207

02.11.2014 US 201462074023 P

08.03.2015 US 201514641432

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
12.12.2018

73 Titular/es:

STAMETS, PAUL EDWARD (100.0%)

50 SE Nelson Road

Shelton, WA 98584, US

72 Inventor/es:

STAMETS, PAUL EDWARD

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 693 502 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Soluciones fúngicas integrales para la protección de las abejas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a composiciones que contienen extractos de micelios de especies fúngicas como se define en las Reivindicaciones 1, 9 y 15 y sus mezclas, para proporcionar un arsenal de defensas de múltiples factores estresantes para ayudar a sobrevivir a las abejas a un complejo de síntomas denominado problema de colapso de colonias (CCD). Más concretamente, la presente invención utiliza concentraciones específicas de extractos consumibles de micelio cultivado puro de hongos formadores de setas para reducir los virus perjudiciales en las abejas y para aumentar la longevidad de las abejas y métodos para mejorar la salud de las abejas, como se define en la Reivindicación 10.

15 **Antecedentes de la técnica**

Aproximadamente 100.000 especies de insectos, aves y mamíferos están implicadas en la polinización de las plantas en floración. Esto incluye casi 20.000 especies conocidas de abejas. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estima solo que de un poco mas de 100 especies de cultivos que proporcionan el 90 por ciento de los suministros de alimentos de 146 países, 71 están polinizados por abejas (principalmente por abejas silvestres), y algunos otros están polinizados por trips, avispa, moscas, escarabajos, polillas y otros insectos. El valor monetario anual de los servicios de polinización en la agricultura global sería tan alto como de 200.000 millones de dólares. *Protección de los polinizadores*, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. La evolución simultánea de plantas y abejas (*especie Apis*) es fundamental para su mutua supervivencia. Las abejas diseminan el polen y muchas plantas producen rico néctar a cambio.

Aproximadamente 4.000 especies de abejas son nativas de Norte América. Con la introducción de las abejas melíferas europeas (u "occidentales") (*Apis mellifera*) en América por los colonizadores, los huertos y granjas comerciales que normalmente no podrían sobrevivir han prosperado, aunque muchos cultivos del Nuevo Mundo y plantas en floración nativas son principalmente dependientes de las especies de abejas nativas para la polinización. La agricultura asiática es análogamente dependiente de la abeja melífera asiática (u "oriental") (*Apis cerana*), aunque normalmente a una escala más pequeña y más regionalizada (*Se ha introducido también A. mellifera*). En la totalidad de la agricultura, el número de frutas, nueces y cultivos vegetales que se benefician de la polinización de las abejas es asombroso, como son el número de árboles en floración, arbustos y flores silvestres. De hecho, es difícil exagerar el papel de las abejas en la producción comercial de alimentos. La pérdida de abejas que estamos experimentando ahora no tiene precedentes y es una gran amenaza para la seguridad alimentaria en todo el mundo. En algunas regiones de China, por ejemplo, la pérdida de abejas ha requerido la polinización manual para salvar cultivos, una tarea tremendamente difícil.

Una colmena de abejas es un entorno cálido, húmedo, densamente poblado por individuos estrechamente relacionados, el escenario perfecto para virus, bacterias, hongos, protozoos y ácaros. Las abejas se han protegido satisfactoriamente por sí mismas durante millones de años de dichos riesgos con sistemas de defensa a nivel de colonias únicas y con sistemas de defensa de hospedador a nivel individual y respuestas inmunitarias, pero estas defensas pueden romperse como el resultado de la intensa domesticación de la abeja europea y múltiples riesgos, incluyendo nuevos factores estresantes antropógenos, provocando un declive precipitado en el número de abejas melíferas salvajes y abejas nativas en áreas que incluyen Norte América, Europa y China desde 1972 a 2006 y la emergencia del trastorno de colapso de colonias ("CCD") en abejas melíferas en 2006.

La industria doméstica de las abejas depende de la cría de la reina, el proceso de selección que propicia las líneas que se van a propagar, y la cría de reinas, el proceso de producción y selección de abejas melíferas reinas. La gran mayoría de la cría de abejas en los Estados Unidos se lleva a cabo por 10-15 grandes empresas productoras de reinas, que intercambian información genética de aproximadamente 500 reinas reproductoras. Dicha diversidad genética limitada puede contribuir a la susceptibilidad a diversas enfermedades, plagas o trastorno de colapso de colonias. Particularmente dañinos para la crianza de reinas son los virus, especialmente el virus Black Queen Cell y otros virus que incluyen el virus de las alas deformadas, el virus israelí de la parálisis aguda de la abeja y casi otras dos docenas. Se anticipa que se van a descubrir más virus que contribuyen a enfermedades en abejas, incluyendo reinas, su prole, en abejas obreras, abejas nodrizas y zánganos.

Se han producido pérdidas de colonias y desapariciones de abejas a lo largo de la historia de la cría de abejas ("apicultura"), incluyendo diversos síndromes de abejas melíferas en la década de 1880, 1900 a los años 20 del siglo XX, los años 60 y los años 90 del siglo XX, tal como "enfermedades que desaparecen", "disminución de la primavera", "disminución del otoño", "ocaso del otoño" y "enfermedades del otoño" En 2006, algunos apicultores comenzaron a notificar pérdidas inusualmente altas del 30-90 por ciento de sus colmenas. Esta afección de la desaparición de abejas fue denominada "trastorno de colapso de colonias" (CCD, denominado algunas veces como colapso espontáneo de colonias o síndrome de Mary Celeste en el Reino Unido). CCD puede estar o no relacionado con los síndromes de pérdida de colonias anteriores; puede ser un trastorno genuinamente nuevo o un trastorno

conocido que anteriormente tenía solo un menor impacto.

CCD se está acercando al 30-40 % en muchos apicultores; con las 'granjas industriales', donde hasta 84.000 colmenas se mantienen en una localización, CCD puede representar más del 60 %. Esto ha elevado los costes de polinización de los almendros, por ejemplo, de 25-30 dólares por colonia de abejas para 1 acre (0,404 Ha) de huerto de almendros durante 3 semanas a más de 250 dólares. Más de 1/3 de todos los americanos que consumen alimentos no animales es dependiente de la polinización de las abejas. Si esta tendencia persiste en las pérdidas de colonias de abejas continúa, los gastos económicos y sociales podrían rondar los cientos de miles de millones de dólares.

La pérdida de los servicios proporcionados por las abejas tiene otras implicaciones de largo alcance. Por ejemplo, Los árboles de Nim, la fuente de miles de productos populares de salud, belleza e insecticidas, dependen de la polinización de las abejas, los que no se ven afectados negativamente. Curiosamente, Los productos de Nim que contienen el principio activo, azadiractina, son útiles para limitar o matar ácaros, incluyendo los ácaros *Varroa* que transmiten enfermedades a las abejas, e incluyendo ácaros que transmiten enfermedades a otros animales y plantas. Si las abejas se pierden, también lo hará este vasto recurso de productos para la salud y un insecticida natural.

Los síntomas principales de CCD son la desaparición de la clase obrera (dando como resultado muy pocas o ninguna abeja "obrero" adulta en la colmena), una reina viva y pocas o ninguna abejas muertas en el suelo alrededor de la colonia. A menudo, existe todavía miel en la colmena, Están presentes crías de abejas melíferas operculadas inmaduras (abejas que no abandonan normalmente una colmena haya eclosionado totalmente) y la colmena contiene miel y polen de abeja que no fue robado de inmediato por las abejas vecinas. La colmena es también saqueada lentamente por las plagas que afectan a la colonia tales como las polillas de la cera o pequeños escarabajos de la colmena. Se han encontrado frecuentemente ácaros *Varroa*, un parásito de las abejas melíferas que transmite virus, en colonias golpeadas por CCD. Las colonias que colapsan no tienen normalmente suficientes abejas para mantener la cría de la colonia y tienen obreras que consisten en abejas adultas más jóvenes; la progresión de los síntomas puede ser rápida o lenta (hasta de dos años). La colonia puede tener amplios almacenes de alimentos y ser reacia a comer alimentos proporcionados por el apicultor. Véase, por ejemplo, Honey Bees and Colony Collapse Disorder, United States Department of Agriculture Agricultural Research Service (2013).

Los motivos para el aumento del colapso de la colonia son complejos y parecen ser el resultado de múltiples factores. Las causas sugeridas incluyen el aumento de la urbanización y la pérdida de biodiversidad, particularmente la pérdida de praderas de flores silvestres y "malezas" que proporcionan alimento para abejas de alta calidad, nutrición mala y desnutrición, inmunodeficiencias, patógenos microbianos que incluyen virus, bacterias, hongos y protozoos, exposición letal y subletal a insecticidas, fungicidas y herbicidas, mitocidas y antibióticos aplicados por el apicultor, ácaros parasitarios (los ácaros *Varroa destructor* y los ácaros de la tráquea *V. jacobsoni* y *Acarapis woodi*), los hongos *Nosema ceranae* y *N. apis*, metales pesados, contaminantes tóxicos, toxinas vegetales naturales, insectos que pican, cría selectiva en apicultura y pérdida de diversidad genética, cambio climático, concentraciones de colmenas, y el aumento del estrés ambiental por sequía y frío, y combinaciones de estos factores. Otro factor es la naturaleza nueva del negocio de las abejas y el cambio de las prácticas de la apicultura. En los Estados Unidos, existen pocas, o, en muchas regiones, no existen abejas salvajes, y las colonias de abejas domesticadas a menudo se transportan en camiones a cientos de millas de las colmenas de los colmenares apícolas de las granjas industriales, confiriendo factores de estrés adicionales a la salud de las colonias y facilitando una diseminación más amplia de infecciones y parásitos entre las poblaciones de abejas.

Aunque la(s) causa(s) y mecanismos exactos de CCD siguen estando sin elucidar, parece que es importante la combinación de factores estresantes, particularmente 1) patógenos microbianos víricos y fúngicos tales como el virus israelí de la parálisis aguda ("IAPV"), el virus Black Queen Cell ("BQCV") y el virus del ala deformada ("DWV") y *Nosema* (un hongo patógeno); 2) ácaros parasitarios (particularmente ácaros de *Varroa*); 3) pesticidas a dosis letales o subletales, incluyendo insecticidas neonicotinoides (tales como clotianidina, tiacetoxam, e imidacloprid) y mitocidas aplicados por apicultores ("BAM") y otros factores estresantes ambientales; 4) la gestión de los factores estresantes de la apicultura incluyendo el aumento del intercambio vírico de abejas en camiones (particularmente en la migración de la polinización de la almendra en pleno invierno a California), y 5) las dietas de las abejas melíferas que incluyen el uso de sustitutos de la miel y la exposición al polen de bajo valor nutritivo al contrario que el polen y el néctar diversos naturales de alto valor nutritivo. La investigación sugiere que las dietas de las abejas melíferas, parásitos, enfermedades y pesticidas múltiples interactúan para tener efectos negativos más fuertes sobre las colonias de abejas melíferas gestionadas, mientras que las limitaciones nutritivas y la exposición a dosis subletales de pesticidas, en particular, puede alterar la susceptibilidad a o la gravedad de los parásitos y patógenos de abejas. Pettis *et al.*, Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*, PLOS ONE, Publicado: 24 de julio de 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.

DEFENSA FRENTE A HOSPEDADORES DE LAS ABEJAS MELÍFERAS Y SISTEMA INMUNOLÓGICO:

Las colonias de abejas pueden infectarse por diversas especies de parásitos o enfermedades en cualquier momento, pero los sistemas inmunitarios a nivel colonia y a nivel individual generalmente lidian con las infecciones

(con la posible excepción de los ácaros parasíticos *Varroa destructor* con la condición que las condiciones ambientales sean favorables. En el caso del colapso de colonias, la función inmunitaria normalmente eficaz está claramente fallando. Tras la introducción no natural del ácaro parasítico *Varroa destructor* en 1987 en los Estados Unidos, y su prolífica proliferación a través de las poblaciones de colmenares, las abejas se enfrentan a riesgos sin precedentes procedentes de estos artrópodos que son vectores de virus - combatiendo los virus que introducen con sistemas inmunitarios debilitados debido a la exposición a cócteles complejos de toxinas xenobióticas. Esta convergencia de factores estresantes es una fórmula para el desastre y no tiene evolutivamente precedentes. Los factores estresantes adicionales son la pérdida de la biodiversidad vegetal a medida que los bosques se cortan, se elimina la madera, y las granjas industriales de monocultivos aplanan los bosques naturales. Las abejas, domesticadas y silvestres, nuestros mayores polinizadores, están bajo el asalto de múltiples vectores. Se han notificado ya extinciones de abejas en algunas regiones de China y se esperan que se produzcan con una frecuencia creciente en todo el mundo.

Las abejas melíferas tienen numerosas defensas físicas, químicas y conductuales en la población local a nivel de la colmena de la colonia, de las celdas y de las abejas individuales. La primera línea de defensa de la colonia e individual es evitar que los parásitos ganen un punto de apoyo, las abejas gastan grandes cantidades de energía en comportamiento de "inmunidad social" cooperativa incluyendo el aseo de las superficies de su cuerpo (el autoaseo personal y el aseo personal de una compañera de nido), comportamiento higiénico cooperativo para detectar y eliminar crías enfermas y cadáveres de abejas adultas de la colmena, limpieza de las superficies internas de la cavidad del nido y esterilización de todas las superficies con secreciones antimicrobianas en su saliva (tal como glucosa oxidasa), y utilización (denominada algunas veces "hurto") de componentes del sistema inmunitario vegetal mediante la recopilación de las resinas altamente microbianas que se encuentran en las yemas de las hojas y en las heridas, incorporándolas al propóleo y utilizando el propóleo para formar una barrera antimicrobiana alrededor de la colonia, incluyendo uso pesado en la entrada, el revestimiento de las superficies internas de la cavidad y la superficie del panal y el sellado de grietas y hendiduras.

RESPUESTA INMUNITARIA SISTÉMICA INDIVIDUAL:

Los insectos poseen inmunidad innata, que se caracteriza por reacciones inmunitarias no específicas contra patógenos invasores, si bien carecen de la compleja inmunidad "adaptativa" o "adquirida" tal como la formación de anticuerpos específicos contra nuevos patógenos. El mecanismo de defensa en los insectos consiste en la inmunidad celular y humoral. En el mecanismo de defensa celular, los plasmocitos y granulocitos son los hemocitos principales que reaccionan a los invasores extraños tanto mediante fagocitosis como mediante encapsulación. Una característica de las reacciones humorales es la síntesis y secreción de péptidos antimicrobianos (AMP) que se acumulan en la hemolinfa y lisan directamente las células microbianas extrañas e inhiben las actividades de las enzimas esenciales para la replicación del patógeno. Véase Yoshiyama, Innate immune system in the honey bee, Honey Bee Research Group, National Institute of Livestock and Grassland Science. Esta respuesta "inducida" de péptidos antimicrobianos puede durar semanas, y parece que estos péptidos pueden pasarse a las compañeras de nido antes de conferir resistencia antes de la infección. Oliver, Sick Bees - Parte 3: The Bee Immune System, American Bee Journal, Octubre de 2010.

La respuesta antivírica de la abeja se basa en el ARN de interferencia (ARNi). El ARNi "silencia" la expresión de los genes entre la transcripción del código genético y su traducción en proteínas funcionales. El microARN (miARN, los ARN no codificantes pequeños que funcionan en redes que codifican proteínas y los procesos fisiológicos celulares mediante la regulación de la transcripción y posterior a la transcripción de la expresión génica) y el ARN interferente pequeño (ARNip, fragmentos bicatenarios cortos) se unen a moléculas de ARN mensajero específico (ARNm) y aumentan o disminuyen su actividad, por ejemplo, la producción de proteínas o las células defensoras frente a las secuencias nucleotídicas víricas. Los miARN están bien conservados, un componente evolutivamente antiguo de la regulación genética que se encuentra en muchos organismos eucariotas.

El ARNi se inicia mediante la enzima Dicer, que escinde las moléculas bicatenarias largas (ARNbc) en fragmentos bicatenarios cortos de ARNip. Cada ARNip se desenrolla en dos ARNmc, la hebra pasajera y la cadena guía. La hebra guía se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por el ARN (RISC). Tras la integración en el RISC, los pares de bases de los ARNip se dirigen a su ARNm y escinden éste, evitando por tanto que se utilicen como molde de la traducción. Cuando el ARN bc es exógeno (por ejemplo, proviene de la infección por un virus), el ARN se importa directamente en el citoplasma y se escinde en fragmentos cortos por Dicer.

Las abejas poseen más componentes de la ruta del ARNi con respecto a las moscas y parece que desarrollan más fácilmente una respuesta sistémica del ARNi que las moscas. de ellos se deduce que las abejas deben ser bastante capaces de luchar contra los virus y posiblemente otros patógenos eliminados de forma directa basándose en los ARN bicatenarios de los genes expresados por el patógeno (Evans/Spivak 2009). De forma destacable, esta forma de respuesta al ataque vírico proporciona una memoria a largo plazo similar a la resultante de los anticuerpos producidos en mamíferos. Oliver, Sick Bees - Parte 4: Immune Response to Viruses, American Bee Journal, noviembre de 2010.

VIRUS, NOSEMA Y PATÓGENOS MICROBIANOS:

Las abejas hospedan al menos 18 virus, casi todos son virus de ARN monocatenarios. Algunos son patógenos emergentes, tales como el virus del ala deformada y el virus de la parálisis aguda de la abeja, que se consideraron alguna vez "económicamente irrelevantes (Genersch 2010) y entonces, con la llegada de *Varroa* como vector, comenzaron a devastar visiblemente colonias. Oliver, Sick Bees - Parte 4: Immune Response to Viruses, American Bee Journal, noviembre de 2010.

Las enfermedades víricas incluyen el virus de la parálisis crónica (CPV), Virus de la parálisis aguda de la abeja (ABPV), Virus israelí de la parálisis aguda (IAPV), Virus de la abeja de Cachemira (KBV), Virus Black Queen Cell (BQCV), Virus del ala opaca (CWV), Virus del saco embrionario (SBV), Virus del ala deformada (DWV), Virus Kakugo, Virus iridiscente de invertebrados de tipo 6 (IIV-6), Virus del lago Sinaí (LSV1 y LSV2) y Virus de la mancha anular del tabaco (TRSV). Comprendidos en estos virus están muchos subtipos cuya virulencia hacia las abejas se está actualmente investigando. Se descubrirán probablemente virus más patógenos. La incidencia simultánea de más de un virus internalizado desafía además la salud inmunológica de las abejas. "No conozco ningún tratamiento antivírico eficaz en el mercado para combatir el espectro de virus que se sabe que se producen en las abejas". --Dr. Walter "Steve Sheppard, Catedrático, Department of Entomology, Washington State University, Pullman, Washington (comunicación personal). Por tanto, existe una necesidad de remedios ventajosos, que no sean tóxicos, y sean además activos contra más de un virus.

Las abejas son también vulnerables a los cambios en los hospedadores patógenos. El virus de la mancha anular del tabaco puede replicarse y producir viriones en las abejas *Apis mellifera*, provocando infecciones en todo el cuerpo, incluyendo la infección extensa del sistema nervioso y probablemente impactos en la supervivencia de la colonia. Se encontró también TRSV en el ciego gástrico de los ácaros *Varroa*, sugiriendo que los ácaros *Varroa* pueden facilitar la diseminación de TRSV en las abejas evitando a la vez la invasión sistémica. Li *et al.*, Systemic Spread and Propagation of a Plant-Pathogenic Virus in European Honeybees, *Apis mellifera*, *mBio* 5(1):e00898-13. doi: 10.1128/mBio.00898-13. El virus, observado en primer lugar en el tabaco infectado, se disemina a través del polen infectado de numerosas especies de plantas incluyendo la soja y numerosos cultivos, malezas y ornamentales.

Nosema apis es un microsporidio, reclasificado recientemente como un hongo, que invade los tractos intestinales de las abejas adultas y produce la enfermedad del Nosema, conocida también como nosemosis. La infección de *Nosema* se asocia también con el virus Black Queen Cell y el virus de la abeja de Cachemira. *Nosema ceranae* está volviéndose un problema creciente en la abeja melífera asiática *Apis cerana* y la abeja melífera occidental.

Algunos virus de abejas melíferas (DWV y KBV) y los hongos *Nosema ceranae* son capaces de infectar otras especies de abejas y avispa, y posiblemente las células del intestino de *Varroa*; las abejas son probablemente la fuente de los patógenos del abejorro. Furst *et al.*, Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators, *Nature*, Volumen:506, 364-366, (2014). Este nuevo vector abeja a abeja podría ser un punto de inflexión, produciendo un colapso a gran escala de muchas especies de abejas nativas, con consecuencias mucho más allá de nuestro control, o imaginación. Desde una perspectiva histórica y biológica, Desde una perspectiva comercial y clínica, este es un momento de 'unir todas las manos'. Lo que la evolución nos ha proporcionado durante millones de años puede perderse en décadas debido a las intervenciones humanas cuyos incentivos son a corto plazo a la vista, a expensas del largo plazo.

Las enfermedades bacterianas de las abejas incluyen la loque americana (AFB), producida por *Paenibacillus larvae*, y la loque europea (EFB), producida por la bacteria *Melissococcus plutonius*. Las enfermedades fúngicas incluyen la cría calcificada, producida por *Ascosphaera apis*, y cría de piedra, una enfermedad fúngica producida por *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, y *Aspergillus niger*. De nuevo, aún sin identificar, se espera que se produzcan de forma simultánea patógenos fúngicos o se vuelvan como la causa principal de enfermedades de las abejas dado que los seres humanos alteran aún más el medio ambiente natural y producen consecuencias no deseadas derivadas del uso de cultivos transgénicos, conocidos más ampliamente como GMO - organismos modificados genéticamente. Dichos patógenos fúngicos potenciales incluyen *Candida*, *Cryptococcus*, *Coccidioides* y otros organismos similares a levaduras. Y, sin embargo, muchos de estos patógenos así denominados, especialmente, por ejemplo, las formas preesporulantes de los hongos entomopatógenos, tienen propiedades que pueden conferir beneficios a los insectos, incluyendo las abejas, con la condición que se eliminen reduzcan o alteren sus toxinas endógenas, de tal manera que no perjudiquen a las abejas, reduciendo por tanto la amenaza para las abejas por parte de organismos causantes de enfermedades, portadores de enfermedades, o la propagación de enfermedades.

Todas las abejas melíferas están infectadas por más de una especie de bacterias, incluyendo endosimbiontes beneficiosos que ofrecen protección contra las levaduras, la cría calcificada y la loque americana. Las abejas aparentemente sanas pueden estar también infectadas por más de una especie de virus. Las dinámicas de las interacciones abejas-bacterias, abejas-virus y virus-virus son complejas y se entienden mal. Determinados virus de abejas pueden potenciar la virulencia de otros virus mientras que algunos virus de abejas pueden suprimir competitivamente la replicación de otros. De la misma forma que son probables las interrelaciones de bacterias a bacterias, los científicos han descubierto además interrelaciones bacteriófagos a bacterias, hongos a bacterias y hongos a virus. muchos virus de abejas virulentos pueden existir en una infección "no evidente" - se puede detectar la presencia de los virus en las abejas, pero no hay efectos negativos destacables debido a la infección. Una

infección por un segundo virus u otro factor estresante puede producir un virus durmiente para iniciar la replicación. Numerosos investigadores han encontrado que la mera acción un ácaro *Varroa* alimentándose de una abeja (que incluye la inyección de supresores inmunitarios por el ácaro) puede inducir o activar la replicación de infecciones víricas no evidentes y normalmente no patológicas. Los estudios de respuestas inmunitarias han mostrado también

que los ácaros y los virus podrían alterar los niveles de la transcripción de los genes relacionados con la inmunidad en sus hospedadores correspondientes. Es común en las colonias que colapsan estar simultáneamente infectadas con tres o cuatro virus, ácaros de *Varroa*, *Nosema* (*ceranae* y especialmente *apis*), y tripanosomas. Véase Oliver, Sick Bees - Parte 3: The Bee Immune System, American Bee Journal, Octubre de 2010.

ÁCAROS VARROA Y OTROS PARÁSITOS:

Varroa destructor y *Varroa jacobsoni* son ácaros parasíticos que se alimentan de los fluidos corporales de las abejas adultas, pupas y larvas. *Acarapis woodi* es un ácaro de la tráquea que infesta las vías aéreas de la abeja melífera. Los ácaros parásitos de crías asiáticos *Tropilaelaps clareae* y *T. mercedesae* se consideran riesgos potenciales graves para las abejas,, aunque no se han encontrado en los Estados Unidos o Canadá hasta la fecha.

La abeja melífera asiática *Apis cerana* es el hospedador natural del ácaro *Varroa jacobsoni* y el parásito *Nosema ceranae*. Habiendo evolucionado simultáneamente con estos parásitos, *A. cerana* presenta más cuidado personal que *A. mellifera*, y por tanto, tiene un mecanismo de defensa más eficaz contra *Varroa* y *Nosema*, que se están convirtiendo de forma creciente en plagas graves de la abeja melífera occidental.

Los ácaros Varroa que rompen las barreras higiénicas, mecánicas y fisiológicas de las abejas frente a la invasión han actuado cada vez más como un vector para los virus así como produciendo un estrés mayor a las abejas. Solo los países que han tenido pérdidas generalizadas de colonias han notificado que *Varroa* es un problema (Neumann 2010). Las colonias sin ácaros pueden estar exentas de virus (Highfield 2009), pero hasta un 100 % de colonias con *Varroa* pueden infectarse por uno o más virus, incluso si no existen síntomas aparentes (Tentcheva 2004). Oliver, Sick Bees - Parte 1, American Bee Journal, Agosto de 2010.

Se ha encontrado que los ácaros Varroa son mucho más susceptibles a los ácidos que lo que son las abejas melíferas. los ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido fórmico y ácido láctico se pueden usar como "miticidas naturales" o como tratamiento de ácaros en la colmena, ya que todos se encuentran naturalmente en la miel. El ácido oxálico se mezcla normalmente con agua destilada para evitar la formación de sales, dando como resultado una solución ácida con un pH a menudo <1. Que las abejas puedan tolerar dicho pH bajo mientras que los ácaros no pueden es significativo. El ácido oxálico capturará el calcio y otros minerales del exoesqueleto de los ácaros para formar oxalatos. Cuando el contacto directo del ácido oxálico o fórmico con el exoesqueleto de tipo quitinoso de los ácaros saca el calcio, el exoesqueleto se debilita, volviendo por tanto a los ácaros susceptibles a otros factores estresantes, incluyendo, aunque no de forma limitativa a la infección o a la exposición a toxinas de hongos entomopatógenos.

Además de las plagas de insectos conocidas de la colonia, como las polillas de la cera mayores y menores y el pequeño escarabajo de la colmena, la mosca fúrida, conocida anteriormente por parasitar abejorros, puede emerger como riesgo para las abejas melíferas. Core *et al.*, A New Threat to Honey Bees, the Parasitic Phorid Fly *Apocephalus borealis* (2012), *PLoS ONE* 7(1): e29639. doi:10.1371/journal.pone.0029639; Ravoet, anteriormente citado.

PESTICIDAS:

Los pesticidas producen múltiples formas de estrés a las abejas. La fumigación agrícola puede afectar a las abejas melíferas y programas de fumigación a gran escala para mosquitos, polillas gitanas, gusanos del abeto y otras plagas de insectos pueden producir muertes de abejas de forma directa o indirecta que incluyen abejorros nativos y abejas solitarias. Existe también un cambio en los tipos de pesticidas aplicados - muchos, tales como los neonicotinoides, son menos tóxicos para los vertebrados y se reduce la necesidad de aplicaciones repetidas, pero actúan sistémicamente y se absorben y distribuyen a través de la planta tras el tratamiento de la semilla o el suelo, incluyendo la distribución en el polen y el néctar.

La exposición subletal a pesticidas, incluyendo la exposición a insecticidas neonicotinoides colinérgicos (antagonistas de los receptores nicotínicos) y/o miticidas a base de organofosfatos colinérgicos (inhibidores de la acetilcolinesterasa), se ha encontrado que alteran la actividad, el desarrollo, oviposición, comportamiento, relaciones sexuales de la descendencia, vuelo y movilidad, navegación y capacidad de orientación, comportamiento de alimentación, aprendizaje, memoria y función inmunitaria, la dinámica de poblaciones y un aumento a la

susceptibilidad y a la mortalidad producida por enfermedades, incluyendo *Nosema*. Véase, por ejemplo, Pettis, Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*, *anteriormente citado* en 1. Los fungicidas y miticidas utilizados por los apicultores pueden tener una capacidad pronunciada sobre la capacidad de las abejas de soportar la infección de parásitos. Pettis, *anteriormente citado* en 4. A menudo las abejas se exponen a varios pesticidas, que pueden tener efectos interactivos. Véase, por ejemplo, Di Prisco *et al.*, Neonictinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees, PNAS vol. 110, n.º 46, 12 de Noviembre de 2013, 18466-18471; Pettis *et al.*, Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*, PLoS ONE (2013); Palmer *et al.*, Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees, Nature Communications, 4:1634, (2013); Williamson *et al.*, Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees, The Journal of Experimental Biology 216, 1799-1807 (2013); Derecka *et al.*, Transient Exposure to Low Levels of Insecticide Affects Metabolic Networks of Honeybee Larvae, PLoS ONE 8(7), e68191 (2013), doi:10.1371/journal.pone.0068191.

La exposición a fungicidas también mata o reduce los hongos beneficiosos que se encuentran en el polen - teniendo el resultado probablemente una incidencia mayor de la enfermedad en las abejas, incluyendo infecciones por *Nosema* y crías calcificadas (irónicamente, enfermedades fúngicas).

El genoma de la abeja tiene relativamente pocos genes que están relacionados con la detoxificación en comparación con insectos solitarios tales como moscas y mosquitos. Algunas de las diferencias más marcadas entre las abejas y otros insectos se producen en tres superfamilias que codifican enzimas detoxificantes xenobióticas. Mientras que la mayoría de genomas de insectos diferentes contienen 80 o más genes del citocromo P450 (CYP), *A. mellifera* tiene solo 46 genes del citocromo P450, mientras que los hospedadores humanos tienen aproximadamente 60 genes CYP. Las abejas melíferas tienen solo aproximadamente la mitad como mucho de glutatión-S-transferasa (GST) y carboxil/colinesterasas (CCE), en comparación con la mayoría de genomas de insectos. Esto incluye 10 veces o más de deficiencias en las GST Delta y Épsilon y los CYP4 P450, cuyos miembros de los clados se han vinculado a la resistencia a los insecticidas en otras especies. Claudianos *et al.*, A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee, Insect Molecular Biology, 15(5), 615-636 (2006).

Mientras que las abejas evolucionaron para hacer frente a los fitoquímicos vegetales y a las toxinas naturales, ahora deben metabolizar y detoxificar adicionalmente los insecticidas, miticidas, herbicidas, fungicidas y contaminantes ambientales antropógenos, un desafío evolutivo sin precedentes.

MANEJO DE LOS ESTRESORES DE LA APICULTURA:

El uso de sustitutos de la miel o el polen (tales como jarabes azucarados; jarabe de maíz con alto contenido de fructosa; dulces de derivados de la miel de abejas; "pasteles grasos" que contienen grasa, azúcares y, opcionalmente, sales o aceites esenciales; o "dulces de polen" que contienen soja, levadura y leche en polvo desnatada, que pueden tener polen añadido, procedente posiblemente de áreas contaminadas con pesticidas) puede ser un factor contribuyente al declive de las poblaciones de abejas y CCD por diversos motivos. La desnutrición es probablemente un factor principal en el declive de las poblaciones de abejas. Las dietas de abejas sintetizadas simplemente no proporcionan el valor nutritivo obtenido por las abejas de una mezcla de pólenes de calidad. Aunque se pueden proporcionar proteínas, hidratos de carbono y vitaminas de calidad a las abejas melíferas en el laboratorio, todavía no se pueden mantener vivas más de dos meses en confinamiento con las mejores dietas; ellas viven normalmente, en promedio, aproximadamente 30 días en cautividad. Garvey, About Bee Nutrition..., Posts Tagged: from the UC Apiaries newsletter-The California Backyard Orchard.

La miel contiene varias sustancias que activan la sensibilización de nutrientes, los procesos metabólicos, de detoxificación e inmunitarios en la abeja melífera Europea *Apis mellifera*, más otros compuestos químicos útiles para la salud de las abejas melíferas. Las enzimas se encuentran en las paredes del polen de las flores y penetran en la miel adhiriéndose a las patas de las abejas. La ingestión de resinas de árboles, bálsamos y jugos de árboles mediante la incorporación en el propóleo o cola de abeja se sabe también que reduce la susceptibilidad de las abejas a los insecticidas y patógenos microbianos y regula en exceso la transcripción de los genes de la detoxificación. Los sustitutos de la miel o dulces de polen, que no contienen estos compuestos químicos, pueden por tanto contribuir al trastorno del colapso de colonias. Véase Mao, Wenfru, Schuler, Mary A. y Berenbaum, May R., Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 110(22), 8842- 8846 (2013). Mao *et al.* encontraron que los constituyentes en la miel derivados de polen y exudados de árboles, incluyendo el ácido p-cumárico (=ácido 4-hidroxicinámico), pinocembrina, pinobanksina and 5-metil éter de pinobanksina, son inductores fuertes de los genes de detoxificación de los genes del citocromo P450 mediante numerosos miembros de la familia CYP6 y CYP9. El secuenciamiento masivo en paralelo del ARN y el análisis de la secuencia del ARN desveló que el ácido p-cumárico regula en exceso de forma específica todas las clases de genes de detoxificación así como los genes seleccionados por los péptidos antimicrobianos requeridos para la defensa frente a pesticidas y patógenos.

Las especies de abejas melíferas que anidan en tres cavidades usan propóleo para sellar grietas en la colmena, como hacen las abejas en colmenas domésticas, aunque las abejas melíferas salvajes revisten la superficie interna

completa de su cavidad de anidamiento, mientras que las abejas melíferas domesticadas ponen relativamente poca resina en las colmenas de apicultura. Se ha demostrado que el revestimiento del propóleo inhibe los hongos AFB (Antúnez 2008) y la polilla de la cera; Spivak ha demostrado que el propóleo de algunas regiones es eficaz contra *Varroa*, y está investigando su efecto en virus. De mayor interés es el hallazgo (Simone 2009) de que la abundancia de propóleo parece disminuir así la inversión necesaria en la función inmunitaria de las abejas, la colonia de abejas, mediante automedicación con compuestos químicos antimicrobianos de las plantas, incurre menos en el coste metabólico de la lucha contra los patógenos. Oliver, Sick Bees - Parte 3: The Bee Immune System, American Bee Journal, Octubre de 2010.

10 OSOS, SETAS Y ABEJAS:

El inventor notó, en una de sus muchas incursiones en los antiguos bosques de crecimiento de la península olímpica, Estado de Washington, un árbol de conífera rascado por un oso (aparece una fotografía en el libro que ha autorizado, *Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World*, 2005, pág. 70, figura 75. Ten Speed Press, Berkeley). La bibliografía de investigación sobre las interrelaciones entre osos y setas indicó que la especie *Fomitopsis*, cortes de madera de políporo en descomposición, incluyendo el *Fomitopsis pinicola* observado con frecuencia y el *Fomitopsis officinalis*, observado raramente, eran las especies fúngicas más comunes que crecían después de los rascados en los bosques de coníferas del Noroeste del Pacífico y en otros lugares. Los científicos forestales mostraron que cuando los osos rascan un árbol vivo, dejan la madera abierta, y las especies de *Fomitopsis* ganan oportunísticamente un sitio de entrada para la infección. Tras un rascado, la resina rica en azúcares a menudo forma gotas como gotículas, que atraen a los osos y las abejas. De hecho, cuando el autor volvió unos pocos años después al mismo árbol rascado por el oso en lo profundo de los bosques de crecimiento viejo a lo largo de la bifurcación sur del río Hoh, los hongos *Fomitopsis pinicola* estaban fructificando en el árbol, ahora caído.

"En coníferas jóvenes, particularmente en abetos de Douglas, los osos arrancarán tiras de corteza con sus dientes para llegar a los insectos. los dientes del oso dejan largas ranuras verticales en la albura y se encuentran grandes tiras de corteza alrededor de las bases de los árboles que pelan. Estas marcas se realizan normalmente de abril a julio, pero los resultados pueden observarse todo el año. Esta actividad de forrajeo es común en las plantaciones de árboles donde grandes rodales de árboles son de edad similar y de una única especie". Link, Living with Wildlife: Black Bears, Washington State Dept, of Fish and Wildlife.

Por este motivo, se puso una recompensa por los osos por los interesados del sector forestal, ya que se pensaba que los osos reducirían la rentabilidad de los bosques para la madera. los cazadores mataron decenas de miles de osos contratados por las empresas madereras. En la década de los 90 del siglo XX, se descubrió que los osos beneficiaban realmente los bosques por traer minerales marinos, particularmente fósforo y nitrógeno, debido a su forrajeo de salmones y truchas en los ríos adyacentes a los bosques. Una de las razones por las cuales los bosque de crecimiento de tierras bajas son mucho más grandes que los bosque de crecimiento antiguo de varios miles de pie en elevación (1 pie, 0,3048 metros), por encima del límite de migración de los peces, es que los peces transportan los cadáveres de los peces a la orilla, beneficiando a los árboles adyacentes con fósforo y otros minerales que influencias el crecimiento de los árboles. Los seres humanos son particularmente adeptos a tomar decisiones contrarias a sus mejores intereses a largo plazo debido a una mala comprensión fundamental acerca de las interconexiones de la naturaleza.

En Stamets, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, 1993, págs. 42-43, el inventor actual declaró "Durante 6 semanas nuestras abejas atacaron una cama de *Stropharia* rey, exponiendo el micelio al aire, y succionaron el citoplasma rico en azúcar de las heridas. se podía rastrear un convoy continuo de abejas, de la mañana a la tarde, desde las colmenas a la mancha de setas, hasta que la cama de *Stropharia* rey de derrumbo literalmente. Cuando se publicó un informe de este fenómeno en el Harrowsmith Magazine (Ingle, 1988), los apicultores de toda América del Norte me escribieron para explicar que habían estado desconcertado durante mucho tiempo por la atracción de las abejas a las pilas de aserrín". Aunque puede no resultar evidente para una persona normalmente experta en la materia si las abejas fueron atraídas hacia el micelio, la lignina del aserrín o las resinas de madera dentro del aserrín, el inventor concluyó "Ahora está claro que las abejas estaban buscando el micelio de setas dulce subyacente".

Se necesita una solución urgente a los problemas del declive de la salud de las abejas y del trastorno de colapso de colonias. El documento WO2012/018266 describe métodos para controlar el crecimiento de un patógeno de las abejas que comprende proporcionar un cultivo de un hongo en el interior o próximo a una colmena. El documento US6.660.290 describe la etapa micelial no esporulante preconidial de hongos entomopatógenos como un bioinsecticida eficaz y describe composiciones de micelio preconidial y métodos eficaces para atraer insectos. WO2006/121350 describe cepas de hongos entomopatógenos, composiciones y métodos para el uso de dichos hongos como agentes de control biológico.

El documento US6.183.742 describe métodos para tratar enfermedades humanas o animales, incluyendo enfermedades de abejas, incluyendo enfermedades inflamatorias, administrando una lisozima dimérica purificada para la estimulación no específica del sistema inmunitario, mecanismos regenerativos, e inmunomodulando una

respuesta humoral en un ser humano o animal sometido a inmunosupresión.

Divulgación de la invención

- 5 La presente invención proporciona una composición para su uso en la mejora de la salud de las abejas, como se define en las Reivindicaciones 1, 9 10 y15. El presente inventor observa la intersección y la interacción de diversos métodos y composiciones micológicas como una posible solución integrada a CCD. Cada uno de estos elementos puede ser suficiente para producir un efecto que conduce a evitar o reducir el CCD. Como una plataforma integrada de soluciones parciales, la totalidad de estos métodos conseguirá un beneficio sinérgico. Más particularmente, la
10 presente invención se centra en los efectos de potenciación antivíricos y de la longevidad de extractos de micelio cultivado puro diluidos dentro de intervalos específicos, que ofrecen beneficios a las abejas.

- La base de estas composiciones y métodos incluye los exudados y extractos extracelulares preparados del anterior, del micelio cultivado puro, antes de la formación del cuerpo fructífero, en las especies de hongos de Agaricales,
15 Poliporales e Himenocetales combinadas o independientemente. Puede utilizarse opcionalmente el micelio y los extractos preconidiales del micelio preconidial de los hongos entomopatógenos para controlar los ácaros y otros parásitos de las abejas y la colmena. Las mezclas de estos extractos y productos de las abejas tales como el alimento de las abejas o aerosoles para el tratamiento de las abejas ofrecen múltiples soluciones para ayudar a prevenir el CCD o ayudar a las abejas a superar el CCD. Se derivarán soluciones sostenibles a los problemas de plagas de las abejas de la promoción de sus defensas naturales mediante la potenciación del hábitat a través de hongos beneficiosos, tales como introducir hongos formadores de setas que tengan propiedades antivíricas para la
20 madera, produciendo podredumbre, y en última instancia, humedecer las cavidades que pueden ser útiles para las abejas.

- 25 El inventor ha aislado diversas cepas de hongos formadores de setas, incluyendo *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, y *Psilocybe azurescens* que han demostrado capacidades superiores para "biorremediar" o "micorremediar" diversas toxinas, incluyendo aceite, pesticidas y gases nerviosos tales como Sarín, Somán y VX (dimetilmetilfosfonato), trabajando con Battelle Laboratories, un informe público del cual se publicó en Jane's Defence Weekly. (Fungi could combat chemical weapons, *Jane's Defence Weekly*, 1999. 32(7):37.)

- 30 El inventor ha aislado también diversas cepas de hongos, incluyendo *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma annularis*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Irpex lacteus*, *Phellinus linteus*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus umbellatus*, *Schizophyllum commune*, y *Trametes versicolor* que han demostrado propiedades antivíricas, antibacterianas, antifúngicas y antiprotzoarias superiores.

- Sin quedar ligado a teoría alguna, el inventor teorizaría que estas especies de setas son ricas en compuestos que regulan en exceso los genes para la detoxificación y defensa frente a contaminantes, pesticidas y patógenos en animales, incluyendo seres humanos y abejas. Cultivando y expandiendo repetidamente sectores no esporulantes
40 de hongos entomopatógenos, el inventor también descubrió que dicho micelio "preesporulante" o "preconidial" y los extractos del micelio preconidial emiten olores y fragancias (que varían del "caramelo de azúcar con mantequilla" de *Metarhizium anisopliae* y *Aspergillus flavus* a "cola de vainilla" y "dulce de navidad duro" de *Beauveria bassiana*) y sabores que son atractivos para los animales, incluyendo seres humanos e insectos no sociales y sociales, que ofrecen ventajas en el control de las plagas tales como los ácaros *Varroa*.

- 45 El inventor teoriza ahora que la colonización por *Fomitopsis* de la madera a partir del forrajeo del oso from y el sitio de entrada de la herida (véase anteriormente) conduciría a la producción de enzimas (lacasas, lignina peroxidadas, celulasas), ergosteroles y otros esteroides, micoflavonoides y especialmente matrices de polisacáridos complejos nutritivos que a menudo no solo ablandarían la madera, proporcionan agua, nutrición y emiten fragancias, todas las cuales atraerían abejas, mientras que los exudados celulares que se secretan por el micelio serían ricos en ácidos p-cumáricos y cumarinas y los glicósidos de los ácidos benzoico, cinámico y cumárico sustituidos y no sustituidos, estimulan todos la regulación en exceso de los genes innatos del citocromo p450 y las enzimas y proporcionan también agentes antivíricos y antibacterianos, expresados todos durante la descomposición del árbol infectado. Se exuda un complejo fúngico del néctar del árbol, que proporciona beneficios y refuerzos fisiológicos a la inmunidad
50 innata de las abejas mediante numerosas rutas a medida que se descomponen los árboles. En algunos casos, las abejas anidan dentro de estos troncos o en el suelo debajo de ellos, beneficiándose de un contacto a largo plazo. Las abejas pueden a continuación incorporar estos agentes beneficiosos en su miel, propóleo y panales con el fin de proteger las crías, la reina y, en última instancia, la colonia.

- 60 El inventor teoriza también que combinaciones de las especies fúngicas que incluyen, aunque no de forma limitativa, sus fenoles residentes por encima y por debajo tendrán consecuencias aditivas o incluso sinérgicas, incluyendo la regulación y la regulación en exceso de la sensibilización de nutrientes, los genes y sistemas metabólicos, de detoxificación, inmunidad y de péptidos antimicrobianos. Esta invención habla directamente del vínculo entre el contacto que las abejas tienen con los hongos que es beneficioso, no solo nutritivamente, sino especialmente en la
65 activación de las rutas del citocromo P450 para desactivar y metabolizar toxinas xenobióticas y antropógenas.

La invención actual proporciona una pluralidad de soluciones parciales para proporcionar a los científicos, granjeros, biotecnólogos, responsables políticos y líderes de opinión herramientas biológicas de remedios prácticos y escalables antes de que el colapso ecológico nos obligue a opciones siempre limitantes a medida que la biodiversidad cae en picado. las combinaciones de estas soluciones parciales proporcionan de forma acumulativa y sinérgica lo que es necesario para que las abejas superen el CCD.

Extractos de *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus* *Ganoderma resinaceum* (*Ganoderma lucidum* var. *resinaceum*) y *Schizophyllum commune* se ha encontrado ahora que son eficaces en la reducción de la carga vírica de las abejas melíferas y en la extensión de la vida de las abejas obreras. "como un entomólogo con 39 años de experiencia en el estudio de las abejas, No tengo conocimiento de ningún informe de materiales que extienda la vida de las abejas obreras más que esto" --Dr. Walter "Steve Sheppard, Catedrático, Department of Entomology, Washington State University, Pullman, Washington (comunicación personal). El inventor anticipa ahora, como consecuencia de la presente invención, como consecuencia de la reducción, que otras setas de políporo del bosque, por ejemplo, el políporo del abedul, *Piptoporus betulinus*, y otras numerosas especies de bosque tendrán mayores y menores efectos antivíricos y potenciadores de la longevidad sobre la salud de las abejas cuando los extractos del micelio cultivado puro se hacen crecer y se diluyen en un intervalo óptimo y se presentan como alimento, en el agua de alimentación, en la miel, dulces de polen, propóleo o incluso incorporadas en los marcos de madera utilizados para construir colmenas de abejas o incorporadas en tiras adherentes aplicadas a las colmenas de abejas. Las especies víricas predominantes de riesgo son el Virus del ala deformada, Virus del saco embrionario, Virus israelí de la parálisis aguda y el Virus Black Queen Cell, cada uno de los cuales puede exacerbar la actividad de otros virus, y patógenos, a medida que la inmunidad falla por el efecto acumulativo perjudicial de estos y otros múltiples factores estresantes.

Como señaló Albert Einstein, "No podemos resolver nuestros problemas con el mismo pensamiento que usamos cuando los creamos" Esta patente sigue esta filosofía ofreciendo una plataforma compleja de soluciones sinérgicas que se dirigen a una multiplicidad de problemas, que ayuda en última instancia a las abejas a superar el trastorno del colapso de colonias.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de supervivencia de las abejas en el tiempo cuando se proporcionan extractos dados del micelio de *Inonotus obliquus* (0,1 %, 1 % y 10 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada.

La FIG. 2 es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de supervivencia de las abejas en el tiempo cuando se proporcionan extractos dados del micelio de *Ganoderma resinaceum* (0,1 %, 1 % y 10 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada.

La FIG. 3 es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de supervivencia de las abejas en el tiempo cuando se proporcionan extractos dados del micelio de *Fomitopsis pinicola* (0,1 %, 1 % y 10 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada.

La FIG. 4 es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de supervivencia de las abejas en el tiempo cuando se proporcionan extractos dados del micelio de *Fomes fomentarius* (1 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada.

La FIG. 5 es un gráfico de Kaplan-Meier (producto-límite) que muestra la supervivencia estimada de la fracción de abejas que sobreviven en el tiempo cuando se proporcionan extractos dados del micelio de *Fomes fomentarius* (0,1 %, 1 % y 10 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada.

La FIG. 6 es un gráfico de barras que muestra las partículas víricas totales en una población de control y se proporcionan a las abejas extractos del micelio de *Inonotus obliquus* (0,1 %, 1 % y 10 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada en tiempo cero, una semana y dos semanas.

La FIG. 7 es un gráfico de barras que muestra las partículas totales en una población de control alimentada solo con agua azucarada y se proporcionan a las abejas extractos del micelio de *Ganoderma resinaceum* (0,1 %, 1 % y 10 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada en tiempo cero, una semana y dos semanas.

La FIG. 8 es un gráfico de barras que muestra las partículas víricas totales en extractos proporcionados a abejas del micelio de *Fomitopsis pinicola* (0,1 %, 1 % y 10 %) con agua azucarada con una población de control alimentada solo con agua azucarada en tiempo cero y una semana.

La FIG. 9 es un gráfico de barras que muestra las partículas víricas totales en extractos proporcionados a abejas del micelio de *Schizophyllum commune* (0,1 %, 1 % y 10 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada en tiempo cero y dos semanas.

La FIG. 10 es un gráfico de líneas que muestra el umbral del ciclo para el Virus Black Queen Cell en el tiempo en una población de control y se proporcionan extractos a abejas del micelio de *Inonotus obliquus* (1 %) y *Ganoderma resinaceum* (1 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada.

La FIG. 11 es un gráfico de líneas que muestra el umbral del ciclo del Virus del ala deformada en el tiempo en una población de control y se proporcionan a las abejas extractos del micelio de *Inonotus obliquus* (1 %) y

Ganoderma resinaceum (1 %) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada.

Mejor(es) modo(s) de llevar a cabo la invención y aplicabilidad industrial

las abejas están lidiando cada vez más con nuevos factores estresantes antropógenos. Durante cientos de millones de años los hongos han evolucionado para luchar contra los virus, bacterias y otros hongos; han evolucionado para infectar parásitos, incluyendo insectos; han desarrollado enzimas para romper las toxinas; y han desarrollado sustancias para regular en exceso dichos procesos. Esto significa que ofrecen un potencial tesoro nutracéutico de compuestos útiles para proteger las abejas y otros polinizadores de dichos riesgos, incluyendo una pluralidad de compuestos antiviricos, antibacterianos, antifúngicos y antiprotozoarios y compuestos útiles para regular en exceso los sistemas digestivo, de detoxificación e inmunitario de las abejas,

Sin pretender mantener ninguna teoría concreta, el inventor teoriza que los extractos de micelio fúngico modulan, inducen y aumentan específicamente la expresión de los genes metabolizantes de la detoxificación y xenobióticos, específicamente regulan en exceso todas las clases de genes de detoxificación, aumentan el metabolismo de los pesticidas en el intestino medio, funcionan como nutracéuticos que regulan los procesos inmunitarios y de detoxificación, regulan en exceso las rutas inmunitarias, metabólicas y de nutrientes (rutas metabolizantes de lípidos y glucosa) y que regulan en exceso los genes que codifican péptidos antimicrobianos. Por otra parte, las especies fúngicas seleccionadas soportan el microbioma de microorganismos beneficiosos en los sistemas de digestión de las abejas, y su compatibilidad es un puente importante de especie a especie, combinando los beneficiosos hongos de la madera en descomposición con los beneficiosos microbios residentes en el intestino posterior de las abejas. Se espera que los extractos de la presente invención sean prebióticos para el microbioma natural en los órganos digestivos de las abejas así como que confieran beneficios antiviricos, todo lo cual contribuye a extender la longevidad de las abejas y sus colonias, y su funcionalidad colectiva. Otra realización descrita en el presente documento es fermentar el micelio de las setas medicinales con *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc lactis*, *Streptococcus thermophilus* y bacteriófagos para preparar composiciones consumibles y ambientalmente aplicables beneficiosas para el microbioma de las abejas, animales (personas).

Debido a que las abejas están bajo el asalto de múltiples patógenos - ácaros, virus, microsporidia, protozoos, moscas de fólidos y exposición a contaminantes transmitidos por el aire - es de suma importancia el hallazgo de una sólida plataforma de protección de base amplia. Por ejemplo, desarrollar métodos para crear composiciones utilizando los exudados extracelulares del micelio de especies seleccionadas de hongos, incluyendo, aunque no de forma restringida *Stropharia rugoso-annulata* y otros miembros de las Strophariaceae, *Fomitopsis pinicola* y otros miembros de las Fomitopsidaceae y *Metarhizium anisopliae* y otros miembros de las Clavicipitaceae, pueden ayudar a evitar el trastorno de colapso de colonias. Se espera también que otras muchas especies de basidiomicetos y ascomicetos confieran beneficios similares en el transcurso de la investigación en los beneficios de exudados beneficiosos para las abejas secretados haciendo crecer en laboratorio, micelio cultivado puro.

Con respecto a los extractos fúngicos, se prefieren los extractos miceliarios a los "extractos de setas" debido a que las hifas producen exudados extracelulares que son ricos en agua, aceites, polisacáridos, aminoácidos, vitaminas B, cumarinas, ácidos p-cumáricos, fenoles y polifenoles, así como ergosteroles, enzimas, ácidos, incluyendo ácidos grasos, antibacterianos y antiviricos. Los hilos de hifas individuales del micelio emite aromas complejos que se volatilizan en el aire mientras que las setas tienden a ser nutritivamente densas pero no tienen el área de la superficie celular expuesta extensa al igual que la masa del micelio. El cuerpo fructífero de la seta está compuesto de hifas compactadas celularmente, laminadas juntas, de tal manera que solo una pequeña fracción de la masa micelial en el cuerpo fructífero está expuesta a la atmósfera. Por tanto los cuerpos fructíferos de las setas carecen de los atributos de fragancia del micelio del que forman parte. Debido a que estos exudados extracelulares pueden disolverse fácilmente en solución, estos exudados pueden incorporarse de forma más útil en enmiendas, tales como dulces de polen, soluciones o agua azucarada, aerosoles o aerosoles de plantas foliares para abejas, y son mejores atractores para las abejas y otros insectos que los cuerpos fructíferos de las setas. Esto no es actualmente obvio para los expertos en las técnicas de micología o entomología, que se han centrado más en los cuerpos fructíferos y las esporas de los cuerpos fructíferos, más bien que en el micelio.

Aunque las abejas pueden buscar las gotículas ricas en azúcar que exudan desde la madera podrida por el micelio, los extractos al 100 % - lo que las abejas estarían bebiendo - son demasiado potentes y tóxicos en la mayoría de las especies en su forma natural para ser beneficiosos. Incluso a un 10 %, una mayoría de extractos ensayados fueron tóxicos. Por tanto, si las abejas beben estas gotículas en la naturaleza, probablemente enfermarían, morirían prematuramente y no se cosecharán beneficios. El inventor y su equipo descubrieron, que cuando los extractos de cultivo puro en laboratorio se diluyeron mucho, hasta un 10 %, permaneció algo de la toxicidad, para cuando se diluyeron adicionalmente hasta un 1 % o un 1 % o menos, aumentó sustancialmente la longevidad, especialmente en la mediana edad, cuando las obreras están en el máximo de su vigor y son más productivas en su forrajeo y en la adquisición del polen. De manera similar, cuando se diluyeron los extractos, se observaron beneficios antiviricos al mismo tiempo que aumento la longevidad en diversas especies fúngicas ensayadas. Esto es especialmente importante ya que la reducción de la carga dañina del patógeno tiene un beneficio neto global para la calidad de la

salud general y el comportamiento de la colmena. Combinando extractos optimizados para la actividad antivírica con extractos optimizados para la longevidad, se anticipan mayores beneficios que cualquiera. Combinados con los beneficios de la longevidad, las abejas pueden ser más productivas como forrajeras, como amas de cría que tienen cuidado de las crías, y como auxiliares para el control de la higiene, con menos enfermedades y mejores capacidades para hacer frente a los factores estresantes exógenos. Esencialmente, los servicios que las abejas proporcionan internamente en la colmena, y externamente para el medio ambiente, están sustancialmente aumentados utilizando los métodos y composiciones descritos en esta invención.

La extracción de cultivos puros, micelio de laboratorio en sustratos esterilizados es sustancialmente diferente de la forma de micelio que se produce naturalmente - estructural, cuantitativa y cualitativamente. Por otra parte, el crecimiento del micelio del cultivo puro en arroz, por ejemplo, un sustrato no nativo, lejos de los otros numerosos microbios que se producen simultáneamente residentes en la madera que se descompone naturalmente, produce una sustancia presumiblemente diferente que exuda a partir de la madera en descomposición resplandeciente con miríadas de otros organismos (un gramo de madera que se está pudriendo de forma natural alberga cientos de otros microorganismos, incluyendo bacterias, protozoos, otros hongos, que cohabitan con o en el micelio de la madera en descomposición.). Por tanto, los exudados del micelio en bruto en la naturaleza, que contienen una pluralidad de organismos, son fundamentalmente diferentes y es improbable que beneficien a las abejas con los mismos beneficios antivíricos y de longevidad que se observan con los extractos de cultivos puros diluidos específicamente preparados a partir de micelio, como se describe en la invención actual. En otras palabras, las abejas se benefician de algunas alteraciones y manipulaciones por el inventor ajenas de la naturaleza: los exudados procedentes del micelio de cultivo puro deben estar muy diluidos en concentraciones individuales para mostrar beneficios. Tras el hallazgo de que los extractos iniciales son tóxicos, la mayoría de investigadores habían abandonado esta línea de investigación. De hecho, cuando el inventor propuso esta idea a los entomólogos y micólogos expertos en la materia, difirieron en comprometerse con el inventor ya que esperaban toxicidad, y no querían dañar a las abejas. Los resultados iniciales, irónicamente, confirmaron sus sospechas. Algunos incluso afirmaron que la idea del inventor era "absurda" y no querían tener nada que ver con esta.

Al igual que con los extractos botánicos, se esperaba que los extractos fúngicos fueran más eficaces que los constituyentes simples o los fármacos. Véase, por ejemplo, Elfawal *et al.*, Dried whole-plant *Artemisia annua* slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance to artemisinin, *Proc Natl Acad Sci USA* 112(3):821-6 (2015).

Solo recientemente, el investigador ha descubierto que el micelio tiene más genes activados que las setas que en última instancia se forman a partir de este. Como se señaló por Li *et al.*, 2013, "los genes que codificaban proteínas se expresaron más en los micelios o en las etapas primordiales en comparación con aquellos en los cuerpos fructíferos". Li *et al.*, "Complete mitochondrial genome of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*." PLoS ONE 8(8):e72038 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0072038.

Por otra parte, la estructura similar a red del micelio permite la evolución epigenética de las cepas que pueden evolucionar para emitir sustancias dirigidas específicamente para el beneficio de las abejas. Dichas mejoras son anticipadas por el inventor como un método para preparar cepas y composiciones más atractivas para las abejas y más adecuadas para ayudar a las abejas a superar el CCD.

Esencialmente, el inventor ha ideado un novedoso nutracéutico que es rico en una amplia matriz de cumarinas, fenoles y polifenoles; y agentes antivíricos, antifúngicos, antibacterianos y antiprotozoarios, y una amplia diversidad de metabolitos especializados tal como antioxidantes y antimutágenos, que se generan como resultado del micelio digiriendo granos o madera y son atractivos para las abejas y el apoyo de su defensa del hospedador frente a factores estresantes y enfermedades. Los extractos de setas utilizados medicinalmente para la salud humana tienen un beneficio inesperado para la salud de las abejas, incluyendo la disminución de los recuentos de antivíricos y la extensión de la vida útil de las abejas. De hecho, la contribución fúngica al propóleo y a la miel, así como al polen, aumenta los sistemas inmunitarios de las abejas, y por extensión, de las personas, a niveles complejos, fundamentales, específicos. El inventor señala que los extractos de micelio que crecen sobre madera a la que se ha inoculado grano se espera que contengan más polifenoles, cumarinas y compuestos que regulen en exceso los genes de la detoxificación y la inmunidad en las abejas, al contrario que los extractos de micelio que crecen mediante fermentación líquida.

Debido a que la naturaleza puede requerir décadas, incluso milenios, antes de que se puedan establecer nuevas asociaciones beneficiosas, con abejas incapaces de reaccionar de forma suficientemente rápida a la reciente llegada de nuevos herbicidas, pesticidas, fungicidas y mitocidas, los inventores pueden iniciar - el salto por delante de la evolución - proporcionando este proceso con estas especies fúngicas beneficiosas un papel principal en las rutas de la biología y bioquímica de las abejas para reforzar sus defensas del hospedador y evitar el CCD. La composición química del micelio fúngico es compleja y variable en y entre los diversos filos, familias y géneros de setas, rasgos que hacen de los extractos fúngicos una buena defensa contra las plagas y patógenos que evolucionan rápidamente.

ATRACTORES:

Un componente de la invención es el uso de extractos fúngicos, por lo cual, los extractos se generan a partir del micelio de poliporoide, especies de basidiomicetos y ascomicetos, para atraer a las abejas. Las abejas son atraídas por el polisacárido - rico en metabolitos extracelulares e intracelulares secretados por el micelio. En estos exudados

- 5 están los compuestos que atraen a las abejas, alimentándolas con nutrientes ricos en azúcar y otros nutrientes, proporcionan protección antivírica, antifúngica y antibacteriana, a la vez que refuerzan su resistencia a los pesticidas y mejoran la salud de la colonia y la producción de miel. De hecho, las mieles que mantengan estos componentes fúngicos podrían ofrecer beneficios medicinales a las abejas y otras especies animales, incluyendo seres humanos.
- 10 Estos exudados extracelulares de, por ejemplo, la *Stropharia* rey o la seta gigante de jardín (*Stropharia rugoso-annulata*), tienen un efecto atractor sobre las abejas, especialmente durante el tiempo cuando las plantas en floración o su preferencia están limitadas. Las abejas son atraídas por los extractos extracelulares así como el micelio vivo. Otras especies de setas no tóxicas, que pueden poseer o no propiedades antivíricas y de extensión de la vida, incluyendo setas de tiourea y medicinales, se espera que atraigan a las abejas en grados variables de una
- 15 manera similar.

- la fragancia agradable de *Stropharia rugoso-annulata* procedente de la desgasificación del micelio puede atraer a las abejas, Aunque ningún otro científico, según el conocimiento de este inventor, alguna vez ha descubierto o declarado esto. El actual inventor ha descubierto que el micelio de *Stropharia rugoso-annulata* emite una rica
- 20 esencia atractora similar a la de la flor. Las setas de cardo en el género *Pleurotus*, especialmente *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. lignatilis*, *P. sapidus*, *P. eryngii*, *P. populinus* y otras especies relacionadas emiten una fragancia agradable similar al anís, al igual que *Clitocybe odora*. otro candidato es el políporo de agallas divididas, *Schizophyllum commune*, Uno de los Basidiomicetos más comunes en todos los bosques, que produce una potente, fragancia dulce en cultivo, abrumando a veces los sentidos olfativos del personal de laboratorio, y es una fuente de
- 25 cumarinas y ácidos cumáricos. Curiosamente, solo aquellos *Schizophyllum commune* que crecen en masa, *in vitro*, sobre granos de cereales o madera sabrían alguna vez acerca de esta potente fragancia procedente de la desgasificación. El inventor no conoce a nadie más en sus 40 años de experiencia a quien haya mencionado o notificado sobre este fenómeno de la fragancia con esta especie. *Schizophyllum commune* es una de las especies de podredumbre blanca más prominentes en el bosque, a lo largo de las regiones templadas y tropicales del mundo, y crea madera dulce y suavizada de la que las abejas pueden beneficiarse. Muchas otras especies emiten
- 30 probablemente fragancias atractivas para las abejas, que son indetectables para los seres humanos o no notablemente atractivas.

- El micelio de los Agaromicetos y los extractos preparados del micelio de cultivo puro pueden ser la fuente de nuevos atractores para las abejas. Los Agaromicetos son los únicos hongos que descomponen la lignina, e incluyen las setas con agallas, tales como *Stropharia rugoso-annulata*, y los políporos, tales como los relacionados con la especie *Fomitopsis*. Los Agaromicetos abarcan - 16.000 especies descritas. Muchos de los Agaromicetos descomponen dualmente la celulosa y la lignina. Las abejas nativas usan troncos podridos para anidar, como se ha descrito anteriormente junto con los osos, los hongos y las abejas, que el inventor teoriza que proporcionan a las
- 35 abejas compuestos ricos en azúcar que regulan en exceso y codifican el citocromo P450 mediante gotículas de agua y néctar secretado por el micelio de los Agaromicetos.

- En la actualidad, ¡nuestros bosques regenerados tienen aproximadamente 10-15 % de desechos de la madera en comparación con los bosques nativos! Esta pérdida relativamente reciente de desechos de madera que se pueden descomponer limita la disponibilidad de estos hongos beneficiosos y de las abejas importadas, introduciendo un
- 45 factor de estrés adicional no notificado hasta ahora. La limitación continuada de desechos erosiona además los campos, esenciales para las redes alimentarias no solo para las abejas, sino también para la mayoría de organismos que son dependientes de ecosistemas sanos y sostenibles.

- Por ejemplo, los extractos fúngicos del micelio preconidial (previo a la esporulación) de hongos que no forman parte de los Agaromicetos, incluyendo *Metarhizium anisopliae* y *Aspergillus flavus*, se han mostrado por el inventor para atraer moscas de fóridos (y otros insectos) (Véanse las patentes de Estados Unidos números 6.660.290, 7.122.176, 7.951.388, 7.951.389 y 8.501.207), detienen su migración, y evitan, por tanto, que estas moscas vectoricen enfermedades. Por otra parte, los ácaros hospedadores de patógenos son también atraídos y dejan de moverse en
- 50 las colonias de abejas introduciendo estos extractos basados en micelio, reduciendo por tanto no solo las cargas dañinas de patógenos que transportan los ácaros, sino reduciendo también las cantidades de ácaros que pueden infectar de otra manera las abejas. Se pueden utilizar, si es necesario, similares estrategias para controlar las plagas de las colmenas, como las polillas de la cera mayores y menores y el pequeño escarabajo de la colmena. Por otra parte, se pueden seleccionar las cepas de estos hongos entomopatógenos previos a la esporulación para su
- 60 tolerancia térmica alta y sus capacidades para atraer y matar ácaros y moscas que pueden perjudicar a las abejas o vectorizar patógenos. La investigación en tecnologías posteriores a la esporulación y basadas en esporas de *Metarhizium anisopliae* (que pueden tener la desventaja de repeler ácaros y/o insectos en comparación con la capacidad atractora del micelio preconidial) han demostrado la relativa facilidad con la que se pueden seleccionar las cepas para la tolerancia térmica a altas temperaturas de la colmena y alta patogenicidad y/o mortalidad de los
- 65 ácaros *Varroa*. Acosta-Rodriguez et al., Selection of entomopathogenic fungi to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), *Chilean J. Agric. Res.*, 69(4): 534-540 (2009); Acosta-Rodriguez et al., Evaluation of *Metarhizium*

anisopliae var. *anisopliae* Qu-M845 isolate to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in laboratory and field trials, *Chilean J. Agric. Res.*, 69(4): 541-547 (2009); Boyle, New Brunswick Department of Agriculture, Aquaculture and Fisheries, Integrated Pest Management - Compatible Biological Control of Varroa Mite of Honey Bee; Fungi help combat honeybee killer, BBC News Science/Nature, 9 de agosto de 2002.

Por otra parte, el inventor ha mostrado claramente que el micelio preconidial de los hongos entomopatógenos, tales como, aunque no de forma limitativa, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y especies de *Cordyceps*, estimula una respuesta estimuladora de la alimentación (fagoestimulación) en muchos insectos y otros artrópodos del olor y posterior ingestión de los extractos preparados a partir de micelio preesporulante (preconidial). Sin embargo, las abejas muestran una única tolerancia a las toxinas procedentes de las esporas y el micelio de *Metarhizium anisopliae* que perjudica a los ácaros y a las moscas de fóridos. Teniendo por tanto una mezcla de hongos entomopatógenos, antes de la esporulación, o extractos de los mismos, mezclados con las esporas (conidios) de los mismos hongos, podría estimularse a las abejas a consumir más micelio y los extractos de los mismos, incluyendo los hongos políporos beneficiosos, dan como resultado un único conjunto de ventajas sinérgicas, que incluye factores de longevidad, efectos antiviricos, antibacterianos y antifúngicos, las regulaciones en exceso de las rutas de detoxificación del citocromo (p450), que proporcionan azúcares complejos, vitaminas y nutrientes, disminuyen a la vez la toxicidad de los insecticidas antropógenos, herbicidas, fungicidas, toxinas antropógenas y reducen también las poblaciones de ácaros y moscas de fóridos, introduciendo a la vez todas las especies fúngicas que soportan un microbioma bacteriano del intestino de la abeja sana. Cada uno de estos factores ayuda a las abejas a reducir los factores estresantes de los trastornos de colapso de colonias. La combinación de estos beneficios en un sistema de administración - como una composición o un método - es una estrategia sin precedentes, al leal saber y entender de este inventor. Los métodos para seleccionar y optimizar cepas en cada especie dará como resultado probablemente mejoras a medida que cada variable se ensaya y combina.

Los seres humanos se encuentran limitados para percibir las longitudes de ondas de los colores o la luz desde aproximadamente 390 a 750 nanómetros (nm). Las abejas, de forma similar a muchos insectos, ven colores desde aproximadamente los 300 a los 650 nm. Muchas especies de setas similares a las setas de cardo (*Pleurotus ostreatus*) son estimuladas en la fructificación alrededor de los 360 nanómetros, más allá del límite de nuestra capacidad de detección. (Véanse los espectros de acción para la agregación de las hifas, la primera etapa de la fructificación, en el basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, Richartz y Maclellan en *Photochemistry and Photobiology* páginas 815-820, mayo de 1987. El micelio de la seta absorberá algo de esta luz y reflejará mucha de esta, debido a las limitaciones de la absorción a través de las paredes de las células hialinas translúcidas del micelio.

Cuando el micelio crece en profundidad en la madera o el suelo alcanza la superficie del suelo o de la madera, y se expone a la luz, se produce un cambio de fase en el ciclo de vida de la seta, pasando del micelio a las primeras etapas de formación de la seta, la agregación de las hifas y la formación del primordio ('setita'). El micelio en muchas especies no forma primordios a no ser que exista una exposición a la luz próxima al ultravioleta o de 360 nanómetros o de longitudes de onda inferiores. Esto está bien comprendido en el intervalo que las abejas pueden detectar, pero más allá de los límites de que los humanos puede observar.

El atractivo del micelio estimulado por luz azul invisible a los seres humanos pero visible a las abejas es un descubrimiento muy significativo ya que las abejas son más fáciles de entrenar para asociarse al alimento en las longitudes de onda de color ultravioleta. Como Menzel y Backhaus determinaron en 1989, las abejas podrían aprender más rápidamente cuando se asocia el alimento con luz violeta en comparación con los demás colores. Menzel, R. y Backhaus, W. 1989. "Color vision in honey bees: Phenomena and physiological mechanisms". En D. Stavenga y R. Hardie (eds.): *Facets of vision*, Berlin-Heidelberg-Nueva York: 281-297.

Por tanto, las abejas hallan la superficie del micelio, en el momento que los nutrientes están siendo canalizados en el micelio formador de primordio previo o primordio en respuesta a longitudes de onda de luz violeta, y cuando esta luz es crítica para estimular el micelio y convertirlo en la formación de setas, dicha detección por las abejas sería un momento adecuado para encontrar la superficie del micelio y capturar la nutrición densa cuando el micelio esta, de esta manera, metabólicamente activo. Aunque teorizada y especulada por este inventor, esta interacción merece una investigación adicional debido a que se puede entrenar a las abejas a descubrir el alimento basándose en las asociaciones de los espectros de luz. Este elemento adicional de la presente invención puede acelerar el proceso de aprendizaje de las abejas para encontrar nuevas fuentes de alimento utilizando los atributos del micelio. Como resultado, las realizaciones de la presente invención proporcionan también el beneficio de potenciar la utilidad y el atractivo de otras formas de alimentos para ayudar a la salud de las abejas utilizando estas propiedades miceliarias anteriormente mencionadas, particularmente, ayudar a las abejas a descubrir el micelio en las etapas de formación del primordio.

La superficie del micelio desgasifica dióxido de carbono y exuda fragancias, y este inventor teoriza que las abejas pueden detectar el micelio no solo por su olor, sino que son atraídas por la respuesta del micelio a esta luz del espectro azul, con lo cual, el micelio de la seta comienza a empaquetar proteínas, vitaminas y nutrientes ricos en azúcar en la interfase entre el entorno con alto contenido de dióxido de carbono en los sustratos y los entornos muy oxigenados, justo anteriormente y al hacerlo, construye un primordio nutricionalmente denso, pero accesible - la primera etapa de la formación de la seta o de la formación de los basidioesporos (como en el caso de los políporos

resupinados similares a especies de *Inonotus*, que forman superficies de himenios, o costras, que están muy brillantemente coloreadas, tales como *Inonotus andersonii*). Muchos de los pigmentos fúngicos brillantemente coloreado, especialmente, aunque no de forma limitativa, los de color amarillento, presentan un micelio que puede estar compuesto de bioflavonoides fúngicos, muchos de los cuales son polifenoles. muchos de los cuales son

lisosomotróficos. Explorando este rico entorno de la interfase - la superficie de las membranas miceliares fúngicas amarillentas expuestas a la atmósfera - que el inventor anticipa que es un rico reservorio para las abejas para cosechar metabolitos extracelulares e intracelulares dotado de nutrientes y compuesto de apoyo inmunitario, incluyendo "micoflavonoides" y "micoesteroles" que incluyen fenoles y polifenoles no limitados a las cumarinas y derivados del ácido benzoico y cinámico incluyendo ácidos cumáricos y sus glicósidos.

A modo de ejemplo, aunque no de forma limitativa, los micelios de algunas especies, especialmente en los géneros *Phellinus* e *Inonotus*, producen pigmento amarillentos brillantemente coloreados en su micelio que incluyen polifenoles, por ejemplo, hispolones tales como 6-(3,4-Dihidroxifenil)-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona, (C₁₂H₁₂O₄) un grupo bioactivo de compuestos de colores amarillos brillantes con propiedades potenciadoras antioxidantes e inmunitarias derivadas de las especies de políporos tales como *Inonotus hispidus* y *Phellinus linteus*. el inventor teoriza que estos micelios coloreados amarillentos brillantes atraerían adicionalmente a las abejas que forrajeaz azúcares, polifenoles, humedad, nutrientes naturales y otras secreciones que tienen propiedades antivíricas de construcción inmunitaria, antibacterianas, antifúngicas y antiprotozoarias. Debido a que las abejas son atraídas especialmente a los colores amarillo, aquellas especies de hongos, tales como *Phellinus* e *Inonotus*, que producen colores amarillentos brillantes, podrían atraer preferentemente a las abejas y asociarse también directamente con los polifenoles amarillentos que contienen cumarinas para ayudar a las abejas a activar sus rutas enzimáticas del citocromo P450. El presente inventor observa el crecimiento de estas especies descomponedoras de la madera que producen micelios pigmentados brillantemente como candidatas preferidas para diseñar plataformas y extractos de micelios para ayudar a las abejas. Por consiguiente, los extractos de micelio formadores de primordios y los extractos de micelio coloreado son atractores preferidos por las abejas.

El micelio en muchas especies fúngicas no formará estructuras esporulantes, incluyendo, aunque no de forma limitativa, la formación de la seta; se prefieren también dichos hongos para estudiar sus extractos miceliares para la capacidad atractora y la salud de las abejas.

VIRUS, HONGOS, BACTERIAS Y PROTOZOOS:

Las abejas infectadas por virus pueden perder la función inmunitaria, así como la capacidad de llevar a cabo otras funciones metabólicas, como resultado de los virus "que secuestran" la maquinaria ribosómica en su beneficio, que interfieren químicamente con la cascada crucial de la fenoloxidasa, suprimiendo respuestas inmunitarias antes de que se inicien, que manipulan la red de señalización inmunitaria del hospedador, deshabilitando los péptidos antimicrobianos del hospedador, interfiriendo con la respuesta del ARNi y/o creando "superantígenos" que pueden abrumar el sistema inmunitario del hospedador y afectar de otra forma de manera adversa la salud de las abejas.

La dependencia exclusiva de los virus de la maquinaria celular del hospedador para su propagación y supervivencia los hace muy susceptibles a las características del entorno celular similares a la interferencia mediada por el ARN pequeño. Esto también proporciona al virus una oportunidad para luchar y/o modular el hospedador para satisfacer sus necesidades. Por tanto, el intervalo de interacciones posibles a través de la interferencia del miARN. ARNm en la interfase hospedador-patógeno es grande. Estas interacciones se pueden ajustar aún más en el hospedador mediante cambios en la expresión génica, mutaciones y polimorfismos. En el patógeno, la elevada tasa de mutaciones añade complejidad a la red de interacción. Los virus producen tanto micro-ARN como micro-ARN del hospedador diana esenciales para el sistema inmunitario del hospedador. Scaria *et al.* (2006) Host-virus interaction: a new role for microRNAs, *Retrovirology*, 2006, 3:68; Oliver, Sick Bees - Parte 4: Immune Response to Viruses, American Bee Journal, noviembre de 2010.

El micelio de la seta produce una amplia matriz de compuestos que pueden ser antibacterianos o antivíricos. La patente de Estados Unidos 8.765.138 del inventor divulga la actividad antivírica de *Fomitopsis officinalis*, que incluye la actividad contra los virus de la gripe aviar y el herpes simple I y II. Se anticipa que otros virus son sensibles a los antivíricos que se están codificando y expresando por el micelio de *Fomitopsis officinalis*, y de hecho muchas especies en los hongos poliporaceae y Basidiomicetos. Los extractos miceliares son activos contra numerosos virus que perjudican a las abejas, particularmente, aunque no de forma limitativa BQCV (Virus Black Cell Queen), IAPV (Virus israelí de la parálisis aguda), DWV (virus del ala deformada), TRV (Virus de la mancha anular del tabaco), y sus parientes. Los principios activos limitantes de los virus en los extractos son variados, pero dos grupos son polifenoles que incluyen cumarina y esteroides que incluyen ácidos deshidosulferínicos, ácidos eburicoicos y compuestos relacionados. Los beneficios sinérgicos entre estos polifenoles y esteroides pueden reforzar además las defensa del hospedador de las abejas. Estos compuestos son residentes en los complejos que incluyen ácidos grasos, lípidos y esteroides. Por tanto, otros muchos principios activos relacionados con los ácidos grasos, lípidos y esteroides que tienen propiedades antivíricas se espera que sean beneficiosos para las abejas. Muchos de estos compuestos anteriormente mencionados conocidos como bioflavonoides, y las especies que los producen, son de interés debido a que algunas de estas especies producen micelio con colores amarillentos brillantes, que pueden servir también para atraer a las abejas. Muy poco trabajo, si lo hay, se ha llevado a cabo por los micólogos para

detectar los "colores" de la madera miceliada visible a las abejas pero invisible, o casi así, al ojo humano, especialmente la luz reflejada en las bandas del ultravioleta.

El inventor ha descubierto también las propiedades antibacterianas de los extractos miceliares de *Fomitopsis officinalis* contra los estafilococos, la tuberculosis y las bacterias *E. coli*. Esta actividad antibacteriana es probable que confiera una capa adicional de protección frente a las enfermedades transportadas por otros organismos. Estos extractos tendrán de forma similar una influencia positiva en la limitación de los efectos perjudiciales de las bacterias aún por descubrir que son perjudiciales para las abejas, animales y plantas. Véase la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 13/998.914 y las solicitudes anteriores relacionadas.

Se espera que las sustancias de las especies de setas medicinales útiles en los seres humanos demuestre de forma similar ser útiles en la regulación en exceso de genes inmunitario y beneficiar el sistema inmunitario de las abejas. debido a que muchos genes se han conservado de forma evolutiva o similar, se espera que los extractos del micelio de dichas setas será útil de forma similar en los genes que regulan en exceso y sistemas en las abejas para degradar y hacer frente a las infecciones.

La dosis eficaz varía de especie a especie, En parte por que los extractos pueden ser, en común con la mayoría de las medicinas, medicinales a dosis bajas y tóxicos a dosis altas. Además, algunas especies tales como *Fomitopsis officinalis* pueden tener fuertes efectos antivíricos y un umbral tóxico menor en comparación con otras especies medicinales. El intervalo de dosis utilizado en la presente invención es de 0,01 % a 1 % en volumen del extracto. La presente invención se describe en las reivindicaciones 1 a 15.

Las setas medicinales y el micelio de las setas medicinales se definen como setas y micelio que ayudan a la salud y a la nutrición. En el contexto de las abejas, esto incluye las setas y el micelio que tienen el efecto de aumentar la longevidad, aumentar las capacidades de forrajeo, aumentar la resistencia a las enfermedades, aumentar la capacidad de detoxificar las toxinas antropógenas, aumentar la resistencia a los parásitos, poseer actividad antivírica, antibacteriana y/o antifúngica, y aumentar la capacidad de las abejas de resistir mejor los factores estresantes asociados con el complejo denominado en su conjunto 'trastorno de colapso de colonias'.

Los géneros fúngicos útiles y preferidos incluyen, a modo de ejemplo, aunque no de forma limitativa: las setas con agallas (Agaricales) *Agaricus*, *Agrocybe*, *Armillaria*, *Clitocybe*, *Collybia*, *Conocybe*, *Coprinus*, *Coprinopsis*, *Flammulina*, *Giganopanus*, *Gymnopilus*, *Hypholoma*, *Inocybe*, *Hypsizygus*, *Lentinula*, *Lentinus*, *Lenzites*, *Lepiota*, *Lepista*, *Lyophyllum*, *Macrocybe*, *Marasmius*, *Mycena*, *Omphalotus*, *Panellus*, *Panaeolus*, *Sarcomyxa*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Pluteus*, *Psathyrella*, *Psilocybe*, *Schizophyllum*, *Stropharia*, *Termitomyces*, *Tricholoma*, *Volvariella*, etc.; las setas políporas (Polyporaceae) *Albatrellus*, *Antrodia*, *Bjerkandera*, *Bondarzewia*, *Bridgeoporus*, *Ceriporia*, *Coltricia*, *Coriolus*, *Daedalea*, *Dentocorticium*, *Echinodontium*, *Fistulina*, *Flavodon*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Gloeophyllum*, *Grifola*, *Heterobasidion*, *Inonotus*, *Irpex*, *Laetiporus*, *Meripilus*, *Oligoporus*, *Oxyporus*, *Phaeolus*, *Phellinus*, *Piptoporus*, *Polyporus*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Schizopora*, *Trametes*, *Wolfiporia*; las setas dentadas *Hericium*, *Sarcodon*, *Hydnum*, *Hydnellum* etc.; Basidiomicetos tales como *Auricularia*, *Calvatia*, *Ceriporiopsis*, *Coniophora*, *Cyathus*, *Lycoperdon*, *Merulius*, *Phlebia*, *Serpula*, *Sparassis* y *Sternum*; Ascomicetos tales como *Cordyceps*, *Ophiocordyceps*, *Morchella*, *Tuber*, *Peziza*, etc.; los "hongos gelatinosos" tales como as *Tremella*; las setas con micorrizas, hongos tales como *Phanerochaete* (incluyendo aquellos tales como *P. chrysosporium* con un estado imperfecto y *P. sordida*).

las especies y géneros fúngicos adecuados incluyen solo a modo de ejemplo, aunque no de forma limitativa: *Agaricus augustus*, *A. blazei*, *A. brasiliensis*, *A. brunnescens*, *A. campestris*, *A. liliceps*, *A. placomyces*, *A. subrufescens* y *A. sylvicola*, *Acaulospora delicata*; *Agrocybe aegerita*, *A. praecox* y *A. arvalis*; *Albatrellus hirtus* y *A. syringae*; *Alpova pachyploeus*; *Amanita muscaria*; *Antrodia carbonica*, *A. cinnamomea* y *A. radiculosa*; *Armillaria bulbosa*, *A. gallica*, *A. matsutake*, *A. mellea* y *A. ponderosa*; *Astraeus hygrometricus*; *Athelia neuhoffii*; *Auricularia auricula* y *A. polytricha*; *Bjerkandera adusta* y *B. adusta*; *Boletinus merulioideus*; *Boletus punctipes*; *Bondarzewia berkeleyi*; *Bridgeoporus nobilissimus*; *Calvatia gigantea*; *Cenococcum geophilum*; *Ceriporia purpurea*; *Ceriporiopsis subvermispora*; *Clitocybe odora*, *Collybia albuminosa* y *C. tuberosa*; *Coltricia perennis*; *Coniophora puteana*; *Coprinus comatus*, *C. niveus* y 'Inky Caps'; *Cordyceps bassiana*, *C. variabilis*, *C. facis*, *C. subsessilis*, *C. myrmecophila*, *C. sphecocephala*, *C. entomorrhiza*, *C. gracilis*, *C. militaris*, *C. washingtonensis*, *C. melolanthae*, *C. ravenelii*, *C. unilateralis*, *C. clavulata* y *C. sinensis*; *Cyathus stercoreus*; *Daedalea quercina*; *Dentocorticium sulphurellum*; *Echinodontium tinctorium*; *Fistulina hepatica*; *Flammulina velutipes* y *F. populicola*; *Flavodon flavus*; *Fomes fomentarius*, *F. lignosus*; *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis cana*, *F. subtropica* y *F. pinicola*; *G. resinaceum*, *annularis*, *G. australe*, *G. atrum*, *G. brownii*, *G. collosum*, *G. sinensis*, *G. lingzhi*, *G. curtisii*, *G. japonicum*, *G. lucidum*, *G. lucidum* var. *resinaceum*, *G. neo-japonicum*, *G. oregonense*, *G. sinense*, *G. tornatum* y *G. tsugae*; *Gigaspora gigantia*, *G. gilmorei*, *G. heterogama*, *G. margarita*; *Gliocladium virens*; *Gloeophyllum saeparium*; *Glomus aggregatum*, *G. caledonium*, *G. clarus*, *G. fasciculatum*, *G. fasciculatus*, *G. lamellosum*, *G. macrocarpum* y *G. mosseae*; *Grifola frondosa*; *Gymnopus dryophilus*, *Gymnopus peronatus*, *Hebeloma anthracophilum* y *H. crustuliniforme*; *Hericium abietis*, *H. coralloides*, *H. erinaceus* y *H. capnoides*; *Heterobasidion annosum*; *Hypholoma capnoides* y *H. sublateritium*; *Hypsizygus ulmarius* y *H. tessulatus* (= *H. marmoreus*); *Inonotus hispidus* y *I. obliquus*; *Irpex lacteus*; *Lactarius deliciosus*; *Laetiporus sulphureus* (= *Polyporus sulphureus*), *L. conifercola*, *L. cinnacinatus*; *Lentinula edodes*; *Lentinus lepideus*, *L. giganteus*, *L. ponderosa*, *L. squarrosulus* y *L. tigrinus*; *Lentinula species*;

Lenzites betulina; *Lepiota rachodes* y *L. procera*; *Lepista nuda* (= *Clitocybe nuda*); *Lycoperdon lilacinum* y *L. perlatum*; *Lyophyllum decastes*; *Macrocybe crassa*; *Marasmius oreades*; *Meripilus giganteus*; *Merulius incarnatus*, *M. incrassata* y *M. tremellosus*; *Morchella angusticeps*, *M. crassipes* y *M. esculenta*; *Mycena citricolor*, *M. alcalina* y *M. chlorophos*; *Omphalotus olearius*; *Panellus stypticus*, *P. serotinus*; *Paxillus involutus*; *Phaeolus schweinitzii*; *Phellinus igniarius*, *P. pini*, *P. linteus* y *P. weirii*; *Pholiota nameko*, *P. squarrosa*, *Piloderma bicolor*, *Piptoporus betulinus*; *Pisolithus tinctorius*; *Pleurotus citrinopileatus* (= *P. cornucopiae* var. *citrinopileatus*), *P. cystidiosus*, (= *P. abalonus*, *P. smithii*), *P. djamor* (= *P. flabellatus*, *P. salmoneo-stramineus*), *P. dryinus*, *P. eryngii*, *P. lignatilis*, *P. euosmus*, *P. nebrodensis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* (= *P. sajor-caju*) y *P. tuberregium*; *Pluteus cervinus*; *Polyporus indigenus*, *P. saporema*, *P. squamosus*, *P. tuberaster* y *P. umbellatus* (= *Grifola umbellata*); *Psathyrella hydrophila*, *Psilocybe allenii*, *aztecorum*, *P. azurescens*, *P. baeocystis*, *P. bohemica*, *P. caerulescens*, *P. coprophila*, *P. cubensis*, *P. cyanescens*, *P. hoogshagenii*, *P. mexicana*, *P. ovoideocystidiata*, *P. pelliculosa*, *P. semilanceata*, *P. serbica*, *P. subaeruginosa*, *P. tampanensis* y *P. weilii*; *Rhizopogon nigrescens*, *R. roseolus* y *R. tenuis* (= *Glomus tenuis*); *Schizophyllum commune*; *Schizopora paradoxa*; *Sclerocytis sisuosa*; *Serpula lacrymans* y *S. himantoides*; *Scleroderma albidum*, *S. aurantium* y *S. polyrhizum*; *Scutellospora calospora*; *Sparassis crispa* y *S. herbstii*; *Stereum complicatum* y *S. ostrea*; *Stropharia ambigua*, *S. aeruginosa*, *S. cyanea*, *S. albocyanea*, *S. caerulea*, *S. semiglobata*, *S. semigloboides*, y *S. rugoso-annulata*; *Suillus cothurnatus*; *Talaromyces flavus*; *Termitomyces robustus*; *Trametes elegans*, *Trametes T. gibbosa*, *T. villosa*, *T. cingulata*, *T. hirsuta*, *T. suaveolens* y *T. versicolor*, *Trichoderma viride*, *T. harmatum*; *Tricholoma giganteum* y *T. magnivelare* (Matsutake); *Tremella aurantia*, *T. fuciformis* y *T. mesenterica*; *Volvarella volvacea*; y numerosos hongos beneficiosos diferentes.

Las cepas preferidas que han mostrado características excepcionales útiles para la práctica de la presente invención, incluyen, a modo de ejemplo, aunque no de forma limitativa, *Fomes fomentarius* (estado de NY), *Ganoderma applanatum* (Cepa Duckabush), *Fomitopsis officinalis* (Cepas I, VI, X), *Fomitopsis pinicola* (Cepa I), *Ganoderma oregonense* (Lago Meadow), *Heterobasidion annosum* (Dosewalips), *Pleurotus ostreatus* (Cepas PW-OST, Nisqually), *Psilocybe azurescens* (Cepa Stamets), *Stropharia rugoso-annulata* (Cepa F), *Trametes versicolor* (Kamilche Point) and *Inonotus obliquus* (Stamets NY).

Los géneros y especies de setas adecuadas adicionales se pueden encontrar en guías de campo micológicas normalizadas tales como *Mushrooms Demystified* (1979, 1986) por David Arora, *The Audubon Society Field Guide to North American Mushrooms* (1981, 1995) por Gary Lincoff, y *Psilocybin Mushrooms of the World* (1996) por Paul Stamets. Se pueden encontrar listas completamente actualizadas de especies adecuadas basadas en el análisis del ADN más reciente en los proyectos de la web de Tree of Life and Encyclopedia of Life (EOL) web projects.

Los extractos del micelio de *Fomitopsis officinalis* concretamente, *Inonotus obliquus*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma resinaceum* y otras especies de las Polyporaceae generalmente, reducen la patogenicidad de los virus para las abejas reduciendo directamente las poblaciones de partículas víricas fortificando también a la vez los sistemas inmunitarios de las abejas, limitando por tanto su virulencia y transmisibilidad. Por otra parte, las abejas se benefician mejor de una combinación de una mezcla de los componentes antivíricos generados por el micelio con las propiedades antimicrobianas de las cumarinas y otros compuestos producidos por el micelio de *Fomitopsis officinalis*. Los exudados extracelulares secretados por el micelio de los hongos beneficiosos descritos en el presente documento tienen una combinación de estos constituyentes, pero equilibrada para tener el beneficio neto de atraer a las abejas de tal manera que se fortifiquen con la potenciación inmunitaria, y los constituyentes nutricionalmente beneficiosos. Este efecto multifacetado da como resultado la fortificación de los sistemas inmunitarios de las abejas y sus colonias, haciéndolas menos susceptibles a las enfermedades víricas, bacterianas, protozoarias y fúngicas mitigadas.

El presente inventor ha encontrado que las especies de *Ganoderma*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Fomitoporia*, *Ganoderma*, *Antrodia*, *Inonotus*, *Irpex*, *Lenzites*, *Phellinus*, *Sparassis*, *Hypholoma*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, y *Stropharia* demuestran fuertes propiedades antifúngicas y espera que esto las hará útiles para controlar los patógenos fúngicos que afectan a las abejas, incluyendo, aunque no de forma limitativa a las especies de *Nosema* y otros microsporidia patógenos, Crías calcificadas y Crías de piedra.

El primer antivírico de una seta que se descubrió fue el del políporo "Ice Man", *Fomes fomentarius*, contra el Virus del mosaico del tabaco, el primer virus que se descubrió, y se relacionó con el Virus de la mancha anular del tabaco. Esta seta poliporada es un saprofita en el abedul, hayas y otras maderas duras de hoja caduca. Cuando crece, la madera se ablanda, liberando la humedad, las fragancias que atraen a los insectos y endulzada con los ricos complejos de polisacáridos, así como proteínas y otras sustancias generadas por el micelio de este hongo. Este hongo atrae a los escarabajos cuyas madrigueras pueden ser ocupadas posteriormente por abejas nativas. Esencialmente, este es un ejemplo de lo que el inventor anticipa ser muchos ejemplos del papel que los políporos y otros hongos Basidiomicetos juegan al proporcionar nutrientes a las abejas. Curiosamente, *Fomes fomentarius* es un endofito conocido de los abedules - lo que significa que es parte del sistema inmunitario natural de los árboles. El inventor teoriza que muchos de estos hongos endofíticos confieren propiedades antivíricas a las plantas y las abejas - si se encuentra en una ventana diluida individual, así como otros insectos, que forrajean o anidad en la madera que hospeda estos hongos. Pero, si se encuentran en su forma pura, muchos de estos pueden, de hecho, ser tóxicos. Aquí es donde la intervención humana puede ayudar a evolucionar tendiendo un puente de beneficios antivíricos que de otro modo es poco probable encontrar en la naturaleza. El inventor cree que las dimensiones interrelacionales en

las que la biología de las abejas, hongos y árboles y plantas en descomposición intersectan llegarán a ser un área fértil de investigación científica para ayudar y hacer evolucionar ecosistemas durante las décadas por venir.

Los hongos agresivos de la madera en descomposición relacionados en esta solicitud compiten con otros muchos hongos para establecer su dominancia en los nichos ecológicos. Las especies de setas poliporadas, en particular, las especies de *Antrodia*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Heterobasidion*, *Inonotus*, *Stereum* y *Trametes*, producen propiedades antifúngicas, presentes en los extractos, que este inventor sugiere que serán eficaces contra *Nosema*, un parásito fúngico microsporidio que es una plaga de las abejas en todo el mundo.

Por supuesto, los osos no son el único medio para diseminar *Fomitopsis* en los árboles, y otros hongos que pueden mejorar la salud de las abejas. Cualquier actividad que da como resultado la creación de heridas en los árboles, o en crear madera muerta, crea una plataforma fúngica potencial de beneficio de las abejas. El uso humano de virutas de madera como 'corteza atractiva' o para hacer senderos o como cobertera alrededor de plantas ornamentales, serviría también para crear una plataforma micelial beneficiosa para las abejas. En última instancia, esto significa que se puede hacer crecer el micelio de estos hongos, en masa, en un estado previo a la esporulación o previo a la formación de conidios, preparando 'pistas de aterrizaje' miceliares para las abejas, o preparando extractos, y al hacerlo, crear una nueva generación de atractores de las abejas y una nutrición personalizada de acuerdo con ello.

Con estas hipótesis en mente, el inventor observa el uso de una amplia matriz de Basidiomicetos, hongos descomponedores de la madera para desarrollar un bioescudo fúngico, un "bioescudo para las abejas" de protección frente a los factores estresantes que conducen al trastorno de colapso de colonias.

Por otra parte, el efecto antibiótico sobre los parásitos microsporidos de las abejas, particularmente *Nosema apis*, la causa de 'Nosema' reclasificado recientemente como un hongo simple, demostrara que es un factor que se produce simultáneamente beneficioso.

Otra ventaja de la presente invención es el amplio intervalo de propiedades antivíricas, antibacterianas y antifúngicas derivadas del micelio. Muchas de las fracciones de extractos de micelio del inventor demuestran actividad antivírica incluso cuando la ruta de fraccionamiento bioguiada conduce a antibacterianos. Se piensa a menudo que los agentes microbianos de un tipo específico de microbio (existe algo de retrocruzamiento entre antibacterianos y antiparasíticos y ahora pueden ser al menos una clase con actividad antibacteriana y antifúngica), pero considerando como de difícil es alcanzar la especificidad antivírica sola, y la ausencia de dianas moleculares compartidas conocidas entre bacterias y virus que presentan también cualquier grado de selectividad con respecto al hospedador, es rara una amplia actividad antimicrobiana. Sin quedar ligado a teoría alguna, el inventor teorizaría que los extractos están actuando como inmunoestimuladores, inmunopotenciadores e inmunoestimuladores con efectos antivíricos, antibacterianos y antifúngicos.

Se teoriza que los componentes miceliares descritos anteriormente y/u otros compuestos conocidos y desconocidos tienen efectos antibacterianos y antifúngicos, ayudando a la inmunidad, y por tanto, la interacción entre abejas y extractos de micelio cultivado puro en concentraciones discretas es una ventaja no prevista de la presente invención.

Hyphodermella corrugata, *Polyporus umbellatus*, y *Piptoporus betulinus* son especies de las poliporales conocidas por el autor a partir de esta investigación que presentan unas fuertes propiedades antiprotozoarias. Se piensa que el ácido agárico es un agente responsable de la actividad antiprotozoaria de *Piptoporus betulinus*. Se produce también ácido agárico por *Fomitopsis officinalis*, y posiblemente por otras especies en las poliporales. La producción de acantocitos por *Stropharia rugoso-annulata*, conocida por matar nematodos, puede proporcionar también beneficios antiprotozoarios y antimicidas a las abejas. Por tanto, estas especies y las especies relacionadas se preferirían para ensayar la actividad antiprotozoaria y la regulación en exceso de los genes antiprotozoarios en las abejas.

PESTICIDAS:

Como las abejas están limitadas en el número y variedad de las enzimas necesarias para desnaturalizar las toxinas naturales y antropógenas, estas toxinas deterioran su inmunidad inicial, haciéndolas más susceptibles a los patógenos de numerosos vectores - desde ácaros *Varroa*, *Nosema* y hongos microsporidios, moscas de fóridos, y los virus y bacterias que transportan. Aumentando la capacidad de las abejas para degradar estas toxinas mediante la regulación en exceso de más genes del citocromo P450, los genes GST y/ los genes CCE, se mejora el estado inmunitario de las abejas para resistir mejor estos asaltos y otros factores de estrés. Por otra parte, proporcionando a las abejas una mezcla de extractos fúngicos que limita específicamente la gravedad de los asaltos de las moscas de fóridos, ácaros de *Varroa*, hongos *Nosema* y virus, se puede fortificar la salud de la colonia de abejas para la salud a largo plazo de las crías, las obreras, la reina y los zánganos. Estos componentes fúngicos se incorporan naturalmente en la miel y el propóleo, impartiendo por tanto una ventaja para el desarrollo de las generaciones. En última instancia, no solo se protegen las abejas, sino que se espera que aumenta la producción de miel, y la calidad de la miel soporte mejor la salud generacional y supervivencia posteriores.

Aquellas especies de setas útiles en la biorremediación ("micorremediación") de las toxinas, contaminantes y pesticidas, y los extractos de su micelio, se espera que contengan diversas sustancias útiles en la activación,

regulación en exceso y modulación de los genes necesarios para la biodegradación de los pesticidas. Debido a que muchos de dichos genes, o los sistemas tales como el sistema del citocromo, están evolutivamente conservados o de forma similar, se espera que los extractos del micelio de dichas setas será útil de forma similar en los genes que regulan en exceso y sistemas en las abejas para degradar y hacer frente a dichos pesticidas. Las especies útiles y preferidas incluyen las setas saprofitas *Pleurotus ostreatus* y otras especies de *Pleurotus*, *Trametes versicolor*, *Trametes elegans* y otras especies de *Trametes*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis* y *F. pinicola*, *Ganoderma lucidum*, *G. annulare*, *G. brownii*, *G. collosum*, *G. lingzhi*, *G. curtisii*, *G. oregonense* y *G. tsugae*[^], *Heterobasidion annosum*, *Inonotus obliquus*, *I. hispidus*, *Irpex lacteus*, *Laetiporus sulphureus*, *L. conifericola*, *L. cincinnatus*, *Polyporus umbellatus*, *Polyporus elegans*, *Polyporus squamosus*, especies de *Antrodia*, *Phaeolus schweinitzii*, *Boletus mirabilis*, *Gymnopus peronatus*, *Mycena alcalina*, *M. aurantiadisca*, *M. haematopus*, *Psilocybe azurescens*, *P. allenii*, *P. subaeruginosa*, *P. ovoideocystidiata*, *P. cubensis*, *P. cyanescens*, *Panaeolus cyanescens*, *Stropharia ambigua*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Stropharia coronilla*, *Hypholoma capnoides*, *H. fasciulare*, *H. aurantiaca* y otras especies en las Strophariodeae y Strophariaceae, *Lenzites betulinus*, *Pholiota adiposa*, *Pholiota terrestris*, *Pholiota nameko*, *Agrocybe aegerita*, *A. praecox*, *A. arvalis*, *Collybia tuberosa*, *Collybia*, *Psathyrella hydrophila*, *P. epimyces*, *Marasmius oreades*, y sus numerosos "géneros satélite" así como los otros géneros con agallas y de políporos y especies conocidas por la ciencia micológica como descomponedores primarios y secundarios de la celulosa y la lignina.

El micelio de las especies *Stropharia rugoso-annulata*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Schizophyllum commune*, *Trametes elegans*, *Trametes versicolor* y muchas especies poliporoides y basidiomicetos con agallas producen bioflavonoides, fenoles y polifenoles, incluyendo cumarinas y ácidos cumáricos (ambos, *trans*- y *cis*- o- y ácidos p-cumáricos) cuyos genes regulan en exceso en las abejas que codifican las enzimas del citocromo P450 así como otras enzimas críticas para la digestión, el metabolismo y la destrucción de toxinas. El efecto de estos componentes miceliares tales como cumarinas, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico o sus glicósidos, es que activan uno o más genes en las abejas que permiten a las abejas detoxificar un amplio intervalo de toxinas, particularmente insecticidas, miticidas, herbicidas, fungicidas y pesticidas, y aumentar la inmunidad innata de las abejas.

El ácido p-cumárico, se encuentra en granos y lignina, es un monómero de la esporopolenina, el principal constituyente de las paredes celulares del polen y el propóleo, los compuestos resinosos clasificados y procesados por las abejas para alinear las celdillas de cera. El ácido p-cumárico es esencial para aumentar la lacasa en los hongos que pudren la madera, una enzima celulasa que rompe la lignina en la madera, creando compuestos derivados sabrosos para los insectos como alimento, así como creando hábitats (las abejas pueden residir en túneles perforados por escarabajos micrófagos). A medida que los hongos pudren la madera, rompiendo la lignina, desprenden agua, rica en estos compuestos p-cumáricos y nutracéuticos beneficiosos para las abejas. La mayoría de ácido p-cumárico, la mayoría de lacasas expresadas por el micelio, la mayoría de podredumbres de la madera, la mayoría de polisacáridos fúngicos (azúcares) y en última instancia la mayoría de estos compuestos estará en exudados fúngicos que las abejas buscan y de los cuales se benefician. Estos hongos que pudren la madera producen ácidos p-cumáricos y cumarinas que se pueden bioconvertir en ácidos p-cumáricos son otra ventaja adicional de la presente invención.

Como señalaron Terrón *et al.*, los compuestos aromáticos estrechamente relacionados de forma estructural tienen diferentes efectos sobre la actividad de la lacasa y en la expresión del gen *lcc* en el hongo lignolítico *Trametes* sp. 1-62, *Fungal Genet. Biol.*, Oct 2004;41 (10):954-62: Se ensayaron "nueve compuestos fenólicos (ácido p-cumárico, ácido ferúlico, guaiacol, siringol, p-metoxifenol, pirocatecol, floroglucinol, ácido 3,5-dihidroxibenzoico, y siringaldazina) para su capacidad de aumentar la producción de lacasa en el basidiomiceto lignolítico *Trametes* sp. 1-62. Todos estos compuestos dieron como resultado un aumento en la actividad de la lacasa, detectándose niveles más altos en presencia de ácido p-cumárico (273 veces) y guayacol (73 veces)".

Curiosamente, muchos de los granos preferidos para la producción de micelios para la industria de las setas (véase *Growing Gourmet & Medicinal Mushrooms* por el inventor, Paul Stamets, 1993, 2000, Ten Speed Press, Berkeley) son también fuentes ricas de ácidos p-cumáricos y pueden ser útiles en las composiciones atractoras de abejas. Los ácidos fenólicos primarios en granos de arroz se identificaron como ácido p-cumárico, ácido ferúlico, y ácido sinapínico.

El ácido p-cumárico no está solo en los granos preferidos para la producción de micelio de seta pero se generan también durante el ciclo de vida normal de las setas, especialmente antes de la formación del primordio. El ácido p-cumárico es un potente inhibidor de la tirosinasa, la enzima esencial para la melanización. La presencia y abundancia del ácido p-cumárico interfiere con la producción e pigmentos coloreados oscuros. La luz ultravioleta estimula la fotodescomposición de los ácidos p-cumáricos, permitiendo la melanización y la estimulación de la formación del primordio. Una vez que se forma el primordio, los ácidos p-cumáricos se degradan en ácido p-hidroxibenzoico. Sachan *et al.*, Transforming p-coumaric acid into p-hydroxybenzoic acid by the mycelial culture of a white rot fungus *Schizophyllum commune*, 2010, *African Journal of Microbiology* 4:267-273. Como ejemplo, aunque no de forma limitativa, el micelio de *Auricularia auricula* (*A. auricularia-judae*), cuando crece en cultivo es blancuzco y carece de melanina, pero contiene ácidos p-cumáricos. Cuando el micelio de la seta se expone a la luz, el micelio se biotransforma para crear cuerpos fructíferos de color marrón oscuro, que tienen mayor cantidad de melanina ya que maduran, con ácidos p-cumáricos, un inhibidor de la melanina, disminuyendo simultáneamente. Este es un ejemplo y un argumento fuerte para el beneficio de utilizar un micelio ligeramente coloreado, la melanización previa como una

fuelle de micelio para preparar extractos beneficiosos para las abejas debido a su contenido innato de ácido p-cumárico compuesto por el contenido nativo de ácidos p-cumáricos en los granos que se usan para la producción del micelio, para hacer crecer el micelio. Curiosamente, la interfase ideal para capturar los mejores beneficios procedentes del micelio para sus contenidos nutracéuticos y de ácido p-cumárico, es una ventana corta, a menudo de exactamente unos pocos días de duración, antes y directamente después de la exposición de la luz, pero antes del desarrollo del cuerpo fructífero coloreado oscuro más allá de la etapa primordial blanca.

Dado que alguno de los productores más abundantes de lacasa ensayados adicionalmente han probado ser *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*, se prefieren específicamente estas especies para usar en la creación de mezclas beneficiosas para las abejas.

Cuando no están deprimidas inmunológicamente a partir de las toxinas de origen humano y naturales, la defensa natural del hospedador de las abejas puede proteger mejor las abejas de otros agentes perjudiciales, incluyendo virus y patógenos transmitidos por los ácaros *Varroa*.

A medida que nuestro conocimiento de los muchos derivados de esta invención general se expande, el inventor anticipa que las especies fúngicas individuales ofrecerán un único conjunto de beneficios. Algunos serán más antivíricos. Algunos activarán las rutas de detoxificación en las abejas mejor que otros contra diferentes toxinas. Algunos emiten fragancias mayores en sus propiedades atractivas. Por tanto, las mezclas o "cócteles fúngicos" de especies se pueden aleatorizar de acuerdo con las necesidades de las abejas, los apicultores, basándose en sus beneficios dirigidos deseados, los ecosistemas concretos, y acondicionados tras la disponibilidad de materiales básicos.

Por ejemplo, crítico para la industria de las abejas es la protección y generación de nuevas reinas. las reinas se reproducen y crían por criadores especializados que están en riesgo de los ácaros que transmiten el virus Black Queen Cell (BQCV). El hallazgo de un antivírico selectivo para proteger reinas es otra ventaja principal de la presente invención. Para la reproducción y cría de la reina, *Inonotus obliquus* y *Ganoderma resinaceum* son aditivos antivíricos muy activos en la reducción del Virus Black Queen Cell Virus (BQCV) pero no tan activos contra el Virus del ala deformada (DWV), mientras que otras especies son más activas contra DWV. Una mezcla de dos o más especies de setas es por tanto preferida para proporcionar un amplio bioescudo de actividad antivírica para proteger las abejas.

ÁCAROS VARROA Y PARÁSITOS DE INSECTOS:

El inventor ha recibido algunas patentes en las composiciones y métodos para utilizar el micelio preesporulante e hongos entomopatógenos como un atractor y un tratamiento para controlar insectos, y están pendientes de tramitación patentes más amplias (solicitud de patente de Estados Unidos n.º 13/986.978) en artrópodos y en vectores de enfermedades de insectos y artrópodos (Solicitudes de patentes de Estados Unidos números 13/317.613 y 13/ 373.719). Se conocen los ácaros *Varroa* como un vector del Virus israelí de la parálisis aguda y los virus de la mancha anular del tabaco. ácaros de *Varroa*, ácaros que pican tanto insectos como plantas, transportan más de un virus o patógeno bacteriano, lo que significa que los ácaros son un vector, aunque significativo, que transporta e introduce múltiples patógenos en el asalto que amenaza la salud de la colmena. Dado que las abejas se debilitan debido a la exposición vírica, por ejemplo, son menos capaces de deshacerse de los ácaros *Varroa*. Sin embargo, el micelio de los hongos entomopatógenos, particularmente *Aspergillus flavus*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, se puede usar para atraer, hacer enfermar o destruir a los ácaros *Varroa*, reduciendo su actividad, la administración de cargas dañinas y numerosos patógenos, inclinando por tanto el equilibrio en la mejora de la defensa del hospedador de la colonia contra CCD. Las esporas de hongos entomopatógenos, incluyendo *Metarhizium*, *Beauveria* y las Entomofthorales puede utilizarse de forma similar para hacer enfermar o matar ácaros de *Varroa*, aunque los ácaros pueden encontrar esporas repelentes en comparación con el micelio preconidial.

Por otra parte, pueden prepararse extractos de *Metarhizium anisopliae* de forma específica para atraer, pero no matar insectos, incluyendo las abejas, haciendo crecer cepas de *Metarhizium anisopliae* que no contienen destructinas, o que tienen niveles reducidos de estas u otras toxinas, o virulencia y patogenicidad reducida. La variabilidad de las toxinas es verdadera cuando se comparan muchas cepas de *Aspergillus flavus*, un conocido hongo entomopatógeno, principalmente tóxico debido a su contenido de aflatoxina. están actualmente disponibles cepas exentas de aflatoxina de *Aspergillus flavus*, que se producen naturalmente o se pueden preparar a través de selecciones de cultivos o modificaciones genéticas. De esta manera se pueden crear también cepas exentas de destructina de *Metarhizium anisopliae*, seleccionadas para, o constituyéndose en fuentes de genomas naturales. Se pueden producir también cepas que no estén enteramente exentas de destructinas o aflatoxinas, pero que producen los mencionados bajos niveles que pueden ser tóxicos para los ácaros pero no muy tóxicos para las abejas debido al hecho de que los niveles y las rutas del citocromo P450 de las abejas se han potenciado a partir de las exposición a las cumarinas y otros polifenoles presentados por el micelio. Esencialmente, La regulación en exceso del citocromo p450 (CYP) puede ayudar a las abejas a tolerar o detoxificar mejor las destructinas o aflatoxinas a las cuales se exponen las abejas procedentes de *Metarhizium anisopliae* y *Aspergillus flavus* y otras toxinas producidas por hongos entomopatógenos.

La ventaja de una cepa exenta de destructina o una cepa de destructina reducida de *Metarhizium anisopliae* es que los extractos del micelio podrían producirse con un contenido alto de azúcar y terpenos que atraería simultáneamente a las abejas y los ácaros. el uso de un tamiz o barrera de malla dimensionada adecuadamente u otros medios de selección permite a los ácaros entre las abejas, de esta manera, las abejas y los ácaros podrían atraerse inicialmente a la misma localización de los extractos (o atraerse de forma similar al micelio preconidial). La proporcionalidad de las toxinas entomopatógenas endémicas puede equilibrarse para hacer enfermar a los ácaros, pero no a las abejas. Utilizando extractos fúngicos simples o múltiples como se describe en el presente documento, se ofrece una libertad y flexibilidad de diseño aleatorizado, de tal manera que se pueden preparar numerosos dispositivos, sistemas de administración, composiciones y métodos disponibles desde el primer momento para favorecer la salud de las abejas y disminuir el CCD. Las moscas de fétidos, mosquitos y ácaros que predan sobre las setas son bien conocidas por la industria de las setas. Lo que no se conocía es que los extractos de hongos entomopatógenos antes de la esporulación son atractivos para estos insectos y artrópodos. El presente inventor no cree que los extractos hidroetanólicos de las setas o el micelio de las setas con estas propiedades atractivas fueran conocidos por la industria de las setas antes de las divulgaciones de este inventor en pendientes de tramitación y homologadas.

La combinación de ácidos oxálicos con agua enriquecida con azúcar con esporas o micelios preconidiales de hongos entomopatógenos tales como *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* mejorará las acciones miticidas de la combinación de ácidos oxálicos y hongos entomopatógenos y las propiedades antimiticidas de otros componentes residentes o añadidos al agua azucarada, dulces de polen o aerosoles para abejas, por ejemplo. Sin embargo, el ácido oxálico es reactivo a los minerales en los extractos fúngicos, y esto plantea una traba para una formulación eficaz.

Cuando se combinan ácidos oxálicos con los extractos de hongos basidiomicetos filamentosos, los minerales residentes (calcio, fósforo, hierro) pueden unirse con el ácido oxálico reduciendo por tanto el lavado de minerales, potencial miticida de los ácidos oxálicos. Por lo tanto, la desmineralización de los extractos fúngicos antes de combinar el ácido oxálico con los extractos fúngicos es una realización de la presente invención. La desmineralización emplea cualquiera de numerosos métodos útiles para desmineralizar los extractos fúngicos con el fin de evitar la conversión del ácido oxálico reactivo en sales insolubles en agua eliminando el calcio y otros minerales residentes en los extractos fúngicos. Un método de los muchos disponibles es utilizar tecnologías de resinas de intercambio iónico. Los extractos fúngicos pueden añadirse al agua destilada en una relación de 1:10, preferentemente, con intervalos de 1:1 que es el más concentrado y de 1:100 que es el más diluido, pero menos preferible. Tras completarse, los minerales en los extractos fúngicos, que neutralizarían de otra forma las propiedades antimiticidas del ácido oxálico, estarán en gran parte, si no se han eliminado completamente. A continuación, se puede añadir ácido oxálico al mineral reducido, extractos fúngicos en cantidad suficiente para tener un efecto antimiticida, en el intervalo de 1-10 % de ácido oxálico a la masa de la solución, dando como resultado un pH bajo, en el intervalo de pH 5-3,5, con un intervalo óptimo en el intervalo de pH 5-2,0.

"Buscamos comprender las fuentes botánicas y las actividades biológicas de las resinas en el campo y cómo el comportamiento de forrajeo de resina cambia en respuesta a factores ambientales, tales como la infección y otros estreses biológicos. Si se pueden descubrir plantas con resinas preferibles y más antimicrobianas en diferentes regiones, debería ser posible crear mejores entornos que promuevan la salud de las abejas apoyando conductas y estrategias de gestión que conduzcan a una resistencia natural a la enfermedad" Wilson *et al.*, *Metabolomics reveals the origins of antimicrobial resins collected by honey bees. PLoS One* 8(10): e77512, página 11. El presente inventor sugiere que los hongos cultivados puros y el micelio fúngico, incluyendo los atractores fúngicos, entomopatógenos fúngicos, inmunoestimuladores fúngicos, antivíricos fúngicos, antibacterianos y antifúngicos pueden apoyar de forma similar la salud de las abejas y conducir a una resistencia natural a las enfermedades y pesticidas. Los ecosistemas y economías que se beneficia de las abejas podrían, de otra forma, sufrir sin estos micorremedios.

El presente inventor anticipa también que la polinización de insectos y animales (murciélagos) se beneficiará también de los efectos de la presente invención. Se espera también que las aves puedan beneficiarse de forma similar de soluciones fúngicas integradas similares mediante la adición de alimentadores de néctar y alimentos de aves mediante la regulación en exceso de genes inmunológicos y de detoxificación así como los beneficios antivíricos que reciben, extendiendo por tanto la longevidad.

Los hongos basidiomicetos filamentosos son también fuentes de compuestos neuroregenerativos. Especies de *Hericium* (incluyendo, aunque no de forma limitativa *Hericium erinaceus*, *Hericium coralloides* y *Hericium abietis*) producen un potentes factores de crecimiento nervioso produciendo la regeneración de la mielina en los axones de los nervios y la regeneración. véase Stamets, Lion's Mane: A Mushroom That Improves Your Memory and Mood?, The Blog, Huffington Post Healthy Living, 08/08/2012. Psilocibinas y hongos productores de psilocibinas, que incluyen, aunque no de forma limitativa especies de *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Gymnopilus*, *Pluteus* y *Conocybe* tales como *Psilocybe azurescens*, *Psilocybe cyanescens*, *Psilocybe allenii*, *Psilocybe cyanofibrillosa*, *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe ovoideocystidiata*, *Psilocybe subaeruginosa*, *Copelandia Panaeoli* (*Copelandia cyanescens*, *Copelandia tropicalis*, *Copelandia bispore*), *Pluteus salicinus*, *Gymnopilus luteofolius*, *Gymnopilus spectabilis*, *Conocybe cyanopus* y *Conocybe smithii* pueden estimular la neurogénesis. (Véase Catlow *et al.*, Effects of psilocybin on hippocampal neurogenesis and extinction of trace fear conditioning, *Exp Brain Res* (2013) 228:481-491 DOI

10.1007/s00221-013-3579-0). Individualmente o en combinación, las mezclas de extractos de setas de psilocibina y cuerpos fructíferos de setas *Hericium*, o más preferentemente, sus extractos miceliares, podrían ayudar a reparar neuronas dañadas por toxinas, pesticidas colinérgicos, oxidación, vejez, u otras fuentes de neurotoxinas. El efecto neto de la ingestión de estas mezclas de especies de *Hericium* y psilocibinas regeneradoras nerviosas mejoraría la salud neurológica de las abejas a través de la neurogénesis y la remielinización, y por tanto de animales, incluyendo seres humanos. Otra forma mejorada de "miel micológica" puede incorporar estos elementos para los beneficios de las abejas y las personas, mejora de la cognición, prevenir o reparar neuropatías que se presentan por sí mismas como enfermedades de seres humanos comprendidas en el alcance de las definiciones para el Alzheimer, el Parkinson, los parkinsonismos, la EM (esclerosis múltiple), o como formas aún sin clasificar de deterioro neurológico. por tanto, dichas combinaciones podrían aumentar la inteligencia, las capacidades sensoriales, la memoria, los reflejos, los tiempos de reacción, y las capacidades de resolución de problemas. Como tal, la 'miel inteligente ecológica' se prevé que quede contemplada dentro del alcance de la presente invención.

Ganoderma lucidum es una de las especies de particular interés (junto con *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma brownii*, *Ganoderma curtisii*, *Ganoderma oregonense*, *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma lingzhi*, *Ganoderma capense*, *Ganoderma annularis*, y *Ganoderma collosum*) para el inventor, ya que no solo tiene fuertes propiedades antivíricas, sino que tiene complejos de azúcares que dan como resultado que su micelio produzca una "miel micológica" similar a un jarabe viscoso que se puede usar para ayudar a que las abejas sobrevivan al CCD. El inventor y su equipo en Fungi Perfecti, LLC han señalado también que los extractos de *Ganoderma resinaceum* no se congelarán incluso cuando se consigan temperaturas de liofilización menores de -50 °C en un vacío alto, mientras que las especies ensayadas aparte del género *Ganoderma* se liofilizarán fácilmente en un estado seco en las mismas condiciones. El inventor teoriza que el extracto micelial de *Ganoderma resinaceum*, y probablemente los extractos de especies de *Ganoderma* relacionadas, mantienen un estado líquido incluso en condiciones criogénicas debido a su única gama de azúcares complejos, esteroides, y glicoproteínas que se unen para formar una única matriz líquida muy diferente a la de cualquier otra especie ensayada. Este extracto puede tener potencial como anticongelante con implicaciones de amplio alcance para la medicina, la aviación, los viajes espaciales, y utilidad en condiciones de temperaturas extremas para la lubricación, conservación, y la química extremófila.

En todos los siguientes ejemplos, el inventor prevé, como derivados de su descubrimiento, que los métodos de fraccionamiento bioguiado conducirán a un aumento de la potencia, un aumento de la eficacia, y la reducción del coste de producción, la fabricación y la implementación de dichas invenciones y sus muchas elaboraciones, se volverán obvias posteriormente a este descubrimiento de cambio de paradigma.

Ejemplo 1

Fomes fomentarius, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune* y otras especies de setas se cultivan y, el micelio que se ha hecho crecer sobre arroz, cebada, linaza u otros cereales, residuos agrícolas, o productos forestales tales como serrín o virutas de madera (para una lista de sustratos, véase Stamets, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, 1993, Ten Speed Press, Berkeley, Ca. y Stamets & Chilton, *The Mushroom Cultivator*, Agarikon Press, Olympia, WA). Cuando el micelio alcanza una masa de crecimiento (preferiblemente después de 5 a 60 días de crecimiento en fermentación o en fermentación en estado sólido después de la inoculación, pero bastante antes de la formación del cuerpo fructífero) la masa micelial se puede extraer mediante un simple lavado con agua, agua/etanol (se prefieren ambos) o etanol del sustrato, o a partir de la compresión del sustrato, todo ello dará como resultado un fluido líquido o extracto capturable incluidos exudados extracelulares. Estos extractos se pueden utilizar tal cual, o se puede añadir alcohol (25-50 % en volumen) a los extractos acuosos como conservante y disolvente (que precipitará los polisacáridos solubles en agua). El extracto hidroetanólico se puede evaporar o eliminar, o bien el alcohol y el agua se pueden evaporar y eliminar por separado. El extracto bruto se puede filtrar para que quede exento de células usando un filtro de 12-20 µm. Este extracto se puede congelar o secar para uso futuro. Como alternativa, se pueden usar extractos no acuosos o en disolventes no alcohólicos tales como DMSO, acetato de etilo, éter y otros disolventes o combinaciones de disolventes conocidos en la técnica, extractos de fluidos subcríticos o supercríticos utilizando, por ejemplo, dióxido de carbono o agua, y se pueden utilizar codisolventes opcionales tales como alcoholes, o se pueden utilizar extractos asistidos por microondas.

El extracto se puede añadir a cualquier forma de alimento para consumo de abejas. El extracto original se puede usar directamente o diluirse y añadirse a su agua de bebida, agua azucarada, dulces de derivados de la miel de abejas, miel, propóleo, dulces de polen, pastas grasas y suplementos de proteínas para proporcionar alimentos mejorados para abejas y productos nutritivos y suplementos de polen mejorados, suplementos dietarios, suplementos de alimentación y suplementos nutritivos. Los extractos también se pueden incorporar a pulverizadores usados para pulverizar colmenas, componentes de colmenas, tiras adherentes, abejas y plantas, e incorporarse a la cera usada para fabricar panales y alzas. La ingestión y el contacto por las abejas mejora la capacidad de las abejas para desarrollar inmunidad mediante una regulación positiva de las enzimas degradadoras de toxinas, reduce las cargas de patógenos y proporciona una fuente saludable de diversos azúcares, aminoácidos, vitamina B, y nutrientes. Por otra parte, el precipitado, aunque repartido desde el sobrenadante, es rico en nutrientes y tiene propiedades antivíricas de fomento de la salud, que también se pueden usar como fuente de beneficios para las

abejas. Tanto el sobrenadante como el precipitado se pueden combinar y convertirse enzimáticamente usando amilasa y otras enzimas para transformar adicionalmente los almidones y otros ingredientes en una composición más eficaz.

5 Ejemplo 2

El micelio de setas medicinales se hace crecer usando técnicas de cultivo en medio líquido. Aunque el crecimiento en arroz podría representar una conversión de 30-40 % de arroz en micelio, el recipiente de cultivo líquido puede tener una conversión prácticamente completa >3x más micelios por unidad de masa. Por tanto, el recipiente de cultivo líquido de micelio y sus metabolitos extracelulares serán más sencillos de utilizar en el desarrollo de la presente invención ya que el proceso del recipiente de cultivo elimina la necesidad de eliminar los ingredientes del sustrato no metabolizados.

Ejemplo 3

Para preparar el extracto micelial, se utilizan volúmenes iguales de micelio hecho crecer sobre cereales (cebada, semillas de lino, arroz, avena, mijo, trigo, centeno, maíz), semillas, incluidos frutos secos, serrín o virutas de madera (abetos de Douglas, pinos, robles, abedules, plantas de algodón, olivas) y se sumergen en una solución de agua-etanol 50:50. Se deja reposar a temperatura ambiente durante dos semanas, y después se prensa para expulsar el extracto líquido. Durante varios días, se producirá un precipitado a partir de la solución hidroetanólica. El sobrenadante hidroetanólico se extrae por encima del precipitado pastoso. Después de algunas semanas más, o usando una centrífuga, el precipitado se concentra adicionalmente hasta un estado semisólido. Este semisólido húmedo se extrae y se calienta a 50° C durante 6-8 horas con agitación. El volumen húmedo de semisólidos se redujo a aproximadamente un 40 % del semisólido húmedo original. El secado del semisólido a la sustancia de caramelo "de tipo miel" tiene aproximadamente un 16 % de la humedad del sólido húmedo original. Por lo tanto, con 1000 ml de sólidos húmedos (que tiene un 40 % del extracto inicial) produce aproximadamente 170 ml de sustancia espesa análoga a jarabe de caramelo. Un calentamiento y agitación continuos concentra esta sustancia con notables propiedades dulces. El extracto se puede cristalizar, convertirse en polvo, y usarse como enmienda para otros tratamientos. Las formas líquida, semisólida y cristalizada tienen un sabor notablemente dulce y se podrían considerar como una sustancia medicinal parecida a un dulce tanto para las abejas como para las personas en una amplia gama de aplicaciones.

Ejemplo 4

Se preparó un extracto micelial por extracción de los cuerpos fructíferos o micelios de hongos basidiomicetos incluidos *Ganoderma resinaceum* en agua caliente (80-100° C) durante varias horas y se combinaron con la extracción con agua a temperatura ambiente (10-30° C) de *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* y/o *Schizophyllum commune*, cuyos micelios se hicieron crecer sobre cereal o madera. A estos extractos acuosos, se añadió etanol para hacer que la solución tuviera más de un 22 % de EtOH (etanol), preferentemente 35-45 % de EtOH. Tras la adición de etanol, los polisacáridos se separaron por precipitación de la solución y sedimentaron en el fondo de recipiente de extracción. Tras eliminar el sobrenadante, los polisacáridos precipitados, ricos en glicósidos, glicoproteínas, y otros nutrientes 'análogos al néctar', y se recogieron y se calentaron entre 50-70° C durante varias horas, dando como resultado la creación de un residuo dulce atractivo y beneficioso para las abejas. Como alternativa, el sobrenadante se puede almacenar durante varios días, lo que produce la precipitación adicional de polisacáridos útiles. Estos precipitados contienen azúcares complejos, antiviricos, antibacterianos, ácidos cumáricos y cumarinas que regulan positivamente el citocromo p450, y se pueden combinar con otros ingredientes usados en el agua de alimentación, dulces de polen, propóleo, cera de abeja, pulverizadores, o en cualquier sistema de administración mediante el cual las abejas entran en contacto con estos precipitados, ayudando a las abejas a superar los factores estresantes relacionados con el trastorno del colapso de colonias.

Ejemplo 5

Un extracto micelial preparado a partir de la extracción de cuerpos fructíferos o micelios de hongos basidiomicetos incluido *Ganoderma resinaceum* se humedeció inicialmente en etanol 100 % (relación en masa 1:1) durante 1-7 días. Tras eliminar el etanol por drenado, el marco de la seta o micelial se sumergió en agua caliente (80-100 C) durante varias horas y se combinó con la inmersión y extracción con agua a temperatura ambiente (10-30°) de *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* y/o *Schizophyllum commune*, cuyos micelios se hicieron crecer sobre cereal o madera. A estos extractos acuosos, se añadieron los extractos etanólicos anteriormente descritos para hacer que la solución total combinada tuviera un contenido de EtOH superior al 22 %, preferentemente 35-45 % de EtOH. Tras la adición de la fracción etanólica, los polisacáridos se separaron por precipitación de la solución y sedimentaron en el fondo de recipiente de extracción. El ácido p-cumárico, como es más soluble en etanol que en agua, está enriquecido en el sobrenadante del extracto etanólico. (El sobrenadante etanólico, con los ácidos p-cumáricos concentrados, en un depósito de compuestos que codifican p450 beneficiosos para las abejas). Este sobrenadante etanólico se puede almacenar durante varios días, lo que produce además una mezcla de

polisacáridos pero que tiene proporcionalmente más cantidad de ácidos p-cumáricos que las fracciones en agua caliente solas. El precipitado también contiene ácidos p-cumáricos y, adicionalmente, otros nutrientes, que se pueden usar para alimentar abejas. Estos precipitados enriquecidos en p-cumárico también contienen azúcares complejos, antivíricos, antibacterianos, y familias de cumarinas, y se pueden combinar con otros ingredientes, como los polisacáridos de setas solubles en agua, jarabe de maíz, o azúcares utilizados para edulcorar el agua de bebida, o incorporarse adicionalmente como ingredientes a los dulces de polen, propóleo, cera de abeja, pulverizadores, o en cualquier sistema de administración mediante el cual las abejas entran en contacto con estos precipitados, ayudando a las abejas a superar los factores estresantes relacionados con el trastorno del colapso de colonias.

10 Ejemplo 6

Para cada tipo de extracto micelial (especie de seta), se recogió miel de abejas envejecida mixta de una sola colmena el mismo día, y se distribuyó aleatoriamente en 16 jaulas que tenían aproximadamente 100 abejas cada una. Cada conjunto de 16 consistió en cuatro jaulas de control (alimentadas con jarabe de azúcar), cuatro jaulas de concentración baja (alimentadas con extracto micelial en jarabe de azúcar al 0,1 % v/v), cuatro jaulas de concentración media (alimentadas con extracto micelial en jarabe de azúcar al 1 % v/v), y cuatro jaulas de concentración alta (alimentadas con extracto micelial en jarabe de azúcar al 10 % v/v). En cada grupo de cuatro jaulas, tres jaulas se usaron para los ensayos de longevidad y la jaula réplica restante se usó para el ensayo de partículas víricas totales. Se llevó a cabo un experimento independiente para evaluar el efecto de los extractos fúngicos sobre tipos específicos de virus.

Mejora en la longevidad

Para el ensayo de longevidad (supervivencia), cada réplica (tres jaulas para cada concentración de alimentación y grupo de control) se supervisó diariamente y se contaron las abejas muertas. Cada día del experimento, el número total de abejas que murieron junto con la fecha se tabuló para cada jaula réplica para cada extracto fúngico y para los grupos de control. Estas tabulaciones de muertes diarias de abejas se usaron a continuación para calcular el porcentaje de las abejas originales que siguen sobreviviendo cada día del experimento. A continuación se calcularon las tasas de supervivencia porcentuales a partir de los datos de las tres jaulas réplica para cada extracto fúngico y para el grupo de control.

Se generaron gráficas de supervivencia con el tiempo medido en días como variable independiente (eje x), y el porcentaje medio de abejas que sobreviven en cualquier punto del experimento como la variable dependiente (eje y); el gráfico de longevidad el % de la población original que ha sobrevivido varios puntos temporales. Véase la Fig. 1-4. La Fig. 1 es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de supervivencia de las abejas con el tiempo en días cuando se proporcionan extractos del micelio de *Inonotus obliquus* (0,1 %, 1 % y 10 % tal como se muestra respectivamente por líneas punteadas, rayadas y con doble raya) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una línea sólida). La Fig. 2 es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de supervivencia de las abejas con el tiempo en días cuando se proporcionan extractos del micelio de *Ganoderma resinaceum* (0,1 %, 1 % y 10 % tal como se muestra respectivamente por líneas punteadas, rayadas y con doble raya) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una línea sólida). La Fig. 3 es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de supervivencia de las abejas con el tiempo en días cuando se proporcionan extractos del micelio de *Fomitopsis pinicola* (0,1 %, 1 % y 10 % tal como se muestra respectivamente por líneas punteadas, rayadas y con doble raya) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una línea sólida). La Fig. 4 es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de supervivencia de las abejas con el tiempo en días cuando se proporcionan extractos del micelio de *Fomes fomentarius* (1 % mostrado por una línea sólida) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una línea sólida). Estos enfoques, y otros similares, se pueden usar en la práctica de la invención para demostrar el efecto de la invención sobre la salud y la longevidad de las abejas. Los datos son los valores medios de los experimentos; las barras de la desviación estándar se han eliminado por claridad.

Algunos, pero no todos, de los resultados de estos experimentos preliminares fueron estadísticamente significativos; se esperan resultados mejorados cuando se continúen los ensayos con más réplicas. La significación estadística se evaluó usando las estimaciones de supervivencia de Kaplan-Meier (producto-límite) preparadas con la herramienta de descubrimiento estadístico JMP® del SAS Institute, Inc. Véase la Fig. 5, un gráfico de Kaplan-Meier (producto-límite) que muestra la supervivencia estimada de la fracción de abejas que sobreviven con el tiempo en días cuando se proporcionan extractos del micelio de *Fomes fomentarius* (0,1 %, 1 % y 10 % tal como se muestra respectivamente por líneas punteadas, rayadas y con doble raya) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una línea sólida). Este análisis comparó el tiempo de supervivencia medio para el tratamiento con el tiempo de supervivencia medio para el control (alimentado solo con agua azucarada) y usaron una prueba de Wilcoxon para evaluar si la supervivencia era estadísticamente diferente de la variación de la posibilidad en el tiempo de supervivencia de la abeja. La Fig. 5 muestra esta realización de la invención. En este análisis, una composición *Fomes fomentarius* alimentada al 1 % v/v mejoró la supervivencia media de las abejas en un 9,7 % ($p < 0,0006$).

Como se ha demostrado en las Fig. 1-5, la longevidad de las abejas mejoró con la alimentación con extractos de diferentes especies fúngicas, donde la mejora en la longevidad depende tanto de la especie fúngica como de la concentración consumida por las abejas. En la práctica de la presente invención, algunos de estos aumentos en la longevidad se deben probablemente a una reducción en la carga vírica en la mayoría de los casos (como se analiza a continuación), pero también se puede atribuir a otros aspectos de la invención cuando la longevidad aumenta pero los virus no se reducen.

La mejora en la longevidad se puede demostrar en la práctica de la invención mediante el uso de gráficos de supervivencia, tales como, aunque no de forma limitativa, los anteriormente descritos. La mejora en la longevidad se puede medir numéricamente en la práctica de la invención mediante el cálculo de la diferencia en supervivencia. Uno de estos métodos se basa en el valor promedio de un teorema de función:

$$f_{med} = \frac{1}{b-a} \int_a^b f(x) dx$$

Donde los valores de 'a' y 'b' representan el día inicial y final en los que se va a medir el efecto de la invención, y 'f(x)' representa la función del gráfico de supervivencia como se ha descrito anteriormente. La diferencia en estos datos respecto el intervalo de tiempo especificado representa el porcentaje de mejora promedio en la longevidad alcanzado mediante la práctica de la invención para el intervalo de tiempo especificado.

Otros métodos para medir diferencias en la longevidad, supervivencia, o aumentos de población, incluidos los métodos estadísticos tales como el análisis de Kaplan-Meier, Nelson Aalen y otros métodos que son conocidos por los expertos en la materia son alternativas aceptables en la práctica de la invención.

De manera similar, se pueden utilizar varios métodos cuantitativos para analizar el número de virus en abejas en la práctica de la presente invención, incluida la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y la RT-PCR en tiempo real basándose en la amplificación del ADNc mediante la PCR, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), incluidos los ELISA normal y en sándwich con los diferentes agentes de bloqueo, anticuerpos primarios y secundarios, enzimas indicadoras, y sus soluciones específicas de sustratos colorimétricos para la detección y cuantificación, micromatrices multiplexadas que utilizan sondas moleculares para diferentes dianas de ARN o ADN, AGID (inmunodifusión en gel de agarosa), métodos serológicos basados en perfiles de proteínas o anticuerpos policlonales y monoclonales y la amplia variedad de otros métodos basados en biología molecular tales como tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, técnicas de secuenciación basadas en pirofosfato, secuenciación de Sanger (que también se denomina como método de terminación de cadena) y sistemas integrados para la detección de virus (IVDS). Véase, por ejemplo, De Miranda, Diagnostic techniques for virus detection in honey bees, en Aubert *et al.* (Eds.), *Virology and the honeybee*, EEC Publications (2008), pp. 121-232 y Evans *et al.*, Las metodologías convencionales para investigación molecular en *Apis mellifera*, *Journal of Apicultural Research* 52(4) (2013).

Usando este método para medir las diferencias de longevidad, el inventor especifica la mejora en la longevidad como se realiza mediante la presente invención. Véase la Tabla II, "Mejora porcentual promedio en la longevidad de las abejas". La tabla representa la diferencia entre los valores promedio del % de supervivencia de las abejas, cuando se evalúa para diferentes intervalos de tiempo. Dicha diferencia se proporciona como la resta numérica de dichos porcentajes, donde la supervivencia porcentual promedio para diferentes intervalos de tiempo se calcula como se ha descrito anteriormente:

$$\text{mejora en la longevidad} = \text{supervivencia \% promedio}_{\text{alimentado con extracto fúngico}} - \text{supervivencia \% promedio}_{\text{control}}$$

La mejora en la longevidad aumenta el número de "días abeja" en los que las obreras u otras clases de abejas están disponibles para recoger polen y mantener la colmena o realizar otra labor, por lo que una mejora en la salud y un aumento en la supervivencia de los individuos lleva a una mejora en la salud y la supervivencia de la colonia.

Reducción en el nivel total de virus

Para el ensayo antivírico de cada tipo de extracto micelial (especie de seta), se recogió miel de abejas envejecida mixta de una sola colmena el mismo día, y se distribuyó aleatoriamente en cuatro jaulas que tenían aproximadamente 100 abejas cada una. Este ensayo se realizó en paralelo con el ensayo de longevidad anteriormente descrito, usando abejas de las mismas colmenas durante el mismo intervalo de tiempo. Cada conjunto de especies fúngicas consistió en una jaula de control (alimentada con jarabe de azúcar), una jaula de concentración baja (alimentada con extracto micelial en jarabe de azúcar al 0,1 % v/v), una jaula de concentración media (alimentada con extracto micelial en jarabe de azúcar al 1 % v/v), y una jaula de concentración alta (alimentada con extracto micelial en jarabe de azúcar al 10 % v/v).

Una muestra de abejas se retiró de la jaula y se congeló en el día 0, día 7, y día 14. El ensayo del número total de partículas víricas, independientemente de la especie vírica, se llevó a cabo por el Dr. David Wick de BVS, Inc.

usando tecnología IVDS; véanse las patentes de Estados Unidos con números 8.524.155, 8.309.029, 8.146.446, 8.021.884, 7.850.908, 7.250.138, 6.491.872, 6.485.686 t 6,051,189 (todas de Charles Wick) y Charles H. Wick, Integrated Virus Detection, CRC Press (2014). Para cada análisis de la muestra, 6,0 gramos de abejas se combinaron con 100 ml de agua de ósmosis inversa (OI) y se filtraron en grueso mediante dos telas de estameña. A continuación, una submuestra de 90 ml se centrifugó durante 60 minutos a 20.000 X g. El sobrenadante se recuperó y se ultrafiltró a través de un sistema de filtración de fibra hueca de 500.000 Dalton seguido por enjuagado con 200 ml OI de lavado y reducción a aproximadamente 2 ml. La solución se preparó para el análisis mediante un sistema de detección de virus integrados (IVDS) usando una dilución 1:10 con acetato de amonio (AA). Cada muestra se filtró a través de un papel w-41 20 µm o un filtro PTFE de 0,45 µm. Las muestras se exploraron cinco veces con el IVDS y se notificaron los niveles promedios de virus.

Como se ha demostrado en las Fig. 6, 7, 8 y 9, la carga vírica total de las abejas se redujo con la alimentación con extractos de diferentes especies fúngicas, donde el nivel de la reducción del virus depende tanto de la especie fúngica como de la concentración consumida por las abejas. La Fig. 6 es un gráfico de barras que muestra las partículas víricas totales en abejas que recibieron extractos del micelio de *Inonotus obliquus* (0,1 %, 1 % y 10 % tal como se muestra respectivamente por líneas punteadas, rayadas y con doble raya) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una barra sólida) a tiempo cero, una semana y dos semanas. La Fig. 7 es un gráfico de barras que muestra las partículas víricas totales en abejas que recibieron extractos del micelio de *Ganoderma resinaceum* (0,1 %, 1 % y 10 % tal como se muestra respectivamente por líneas punteadas, rayadas y con doble raya) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una barra sólida) a tiempo cero, una semana y dos semanas. La Fig. 8 es un gráfico de barras que muestra las partículas víricas totales en abejas que recibieron extractos del micelio de *Fomitopsis pinicola* (0,1 %, 1 % y 10 % tal como se muestra respectivamente por líneas punteadas, rayadas y con doble raya) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una barra sólida) a tiempo cero y una semana. La Fig. 9 es un gráfico de barras que muestra las partículas víricas totales en abejas que recibieron extractos del micelio de *Schizophyllum commune* (0,1 %, 1 % y 10 % tal como se muestra respectivamente por líneas punteadas, rayadas y con doble raya) con agua azucarada en comparación con una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrada por una barra sólida) a tiempo cero y dos semanas. Estas figuras, y otras similares, se pueden usar en la práctica de la invención para demostrar el efecto de la invención sobre la salud de las abejas. En la práctica de la presente invención, la mayoría pero no todas, las especies que mejoraron su longevidad también tuvieron una carga vírica reducida. Esto implica que la reducción vírica puede ayudar a la longevidad, pero que se pueden observar mejoras en la longevidad sin reducción vírica debido a otros aspectos beneficiosos de la invención tal como la estimulación general de la inmunidad de la colmena y la actividad antibiótica contra patógenos no víricos tales como *Nosema*. Múltiples causas de la mejora en la longevidad son análogas en la práctica de la invención porque diferentes especies fúngicas parecen tener modos de acción diferentes y específicos contra diferentes patógenos de las abejas, como se analiza más adelante, a modo de ejemplo y no de exclusión.

La reducción en la carga vírica total se puede medir en la práctica de la invención calculando la diferencia en la detección de virus entre las abejas en las que se ha aplicado la invención y las abejas que no han estado expuestas a la invención. Uno de estos métodos para cuantificar esta diferencia se base en el valor promedio de un teorema de función:

$$f_{med} = \frac{1}{b-a} \int_a^b f(x) dx$$

Donde los valores de 'a' y 'b' representan el día inicial y final en los que se va a medir el efecto de la invención, y 'f(x)' representa el nivel de detección de virus en función del muestreo temporal. La "diferencia porcentual" en estos valores para los intervalos de tiempo especificados representa la "reducción porcentual" promedio en el nivel de virus conseguido mediante la práctica de la invención para el intervalo de tiempo especificado. Otros métodos para medir diferencias en el nivel de virus con el tiempo, incluida la diferencia porcentual en puntos temporales de muestreo individual, diferencia media, y métodos estadísticos tales como el análisis de Kaplan-Meyer son alternativas aceptables en la práctica de la invención, y se han incorporado por referencia. Usando el método descrito anteriormente para medir la diferencia en el nivel de virus para diferentes intervalos de tiempo, el inventor especifica la reducción de virus como se realiza mediante la presente invención. Véase la Tabla I, "Disminución porcentual promedio en la carga vírica total".

La tabla representa la diferencia entre los valores promedio del % de supervivencia de las abejas, cuando se evalúa para diferentes intervalos de tiempo. Dicha diferencia no se proporciona como la resta numérica de dichos porcentajes, sino en su lugar como el "porcentaje de reducción":

$$\% \text{ disminución en la carga vírica} = \frac{\text{título virus prom}_{\text{alimentado con extracto fúngico}} - \text{título virus prom}_{\text{control}}}{\text{título virus prom}_{\text{control}}} \times 100$$

Especificidad especie fúngica/enfermedad

Tipos específicos de extracto micelial (especie de seta), cuando se alimentan a abejas de edad mixta pueden reducir el nivel de agentes causantes de enfermedades tales como partículas de virus en una forma específica de la especie. Esta realización de la invención se demostró alimentando con extractos fúngicos abejas enjauladas, y midiendo los niveles de tipos específicos de virus en las abejas con el tiempo. Para este análisis, abejas de edad mixta de una sola colmena se recogieron el mismo día y se distribuyeron uniformemente de forma aleatoria en 12 jaulas. Cuatro jaulas se alimentaron con extracto micelial de *Ganoderma lucidum* var. *resinaceum* al 1 % v/v en jarabe de azúcar, cuatro jaulas se alimentaron con extracto micelial de *Inonotus obliquus* al 1 % v/v en jarabe de azúcar, y cuatro se usaron como control y se alimentaron solamente con jarabe de azúcar.

Una muestra de abejas se retiró de la jaula y se congeló en el día 0, día 3, día 7 y día 14. Las abejas se enviaron al Dr. Yanping (Judy) Chen del United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service usando RT-PCR en tiempo real como se describe en Chen *et al.*, Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of Deformed Wing Virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71 (2005), p. 436-441 y Khongphinitbunjong *et al.*, Las diferencias en niveles víricos y expresión génica inmunitaria en tres lotes de *Apis mellifera* inducidas por diferentes cantidades de *Varroa destructor*, *Journal of Insect Physiology*, Vol. 72 (2015), p. 28-34.

En este análisis, los niveles de virus se cuantificaron por la acumulación de una señal fluorescente a medida que el ADN del virus se amplificaba en la reacción de PCR. El umbral del ciclo se define como el número de ciclo necesarios para que la señal fluorescente supere el nivel de fondo de la fluorescencia. Por tanto, los niveles umbral de ciclo son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico vírico diana (por ejemplo, título de virus) en la muestra (es decir, cuanto menor sea el nivel de CT, mayor es la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra). Como se ha demostrado en la Fig. 10, se evitó el aumento de los niveles de virus Black Queen Cell (cuantificados según el umbral de ciclo) en abejas alimentadas con extractos de micelios de *Ganoderma lucidum* var. *resinaceum* y *Inonotus obliquus*. Véase la Fig. 10, un gráfico de líneas que muestra el umbral de ciclo para el virus Black Queen Cell con el tiempo en una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrado mediante la línea sólida 111) en comparación con abejas que recibieron extractos del micelio de *Inonotus obliquus* (1 %) (mostrado mediante la línea punteada 112) y *Ganoderma resinaceum* (1 %) (mostrado mediante la línea rayada 113) con agua azucarada. Por el contrario, los mismos extractos no tuvieron un efecto significativo sobre los niveles del virus de las alas deformes. Véase la Fig. 11, un gráfico de líneas que muestra el umbral de ciclo para el virus de las alas deformes con el tiempo en una población de control alimentada solo con agua azucarada (mostrado mediante la línea sólida 121) y abejas que recibieron extractos del micelio de *Inonotus obliquus* (1 %) (mostrado mediante la línea punteada 122) y *Ganoderma resinaceum* (1 %) (mostrado mediante la línea rayada 123) con agua azucarada.

Este ejemplo de un extracto de especie fúngica que tiene especificidad contra un patógeno vírico y no contra otras realizaciones de la invención antivírica. También respalda el argumento de que composiciones específicas de extractos fúngicos pueden ser análogamente específicos de otros patógenos de abejas (que reducen la longevidad) tales como *Nosema* y bacterias y/o pueden, en general, regular positivamente los sistemas metabólicos, inmunitarios y de detoxificación de abejas. Dichos efectos contra patógenos no víricos o refuerzos metabólicos e inmunitarios generales pueden ser responsables de los casos donde la longevidad mejoraba pero la carga vírica permanecía inalterada.

Sumario, preferencias, e implicaciones

Hasta la fecha, el inventor dispone de datos (tanto de un experimento de longevidad como de un experimento de reducción de virus totales) para 8 especies de hongos medicinales. El inventor también tiene un tercer experimento, reducción de un virus específico, virus Black Queen Cell, realizado solamente con *Ganoderma resinaceum* y *Inonotus obliquus*.

En el presente documento, el Inventor define una métrica, el "índice LV", que es: índice LV = La mejora porcentual promedio en la longevidad de la abeja multiplicado por la disminución porcentual promedio en la carga vírica total.

Este cálculo proporciona un número que asigna igual importancia a ambos aspectos para medir la mejora en la salud de la colonia. Los recuadros blancos de las tablas siguientes de actividad antivírica, longevidad o LV indican que tanto la longevidad como la reducción de virus era negativa o cero en uno o ambos conjuntos de datos.

Existen otras muchas representaciones matemáticas que podrían trazar una relación entre estos conjuntos de datos, tales como, por ejemplo, la mejora en la longevidad porcentual dividida por la reducción de virus porcentual. Este cálculo tensionaría la parte de la longevidad que teóricamente podría estar relacionada con la reducción de virus si hubiese una correspondencia 1:1 entre estas medidas. Numerosas posibilidades de métricas serán evidentes para los expertos en la materia, y todas estas métricas para medir la mejora en la salud de las abejas deberán considerarse comprendidas en el alcance de la invención.

El enfoque general adoptado en el presente documento es comparar el "área bajo la curva" de las mediciones de longevidad y las mediciones de reducción en virus totales tal como se ha descrito anteriormente. La diferencia entre

las áreas bajo las curvas, para un intervalo de tiempo dado, es igual a los números en la tabla de longevidad. La diferencia en el área bajo las curvas, para un intervalo de tiempo dado, expresado como "porcentaje de mejora" es igual a las cantidades de las tablas de reducción de virus totales. Véase la Tabla I "Mejora porcentual promedio en la longevidad de las abejas" y la Tabla II "Disminución porcentual promedio en la carga vírica total". Estos valores se pueden relacionar matemáticamente para ilustrar rasgos de interés en la práctica de la invención, tales como composiciones que son las más preferidas para mejorar la longevidad y reducir la carga vírica total en abejas. Véase la Tabla III Mejora porcentual promedio en la longevidad de las abejas x Disminución porcentual promedio en la carga vírica total (índice LV).

TABLA I				
Disminución porcentual promedio en la carga vírica total				
		Concentración		
Especie		0,1 %	1 %	10 %
	Marco temporal			
<i>Trametes versicolor</i>	0-7 días	7,5		9,0
	0-14 días	4,8		3,6
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0-7 días	20,4	22,8	
	0-14 días	25,5	32,2	2,1
<i>Fomitopsis officinalis</i>	0-7 días			
	0-14 días	4,5		
<i>Schizophyllum commune</i>	0-7 días			3,8
	0-14 días	19,5	20,8	26,7
<i>Inonotus obliquus</i>	0-7 días	47,5	41,6	42,2
	0-14 días			
<i>Fomes fomentarius</i>	0-7 días	9,6		10,0
	0-14 días	9,3		
<i>Ganoderma applanatum</i>	0-7 días	2,5	3,6	1,0
	0-14 días	4,5	14,2	
<i>Ganoderma lucidum var. resinaceum</i>	0-7 días	73,4	64,4	76,7
	0-14 días	65,4	58,3	85,9
Preferido	1-25 % o mayor disminución de virus			
Más preferido	15-25 % o mayor disminución de virus			
Lo más preferido	>25 % disminución de virus			

TABLA II				
Mejora porcentual promedio en la longevidad de las abejas				
		Concentración		
Especie		0,1 %	1 %	10 %
	Marco temporal			
<i>Trametes versicolor</i>	0-7 días	4,1	0,2	5,0
	0-14 días	3,8		7,8
	0-28 días	1,6		3,7
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0-7 días	9,2	14,6	
	0-14 días	13,5	14,1	
	0-28 días	8,5	3,7	
<i>Fomitopsis officinalis</i>	0-7 días	5,2	3,8	
	0-14 días	2,3	1,0	
	0-28 días	1,0		
<i>Schizophyllum commune</i>	0-7 días	0,1		0,8
	0-14 días	3,7	0,5	
	0-28 días	0,1		
<i>Inonotus obliquus</i>	0-7 días		1,6	1,2
	0-14 días		4,1	2,1

	0-28 días		3,7	
<i>Fomes fomentarius</i>	0-7 días	1,7	22,1	13,5
	0-14 días		16,1	
	0-28 días		11,2	
<i>Ganoderma lucidum var. resinaceum</i>	0-7 días			
	0-14 días	2,2	3,7	
	0-28 días	3,7	9,5	
Preferido	1-5 % o mayor aumento de longevidad			
Más preferido	3-5 % o mayor aumento de longevidad			
Lo más preferido	>5 % mejora de longevidad			

TABLA III Mejora porcentual promedio en la longevidad de las abejas x Disminución porcentual promedio en la carga vírica total (Índice LV)				
Especie		Concentración		
		0,1 %	1 %	10 %
	Marco temporal			
<i>Trametes versicolor</i>	0-7 días	30,9		44,8
	0-14 días	18,1		27,7
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0-7 días	187,5	332,7	
	0-14 días	344,1	453,1	
<i>Fomitopsis officinalis</i>	0-7 días			
	0-14 días	10,4		
<i>Schizophyllum commune</i>	0-7 días			3,1
	0-14 días	72,6	9,6	
<i>Inonotus obliquus</i>	0-7 días		67,0	51,2
	0-14 días			
<i>Fomes fomentarius</i>	0-7 días	16,2		135,2
	0-14 días			
<i>Ganoderma applanatum</i>	0-7 días			
	0-14 días			
<i>Ganoderma lucidum var. resinaceum</i>	0-7 días			
	0-14 días	147,1	212,9	
Preferido	1-200+ Índice LV			
Más preferido	50-200+ Índice LV			
Lo más preferido	200+ Índice LV			

En la práctica de la invención, las composiciones de extracto fúngico se pueden ordenar de forma variada con respecto a la preferencia dependiendo de la aplicación prevista de la composición. Los ejemplos incluyen aunque no de forma limitativa a la ordenación por preferencia en la mejora de longevidad, ordenada con preferencia respecto a la reducción de virus totales, ordenada con respecto a la longevidad y la reducción de virus. De forma destacable, también se puede dar preferencia a composiciones en las que se mejora la longevidad pero no se reducen los virus. Se espera que estas composiciones mejoren la longevidad actuando sobre los factores estresantes que actúan sobre las abejas que no están relacionados con los virus (los ejemplos incluyen la infección por Nosema, exposición a pesticidas, estrés derivado de temperaturas frías, etc.).

Ejemplo 7

Un extracto de *Ganoderma resinaceum* a los 14 días dio como resultado un aumento en la supervivencia de casi el 20 % de abejas obreras respecto de los controles. Véase también la Fig. 5. Esta diferencia puede ser muy significativa para ayudar en la supervivencia de la colonia, ya que la longevidad de las abejas obreras durante este tiempo crítico da como resultados que no se reclutan prematuramente abejas enfermeras, permitiéndoles por tanto atender mejor al mantenimiento de las crías, la siguiente generación, saludables. La adición de extractos miceliares de *Ganoderma resinaceum* dio como resultado una reducción notable en las cargas totales de patógenos víricos en abejas (de múltiples virus), mientras que el control de azúcar, sin extractos miceliares, dio como resultado una mayor

población de virus globales. Como los entomólogos creen que los virus son el desafío sanitario más importante, facilitando frecuentemente la posterior infección con otras especies bacterianas (es decir, lo que americana) y fúngicas, la reducción de virus puede ser una ventaja clave para proteger las abejas de los trastornos de colapso de la colonia y sus muchos factores estresantes asociados.

En términos de aumento de la longevidad, la adición de 1 % de extractos miceliarios de *Fomes fomentarius* y *Ganoderma resinaceum* a agua azucarada (agua -50 gramos, azúcar 49,5 gramos, extracto micelial 0,5 gramos), estadísticamente, amplió significativamente la duración de la vida de las abejas -en términos de días de abeja de vida- en un 17,6 % y un 8,9 %, respectivamente. Una duración de la vida promedio ampliada significa que más obreras están disponibles para realizar tareas, una ventaja significativa para las estresadas colonias de abejas con márgenes de operación muy estrechos y las colonias estresadas al borde del colapso. Cuando hay más abejas en cualquier momento, esto es significativo para la adquisición de polen y el mantenimiento de la colmena. Por extensión, muchas más colmenas se pueden salvar alimentándolas con extractos miceliarios en su agua azucarada respecto a las que solamente tienen agua azucarada sin extractos miceliarios. Hasta que no realicemos ensayos de campo, no sabremos cuántos más abeja-día inclinarán la balanza para ayudar a las abejas a superar el CCD ya que hay tantas complejidades. Sin embargo, el consenso entre los científicos de abejas es que aumentar la longevidad de las abejas obreras, bajo estrés, es una gran ventaja. Por otra parte, cuando los extractos están fabricados a partir de, en estos casos, madera de abedul (especies de *Betula*), las mismas tres especies donde habitan las setas políporas, y en donde anidan las abejas, los extractos pueden ser más potentes y al mismo tiempo menos caros de producir. Lo que se puede mostrar a través de la intensa actividad significativa derivada de los micelios que crecen en arroz refuerza el argumento de que es el micelio el factor beneficioso causante (los controles de arroz no mostraron actividad). Al utilizar micelio crecido sobre arroz como medio para inocular 10-100x más masa en la forma de serrín de abedul expande exponencialmente el micelio respecto de los extractos de micelio en arroz notificados en el presente documento. El micelio crece más densamente ramificado y las redes miceliarias son más compactas en serrín de abedul, en comparación con el arroz, lo que significa que se genera mayor superficie específica para la expresión de los componentes extracelulares. Por tanto, este inventor anticipa que los extractos miceliarios procedentes de serrín de abedul serán una realización preferida de la presente invención. Se prevé que mucas especies de *Ganoderma* y otras especies políporas también ofrecerán una "bioescudo" de protección similar. Sin dudarlo, las setas con agallas, debido a su cercanía evolutiva con los políporos, serán análogamente beneficiosas.

Ejemplo 8

Un extracto líquido del micelio, o un precipitado de dicho extracto, o un extracto concentrado del que se ha eliminado todo o parte del disolvente, que contiene estos principios activos, se puede añadir a la miel, a agua enriquecida con miel, a agua azucarada o dulces de derivados de la miel de abejas, al polen, a sustitutos del polen, o a otras sustancias de otras formas evidentes para el experto en la técnica de la apicultura o las prácticas comerciales. El extracto se puede usar como adyuvante para otros remedios, haciéndolos más eficaces. Los extractos pueden estar en forma líquida, congelada, liofilizada, secada al aire, desecada al aire, deshidratada en una ventana de refractancia, deshidratada sónicamente, o parcialmente purificada, en cantidades suficientes para tener el efecto de atraer abejas y/o beneficiar la salud de las abejas, la producción de miel, y la polinización. Por otra parte, estas formas derivadas de los extractos serán de utilidad para el consumo humano porque son sabrosas, tienen muchos antioxidantes, así como otras propiedades beneficiosas para las personas, otros animales, lo que incluye las abejas.

Ejemplo 9

Un sistema de administración preferido sería incorporar los extractos miceliarios a dulces de polen, o pastas grasas. Los dulces de polen son elaborados por los apicultores que los sitúan sobre la cámara de cría como fuente de nutrición. Pueden estar hechos de una amplia gama de materiales, entre los que se incluyen soja, levadura de cerveza, jarabe de azúcar y puede opcionalmente incluir polen de crecimiento orgánico. Estas pastas de polen son un suplemento nutricional para las abejas. Como se utilizan ampliamente en otoño, ayudan a sobrevivir a las abejas hasta el año siguiente. Estos extractos también contienen enzimas digestivas, que ayudan a las abejas a metabolizar mejor el alimento, y ayudan a descomponer toxinas y mejorar la inmunidad básica.

Ejemplo 10

Una mezcla de composiciones que comprenden extractos de *Stropharia rugoso-annulata*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* y/o *Schizophyllum commune*, que ofrecen conjuntamente una pluralidad de beneficios, se puede añadir al agua. La *Stropharia rugoso-annulata* atrae abejas, tiene una fragancia de tipo floral, y proporciona un fuente de nutrientes rica en azúcar (hasta 75 polisacáridos). Los extractos de *Fomes fomentarius* y *Fomitopsis officinalis* transmiten beneficios antiviricos, junto con los beneficios ya mencionados para *Stropharia rugoso-annulata*. Los tres extractos contienen polifenoles y, más especialmente cumarinas, que ayudan a activar las rutas de la enzima p450, que ayuda a las abejas a detoxificar toxinas endógenas, naturales, extrañas y antropogénicas, y sus efectos perjudiciales asociados. Una mezcla de estos extractos se puede proporcionar a las abejas en su agua de bebida, su agua enriquecida, miel, propóleo, dulces de polen, o incluso en la cera utilizada para fabricar panales.

preformados en la creación de alzas para la producción de miel.

Ejemplo 11

5 Se añadieron extractos del micelio de *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma resinaceum*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* y/o *Inonotus obliquus* al agua azucarada alimentada de forma típica a las abejas al principio de la primavera antes de que aumenten los niveles de polen, para ayudar a reducir las cargas de virus residentes al principio de la estación, evitando su aumento hasta el nivel de convertirse en una enfermedad que altera el comportamiento o produciendo la
10 transferencia de patógenos de una abeja a otra. Los extractos se pueden mezclar simplemente con el agua azucarada a una tasa suficiente para tener un efecto positivo. El intervalo podría ser preferentemente 0,01 -20 %, o más preferentemente 0,1 - 10 % del volumen de las composiciones de agua azucarada utilizadas por los apicultores. Los extractos se mezclarían con agua en primer lugar y posteriormente se añadiría azúcar para preparar el típico jarabe. El elevado contenido de azúcar actúa como un conservante para mantener las propiedades antivíricas y
15 antibacterianas durante mucho tiempo.

Ejemplo 12

Extractos de micelios de setas medicinales se pueden humedecer en tiras de papel. Estas tiras de papel se pueden combinar con un adhesivo. El bajo pH de muchos extractos miceliarios de setas medicinales, en el intervalo de pH de 0,5-4, es tóxico para los ácaros, pero inocuo para las abejas cuando entran en contacto. Se puede añadir opcionalmente una solución de ácido oxálico en cantidades eficaces.

Ejemplo 13

25 Uso de extractos del micelio o cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* y *Schizophyllum commune* en donde los extractos se concentran a una forma atractiva y para las abejas y suficiente, tras el contacto, para tener el efecto de reducir el virus de la mancha anular del tabaco, el virus israelí de la parálisis aguda, el virus
30 Black Queen Cell, el virus iridiscente de invertebrados, o IIV6, y microsporidia *Nosema*, dando como resultado que las abejas pueden superar mejor el trastorno de colapso de la colonia.

Ejemplo 14

35 Uso de extractos del micelio o cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Schizophyllum commune*, *Inonotus obliquus* y *Stropharia rugoso-annulata* en donde los extractos se concentraron en una forma que se parece a la textura y consistencia de la miel, en una forma atractiva para las abejas y suficiente, tras el contacto, para tener el efecto de reducir virus, incluidos, aunque no de forma limitativa, el virus de la mancha anular del tabaco, el virus israelí de la parálisis aguda,
40 el virus Black Queen Cell, y microsporidia de *Nosema* y que produce la regulación en exceso de las rutas de la enzima p450, mejorando la función inmunitaria global, capacidad forrajera, invernada, resistencia a la sequía, capacidad de superar las pérdidas de plantas proveedoras de néctar, dando como resultado una mejora en la salud de las abejas de forma que hay un beneficio mensurable para que las colmenas sobrevivan y superen el CCD y produzcan generaciones de descendencia. Esta "miel micológica" se puede usar por separado, o mezclarse con miel
45 de abejas para atraer y beneficiar a las abejas. Por otra parte, esta "miel micológica" se puede disolver parcialmente en agua como pulverización foliar para plantas o aplicarse directamente sobre las abejas. Adicionalmente, esta "miel micológica" se puede comercializar como nutracéutico para consumo humano.

Ejemplo 15

50 Las abejas que vuelan hacia, o desde, el agua azucarada, tras entrar en la colmena, vibran y agitan sus cuerpos para desprenderse de los ácaros. Si los ácaros caen a través de un tamiz, pueden entrar en contacto, o ser atraídos, hacia el microatrayente entomopatógeno, que por sí mismo puede ser letal, o sobre el micelio insecticida, en el que los ácaros se hunden o mueren, reduciendo la capacidad de los ácaros para desplazarse e infectar, disminuyendo
55 por tanto su amenaza como vector a las abejas. Por otra parte, si las abejas se pulverizan con un pulverizador enriquecido en ácido oxálico, los ácaros parásitos se vuelven más susceptibles las propiedades infecciosas o letales del hongo entomopatógeno.

Ejemplo 16

60 Los extractos, fragmentos de hifas o esporas de hongos beneficiosos, tales como *Stropharia rugoso-annulata*, y las esporas de hongos entomopatógenos tales como Entomophthorales, se pueden incorporar como mezcla al extracto de agua azucarada enriquecido, alimento para abejas o miel, lo que permite su transferencia a la corriente de producción de miel, beneficiando a las crías, los zánganos, la reina, y la colmena en su conjunto.

Ejemplo 17

Extractos de micelio, o esporas, fragmentos de hifas, o tejido de, *Stropharia rugoso-annulata* se puede presentar sobre tiras de papel o en el agua accesible a las abejas. La fragancia de *Stropharia rugoso-annulata*, a la que las abejas están acostumbradas, ayuda a las abejas forrajeras a volver a sus colonias si estas fragancias se sitúan cerca o centro de las colmenas. Dichas fragancias se pueden emitir por cualquier método conocido en la materia de suministro de fragancias, nieblas, pulverizadores o dispensadores de aerosol. Se espera que los extractos micelares de *Stropharia rugoso-annulata* y los extractos de otros micelios de setas induzca el comportamiento de seguimiento o navegación mediante el "lenguaje de la danza" y las plumas de olor.

10 Ejemplo 18

Las esporas e hifas de *Metarhizium anisopliae* se pueden mezclar con micelios de *Fomes fomentarius* para producir pulverizadores y humos contra los ácaros de Varroa, para ayudar a las abejas a resistir a los ácaros, virus, etc. para superar el CCD. Muchas cepas de *Metarhizium* son relativamente no tóxicas; "No se esperan daños a los seres humanos derivados de la exposición a la cepa F52 de *Metarhizium anisopliae* por ingestión, inhalación, o toque de productos que contienen este principio activo". Hoja de datos de biopesticidas para la cepa F52 de *Metarhizium anisopliae* (029056).

20 Ejemplo 19

Una mezcla de composiciones de extractos de *Stropharia rugoso-annulata*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* y/o *Schizophyllum commune* y *Metarhizium anisopliae*, que ofrecen conjuntamente una pluralidad de beneficios, se puede añadir al agua. La *Stropharia rugoso-annulata* atrae abejas, tiene una fragancia de tipo floral, y proporciona un fuente de nutrientes rica en azúcar (hasta 75 polisacáridos). Los diferentes extractos transmiten beneficios antivíricos y antibacterianos y prolongación de la vida, junto con la atracción de *Stropharia rugoso-annulata*. Los extractos de *Metarhizium anisopliae* pueden estar presentes en tiras adherentes o colchones, o en cualquier sustancia pegajosa para capturar ácaros o moscas de fóridos, o en el agua accesible a los mismos para atraer ácaros y moscas de fóridos, que tras el contacto, quedan debilitados o muertos, reduciendo su capacidad para ser un vector de enfermedad; las poblaciones de ácaros de *Varroa* se pueden reducir usando extractos de *Metarhizium anisopliae* antes de que se sellen las cámaras de cría, reduciendo las muertes de las abejas producidas por la exposición a los ácaros y las enfermedades que transportan. Los tres extractos contienen polifenoles y, más especialmente cumarinas, que ayudan a activar las rutas de la enzima p450, que ayuda a las abejas a detoxificar toxinas endógenas, naturales, extrañas y antropogénicas, y disminuyen sus efectos perjudiciales asociados. Una solución de estos extractos mixtos se puede proporcionar a las abejas mediante alimentadores de néctar que contienen su agua de bebida o agua enriquecida con fructosa, por mezclado con dulces de derivados de la miel de abejas, miel, propóleo, dulces de polen, o incluso por mezclado con la cera utilizada para fabricar panales preformados en la creación de alzas para la producción de miel.

40 Ejemplo 20

Extractos del micelio preconidial de *Metarhizium anisopliae*, patógeno para los ácaros y/o las moscas, se pueden mezclar con esporas o fragmentos de hifas del mismo, y se presentaron en tiras o colchones adherentes, o en cualquier sustancia pegajosa para capturar ácaros o moscas de fóridos, o en el agua accesible a los ácaros. Esta combinación atrae ácaros o moscas, que tras el contacto, quedan infectados con un hongo entomopatógeno o quedan expuestos a dosis letales de toxinas entomopatógenas.

Ejemplo 21

Extractos del micelio preconidial de *Metarhizium anisopliae* mezclado con extractos, esporas o fragmentos de hifas de *Stropharia rugoso-annulata* se puede presentar sobre tiras de papel o en el agua accesible a las abejas. Esta combinación atrae ácaros o moscas, y abejas, que tras el contacto, daña a los ácaros y moscas pero no a las abejas.

55 Ejemplo 22

Extractos del micelio preconidial de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* se pueden mezclar con esporas o fragmentos de hifas de *Stropharia rugoso-annulata* y se presentan sobre tiras de papel o en el agua accesible a las abejas. Esta combinación atrae ácaros o moscas, y abejas, que tras el contacto, daña a los ácaros y moscas pero no a las abejas. Opcionalmente, cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* se pueden usar que tienen niveles reducidos de aflatoxina y neurotoxina, por debajo de los niveles a los que dañarían las abejas pero por encima de los niveles que dañan ácaros y moscas, transmitiendo de esta forma un beneficio neto a la salud de la colonia.

65 Ejemplo 23

Extractos del micelio preconidial de *Metarhizium anisopliae* se pueden mezclar con esporas o fragmentos de hifas de *Stropharia rugoso-annulata* se pueden presentar sobre tiras de papel o en el agua accesible a las abejas. Esta combinación atrae ácaros o moscas, y abejas, que tras el contacto, daña a los ácaros y moscas pero no a las abejas. Opcionalmente, se pueden usar cepas de *Metarhizium anisopliae* que tienen niveles reducidos de destructina, por debajo de los niveles a los que dañarían las abejas pero por encima de los niveles que dañan ácaros y moscas, transmitiendo de esta forma un beneficio neto a la salud de la colonia.

Ejemplo 24

Extractos de micelio de setas y/o extractos del micelio preconidial de *Metarhizium anisopliae* se pueden mezclar con extractos o derivados de árboles de Nim y presentarse sobre tiras de papel, en el agua accesible a las abejas, o en pulverizadores tópicos. Esta combinación atrae ácaros o moscas, y abejas, que tras el contacto, daña a los ácaros y moscas pero no a las abejas. Opcionalmente, se pueden usar cepas de *Metarhizium anisopliae* que tienen niveles reducidos de destructina, por debajo de los niveles a los que dañarían las abejas pero por encima de los niveles que dañan ácaros y moscas, transmitiendo de esta forma un beneficio neto a la salud de la colonia. Opcionalmente, la concentración de los extractos de árboles de Nim (o del principio activo, azadiractina), y los azúcares se pueden equilibrar para optimizar los beneficios para las abejas reduciendo los ácaros y sus capacidades forrajeras, y sus cargas de patógenos. Además, esta combinación se puede potenciar adicionalmente mediante la adición de extracto de hongos basidiomicetos de hongos agaricoides y poliporoides, que no solo proporcionan ácidos oxálicos destructores de ácaros, y enzimas degradadoras de toxinas, sino que también regulan en exceso las rutas enzimáticas del citocromo p450 innatas de las abejas para descomponer toxinas antropomórficas, y adicionalmente reduce los patógenos vírica, bacterial y fúngicamente asociados que afectan las abejas. Dichos efectos sinérgicos derivados de múltiples componentes tienen el efecto neto de ayudar a las abejas a sobrevivir mejor al trastorno del colapso de la colonia. Una combinación entre el uso de micelio preconidial de *Metarhizium anisopliae*, los extractos de *Fomitopsis officinalis* y *Fomitopsis pinicola*, los extractos de árboles de Nim, los extractos de *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Stropharia rugoso-annulata* sumergidos y mezclados con agua se prevé que es una composición eficaz y un método para fabricar un pulverizador administrable, eficaz o ingrediente eficaz en dulces de polen o en agua de bebida. Composiciones similares se pueden pulverizar sobre plantas o árboles que las abejas polinizan, lo que beneficia tanto a la planta como a la abeja.

Ejemplo 25

Los métodos y composiciones de ácido oxálico, agua enriquecida con azúcar (o polisacárido) y los fragmentos preconidiales de hifas de *Metarhizium anisopliae* que tras el contacto con las abejas daña selectivamente los ácaros proporcionando al mismo tiempo un beneficio neto a las abejas. Esta composición se puede combinar opcionalmente con extractos de micelios de setas medicinales con propiedades antivíricas y de mejora de la longevidad e incorporarse al alimento de abejas.

Ejemplo 26

La combinación de los extractos de *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma resinaceum*, *Schizophyllum commune*, *Stropharia rugoso-annulata* y *Ganoderma resinaceum* junto con los extractos del micelio preconidial de *Metarhizium anisopliae* para atraer a las abejas y a los ácaros en donde, tras el contacto con esta combinación, daña los ácaros de Varroa, reduciendo los virus, hongos patógenos y bacterias, proporcionando un beneficio neto a las abejas para que superen el trastorno del colapso de la colonia.

Ejemplo 27

La combinación del micelio preconidial de *Metarhizium anisopliae* con polisacáridos de *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus* y *Schizophyllum communes*, para atraer a las abejas y los ácaros en donde el contacto con esta combinación daña los ácaros de Varroa, y reduce los virus, bacteriófagos, hongos patógenos y bacterias que dañan a las abejas pero tienen un beneficio neto para las abejas para que superen el trastorno del colapso de la colonia.

Ejemplo 28

Uso de extractos de los micelios o cuerpos fructíferos que carecen de melanina tales como los denominados cuerpos fructíferos albinos de *Agaricus blazei*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune*, *Trametes elegans* y *Stropharia rugoso-annulata* en donde los extractos se concentraron en una forma que se parece a la textura y consistencia de la miel, en una forma atractiva para las abejas y suficiente, tras el contacto, para tener el efecto de reducir el virus de la mancha anular del tabaco, el virus israelí de la parálisis aguda, el virus iridiscente de invertebrados, o IIV6, y microsporidia de Nosema y que produce la regulación en exceso de las rutas de la enzima p450, mejorando la función inmunitaria global, capacidad forrajera, invernada, resistencia a la sequía, capacidad de superar las pérdidas de plantas proveedoras de néctar, dando como resultado

una mejora en la salud de las abejas de forma que hay un beneficio mensurable para que las colmenas sobrevivan y superen el trastorno de colapso de la colonia y produzcan generaciones de descendencia. Esta "miel micológica" se puede usar por separado, o mezclarse con miel de abejas para atraer y beneficiar a las abejas. Por otra parte, esta "miel micológica" se puede disolver parcialmente en agua como pulverización foliar para plantas o aplicarse directamente sobre las abejas. Adicionalmente, esta "miel micológica" se puede comercializar como nutracéutico para consumo humano.

Ejemplo 29

Cultivar los micelios de setas medicinales sobre materiales vegetales que tienen actividad contra virus, incluidos *Ficus bengalensis* (baniano), *Ficus religiosa* (Pimpal), *Jasminum auriculatur* (Jaai), *Acacia catechu* (catecú), *Azadirachta indica* (Nim), *Curcuma longa* (Turmerico), *Withania somnifera* (Ashwagandha) y *Silybum marianum* (cardo mariano). Véase Deshpande et al., Antiviral activity of plant extracts against sac brood virus in vitro - a preliminary report, *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences* 3(6): Noviembre-diciembre de 2013, pág. 1-22.

Ejemplo 30

MATERIALES ESTRUCTURALES TRATADOS FÚNGICAMENTE PARA AYUDAR A PROTEGER LAS COLONIAS DE ABEJAS

Las colmenas están hechas normalmente de fibras de madera, y 'alzas' apilables como marcos de soporte en los que las abejas crean panales de miel ricos en miel, por encima de las cámaras de cría. Estas alzas y el resto de marcos creados en madera usados por los apicultores se degradan en su caso, frecuentemente, crecen mohos que pueden ser patógenos para las abejas y animan la invasión por insectos y artrópodos. Como resultado, los apicultores suelen sustituir sus alzas, cámaras de cría, y suelos etc. cada pocos años. Las bases de las colmenas tienen a durar más, pero finalmente todas las cámaras de la colmena se degradan con hongos patógenos frecuentemente oportunistas, y la salud de las colonias de abejas se ve afectada negativamente como resultado.

La presente invención es añadir, incorporar, impregnar, revestir, infundir o unir esporas o fragmentos de micelios, o extractos de los mismos, de hongos beneficiosos, más específicamente hongos formadores de setas de la clase de Basidiomicetos/Basidiomicota o ascomicetos, en los marcos de las colmenas, que transmiten beneficios para la salud de las abejas proporcionando un escudo de defensa del hospedador de beneficios individuales o sinérgicos. Por ejemplo, y no como limitación, los marcos de las alzas pueden estar hechos de hojas de madera, fibra de madera, y una amplia gama de productos agrícolas que se unen entre sí con micelios, con o sin esporas. Dichos paneles fúngicamente impregnados no solo proporcionan un beneficio estructural, sino que el hongo puede tener propiedades antimicrobianas, antibacterianas, antifúngicas, antiinsecticidas que ayudan a las abejas a establecerse sobre y dentro de los materiales utilizados para construir las colmenas.

Además de las colmenas, todas las estructuras que alojan animales se pueden tratar ventajosamente con extractos o micelios, incluidos jaulas de aves, graneros, y estructuras para alojar murciélagos.

Los materiales que se pueden usar para hospedar estos hongos beneficiosos pueden estar hechos de madera, tableros de partículas, paneles estructurados biodegradables, sustitutos de paneles de madera con crecimiento fúngico, materiales no biodegradables, y también se pueden incorporar a la cera de abeja usada en los marcos, o incluso el propolis que las abejas usan para cerrar huecos. Las composiciones y métodos de la presente invención se pueden incorporar fácilmente a dicha fabricación de colmenas de estructura abierta.

Esencialmente, a medida que la colmena envejece, proporciona incremental, esporádica o crecientemente un beneficio para la salud de las abejas derivado de la adición de los hongos anteriormente mencionados para desplazar los crecientes estresores que se aparecen en las cámaras de las colmenas a medida que envejecen. Las propiedades antivíricas de estos hongos, su creación de un surtido completo de azúcares complejos y simples, la producción de ácido p-cumárico y otras moléculas activadoras del citocromo p450, la formación de esporas de hongos entomopatógenos tales como *Metarhizium anisopliae* que daña a los ácaros pero no a las abejas, todos actúan sinérgicamente para contrarrestar la miríada de factores estresantes que padecen las abejas durante la vida de las colonias en las colmenas, año tras año.

Uno de los numerosos ejemplo sería el crecimiento de micelios de, por ejemplo, los políporos *Antrodia cinnomonea*, *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus*, *Inonotus pini*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitiporia robusta*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma australe*, *Ganoderma atrum*, *Ganoderma annulare*, *Ganoderma annularis*, *Ganoderma brownii*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma tsugae*, *Lenzites betulina*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus pini*, *Phellinus weirii*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes elegans*, *Trametes versicolor* y las setas con agallas *Schizophyllum commune*, *Stropharia rugoso-annulata* y *Lentinus ponderosus*. sobre materiales residuales agrícolas de forma que el micelio se puede formar dentro de los paneles estructurales usados para construir las cámaras de abejas para abejas melíferas. Adicionalmente, el hongo destructor de ácaros *Metarhizium anisopliae*, se puede hacer crecer en un estado preconidial (preesporulación) o post conidial (posterior a la esporulación -o una

mezcla de los mismos- y se incluirán directamente en los paneles contruidos, independientemente de su composición, en combinación con los hongos descritos en el presente documento así como otras especies que este inventor prevé que podrían ayudar a las abejas dentro de los basidiomicetos, ascomicetos, o los Entomophthorales, Hypocreales, u otros hongos que atacan los ácaros y/o las moscas de fíridos.

5 De manera similar, gallineros, comederos de aves, celosías vegetales, etc. se pueden construir con productos celulósicos impregnados con micelios y/o esporas.

10 Por otra parte, las especies anteriormente mencionadas y sus muchos parientes contienen y secretan enzimas degradadoras de toxinas que pueden ayudar a descomponer insecticidas (incluidos neonicotinoides, neonicos), fungicidas, pesticidas, formaldehídos, taninos, tintes, toxinas endémicas, y una amplia gama de toxinas antropogénicas.

15 Un sustrato maderero preferido estaría compuesto de paneles de abedul, tableros o serrín (especies de *Betula*) y la especie preferida serían los políporos de abedul tales como, aunque no de forma limitativa *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus*, *Ganoderma resinaceum* y *Piptoporus betulinus*. Si está hecho de madera de conífera, entonces lo políporos tales como *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Laetiporus sulphureus*, *Phellinus igniarius*, *P. pini*, *P. linteus* y *P. weirii*; o setas con agallas tales como *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus ponderosus* son candidatos ideales. *Trametes versicolor* (=Coriolus versicolor) es una seta polípora que crece sobre madera de conífera caduca y es también una especie preferida a utilizar en el contexto de la presente invención. En cada una de las especies relacionadas, deben considerarse en el concepto más amplio de la especie, es decir *sensu lato*, y se prevé que parientes próximos sean también útiles para ayudar a las abejas. Por tanto, cuando se describen *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Trametes versicolor*, o cualquier otra especie de seta, esto significa *Fomitopsis officinalis sensu lato*, *Ganoderma applanatum sensu lato*, *Ganoderma lucidum sensu lato*, *Ganoderma resinaceum sensu lato*, *Inonotus obliquus sensu lato*, *Trametes versicolor sensu lato* y una amplia descripción similar de cualquier otra especie, cada uno del cual significa que este es el concepto de especie según se describe en la interpretación taxonómica más amplia, que abarca todos los sinónimos históricos y modernos, variedades, formas y especies que se han dividido o se dividirán a partir de estas especies desde su publicación. Como es sabido en la técnica, los nombres cambian a medida que aparecen nuevos conceptos para las especies. Las especies previstas como útiles son tremendamente amplias, muchas de las cuales se han relacionado en las 8 patentes estadounidenses previamente aprobadas del inventor y en las solicitudes de patente en tramitación presentadas hasta la fecha. No obstante, dichas especies no anteriormente relacionadas pueden ser actualmente evidentes, después del descubrimiento de este inventor.

30 Que las setas políporas *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus* y *Ganoderma resinaceum* son activas contra los virus que dañan las abejas y los seres humanos es notable, y en el mejor conocimiento de este inventor, médicamente, no tiene precedentes. Además, si estos beneficios cruzados para los animales se pueden obtener a partir de los extractos miceliarios de estas setas políporas, y por tanto de muchas setas, entonces mucho más de una especie animal de puede beneficiar de las amplias propiedades antivíricas que se derivan de los micelios de estas especies. Por tanto, jaulas de aves, gallineros, graneros, y alojamientos para animales de cualquier tipo podrían tener la adición de estos cultivos, sus extractos o sus esporas para beneficio inmunitario y de protección de la comunidad, evitando que los vectores de enfermedades aumenten e incluso curen las enfermedades de sus residentes. Potencialmente, los hogares que utilicen micelios y hongos protegen a los residentes de virus, bacterias, insectos, artrópodos, toxinas, factores de estrés ambiental, vectores de enfermedades y transmiten inesperadamente fragancias agradables específicas del hongo desplegado.

45 Los extractos útiles para la invención anterior pueden provenir como subproducto de los que utilizan micelios para rellenar formas o moldes para crear materiales estructurados con crecimiento fúngico, tales como aislantes, materiales de empaquetado para sustituir Styrofoam, materiales de construcción, materiales de embalaje, cojines de filtración, membranas de filtración, tejidos, armazones para chips y procesadores de ordenadores basados en crecimiento micelar, nanocables basados en micobacterias, etc. Adicionalmente, estos extractos útiles se pueden recoger expresando los componentes líquidos procedentes de los sustratos usados en todas las etapas de producción de setas así como de los métodos de fermentación fúngicos utilizados para fabricar tempeh, koji, enzimas, antibióticos, potenciadores del crecimiento vegetal, y sustancias farmacéuticas. En esencia, cuando se hacen crecer desde el micelio, los materiales fabricados de forma miceliar frecuentemente se secan. Al hacerlo, los metabolitos extracelulares e intracelulares y otros líquidos se deben eliminar. Cuando se hacen crecer materiales estructurados basados en micelios, este exceso de líquido se descarta y no suele tener mucho valor. La presente invención redirige este producto líquido 'residual' en una serie inesperada de productos de alto valor que pueden ser ricos en antivirales, antimicrobianos, enzimas, ácidos, principios activos, y otras sustancias químicas útiles para la presente invención para ayudar a las abejas y para otras muchas aplicaciones en medicamentos, ingeniería química, prácticas de degradación, y biorremediación (micorremediación). Por otra parte, el producto miceliado ahora seco se puede diseñar de forma que una población latente de células fúngicas sobreviva al proceso de secado, solo para reactivarse cuando la colmena envejece, haciendo que los micelios y esclerotina y clamidoesporas que toleran el calor sobrevivan y recrezcan para proporcionar un beneficio inusual -a medida que la colmena envejece, el hongo beneficioso impregnado compite con los patógenos fúngicos, proporcionan nutrientes, aumenta la longevidad global de la colonia de abejas. Los hongos beneficiosos se pueden seleccionar específicamente para conseguir supervivencia de esclerotina y clamidoesporas que toleran el calor posterior a la fabricación de los materiales

estructurados con crecimiento micelar. El líquido obtenido de la compresión del micelio así como el micelio tolerante al calor que reside dentro de los materiales estructurados se puede combinar para obtener un efecto sinérgico sobre la salud de las abejas.

5 Ejemplo 31

Se recogió miel a partir de abejas alimentadas con los extractos micelares como anteriormente. Esta miel medicinal ayuda tanto a las abejas como a las personas a regular en exceso las rutas para desnaturalizar toxinas, mediante las rutas del citocromo P450. Como la miel es un alimento para más que las abejas y las personas, se espera que dichas mieles medicinales tengan una amplia gama de usos. Las propiedades conservantes de la miel pueden ayudar a mantener estos compuestos medicinalmente activos más estables.

Ejemplo 32

15 α -Amilasa, amiloglucosidasa, ácido betulínico, ácido cafeico, ácido protocatéquico, ácido trans-cinámico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido elágico, lanosterol, inotodiol, ácidos trametenólicos, hispolonas, ergosteroles, crisina, cordicepina, ácido trans-o-cumárico, ácido trans-p-cumárico, ácido elágico dihidrato, ergosterol, ácidos linoleicos, ácido trans-ferúlico, ácido gálico hidrato, hexanal, hispolon, ácido 4-hidroxibenzoico, hidrato de quercetina, hidrato de rutina, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido sulferínico, ácido deshidrosulfurénico, ácido eburicoico, 6-cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona, 6-cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromen-3-carboxilato de etilo, 7-cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona, 7-cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromen-3-carboxilato de etilo, psilocibina, psilocina y sus análogos, isómeros, análogos estructurales y compuestos significativamente similares han demostrado ser útiles en la presente invención. También se anticipa que los compuestos serán útiles con otros animales, incluyendo seres humanos.

25 Ejemplo 33

Puesto que el ácido protocatéquico, ácido vanílico, ácido cinámico, el ácido cafeico, y sus análogos, isómeros, análogos estructurales y compuestos significativamente similares están ampliamente distribuidos y presentes en muchas plantas comestibles, y siendo el contenido de ácido protocatéquico naturalmente elevado en el salvado y el germen del arroz integral, las especies fúngicas beneficiosas para el crecimiento de las abejas mencionadas en el presente documento en un sustrato ya contienen ácido protocatéquico, sus precursores y análogos, probablemente aumentarán la cantidad neta de estos compuestos beneficiosos para las abejas, y es una realización adicional para mejorar la presente invención.

35 Ejemplo 34

Extractos de esporas, micelios y fragmentos de hifas, o tejido del cuerpo fructífero de las setas políporas *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Piptoporus betulinus*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune*, y *Inonotus obliquus*, se pueden aerosolizar, o administrarse mediante nubes de gotículas, pulverizarse sobre las colonias junto con una mezcla de esporas-micelios de *Metarhizium anisopliae*. Dicha mezcla reducirá los patógenos víricos, regulará en exceso las rutas de detoxificación de las abejas, proporcionan una amplia gama de azúcares complejos y simples, vitaminas para aumentar la inmunidad y la longevidad de la colmena. Además, la adición de esporas y micelios de *Metarhizium anisopliae* puede infectar, controlar y prevenir los ácaros de Varroa y las moscas de fóridos. El ácido oxálico endógeno de todos estos hongos puede ayudar a controlar estos patógenos. El uso individual o las combinaciones de hongos políporos del abedul puede restringir el crecimiento de los hongos microsporidium de Nosema, y las bacterias de loque americana (tales como la bacteria *Melissococcus plutonius*) impidiendo daños a la colonia de abejas. Dichas pulverizaciones aerosolizadas se pueden suministrar con pulverizadores de mano o rociadores de mochila. Como alternativa, se pueden desplegar tiras absorbentes infundidas con los agentes beneficiosos anteriormente mencionados. Los materiales contruidos usados para construir las estructuras de las cámaras de abejas también se pueden humedecer e impregnar con estos agentes beneficiosos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en mejorar la salud de las abejas aumentando la longevidad y reduciendo la carga vírica, en donde la composición comprende un extracto de un micelio de setas medicinales y un suplemento alimenticio para las abejas, en donde la composición comprende del 0,01 % al 1 % en volumen del extracto y en donde el micelio de setas medicinales se selecciona entre el grupo que consiste en *Inonotus obliquus*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* y combinaciones de los mismos.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1 en la que el suplemento alimenticio para las abejas comprende un producto seleccionado entre el grupo que consiste en agua, azúcares, jarabe de azúcar, agua con jarabe de maíz con un alto contenido de fructosa, dulces de derivados de la miel de abejas, néctar, polen, dulces de polen, dulces de grasa, propóleo, cera de abeja, aerosoles para abejas, alimentos para abejas, suplementos de proteínas y combinaciones de los mismos.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 en la que el micelio de setas medicinales se cultiva en un sustrato seleccionado entre el grupo que consiste en sustratos sólidos y sustratos líquidos.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1 en la que el extracto de un micelio de setas medicinales se selecciona entre el grupo que consiste en un extracto acuoso de micelio de setas medicinales, un extracto etanólico acuoso de micelio de setas medicinales, precipitado procedente de un extracto acuoso de micelio de setas medicinales precipitado mediante la adición de etanol, sobrenadante que queda después de eliminar el precipitado de un extracto acuoso de micelio de setas medicinales precipitado mediante la adición de etanol, precipitado procedente de un extracto etanólico acuoso de micelio de setas medicinales que se ha dejado reposar, concentrado procedente de un extracto etanólico acuoso de micelio de setas medicinales del que se ha eliminado una parte del disolvente, sobrenadante procedente de un extracto etanólico acuoso del que se ha eliminado una parte del disolvente, un extracto de micelio de setas medicinales del que se ha eliminado el disolvente, un extracto de disolvente no acuoso y no etanólico de micelio de setas medicinales, un extracto subcrítico y un extracto supercrítico de micelio de setas medicinales y un extracto ayudado por microondas de micelio de setas medicinales.
5. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición para mejorar la salud de las abejas comprende adicionalmente un miticida seleccionado entre el grupo que consiste en miticidas sintéticos, miticidas naturales y combinaciones de los mismos, y en donde los miticidas naturales se seleccionan entre el grupo que consiste en extractos de Nim, ácido oxálico, ácido fórmico, ácido láctico y combinaciones de los mismos.
6. La composición para el uso de la reivindicación 1 en donde la composición para mejorar la salud de las abejas mejora la salud de las abejas aumentando la longevidad en más de un 3 %.
7. La composición para el uso de la reivindicación 1 en donde la composición para mejorar la salud de las abejas mejora la salud de las abejas reduciendo la carga vírica en más de un 15 %.
8. La composición para uso de la reivindicación 1 en donde la composición para mejorar la salud de las abejas mejora la salud de las abejas aumentando la longevidad y reduciendo la carga vírica en un índice LV de más de 45.
9. Una composición para su uso en la mejora de la salud de las abejas, en donde la composición comprende del 0,01 % al 1 % en volumen de al menos un extracto de un micelio de setas medicinales seleccionado entre el grupo que consiste en *Inonotus obliquus*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* var. *resinaceum* y combinaciones de los mismos, y en donde, durante el uso, las abejas ingieren la composición.
10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición se aplica a un objeto seleccionado entre el grupo que consiste en colmenas, componentes de colmenas, ceras de abejas y combinaciones de las mismas y las abejas ingieren la composición.
11. La composición para el uso de la reivindicación 9 o el uso de la reivindicación 10, en donde la composición para mejorar la salud de las abejas comprende adicionalmente un miticida seleccionado entre el grupo que consiste en miticidas sintéticos, miticidas naturales y combinaciones de los mismos, y en donde los miticidas naturales se seleccionan entre el grupo que consiste en extractos de Nim, ácido oxálico, ácido fórmico, ácido láctico y combinaciones de los mismos.
12. La composición para el uso de la reivindicación 9 o el uso de la reivindicación 10, en donde el micelio de setas medicinales se cultiva sobre un sustrato seleccionado entre el grupo que consiste en sustratos sólidos y sustratos líquidos.
13. La composición para el uso de la reivindicación 9 o el uso de la reivindicación 10, en donde el extracto de un micelio de setas medicinales se selecciona entre el grupo que consiste en un extracto acuoso de micelio de setas

medicinales, un extracto etanólico acuoso de micelio de setas medicinales, precipitado procedente de un extracto acuoso de micelio de setas medicinales precipitado mediante la adición de etanol, sobrenadante que queda después de eliminar el precipitado de un extracto acuoso de micelio de setas medicinales precipitado mediante la adición de etanol, precipitado procedente de un extracto etanólico acuoso de micelio de setas medicinales que se ha dejado
 5 reposar, concentrado procedente de un extracto etanólico acuoso de micelio de setas medicinales del que se ha eliminado una parte del disolvente, sobrenadante procedente de un extracto etanólico acuoso del que se ha eliminado una parte del disolvente, un extracto de micelio de setas medicinales del que se ha eliminado el disolvente, un extracto de disolvente no acuoso y no etanólico de micelio de setas medicinales, extracto subcrítico y extracto supercrítico de micelio de setas medicinales y un extracto ayudado por microondas de micelio de setas
 10 medicinales.

14. La composición para el uso de la reivindicación 1 que comprende al menos un extracto de micelio de setas medicinales seleccionado entre el grupo que consiste en *Antrodia cinnomonea*, *Ganoderma atrum*, *Ganoderma brownii*, *Ganoderma curtisii*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma lingzhi*, *Ganoderma oregonense*, *Ganoderma tsugae*,
 15 *Fomitopsis officinalis* (*Laricifomes officinalis*), *Fomitiporia robusta*, *Heterobasidion annosum*, *Inonotus hispidus*, *Inonotus andersonii*, *Inonotus dryadeus*, *Laetiporus cincinnatus*, *Laetiporus sulphureus*, *Laetiporus conifericola*, *Lenzites betulina*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus linteus*, *Phellinus pini*, *Piptoporus betulinus*, *Polyporus elegans*, *Stereum complicatum*, *Stereum hirsutum*, *Stereum ostrea*, *Trametes elegans*, *Trametes gibbosa*, *Trametes hirsuta*, *Trametes villosa*, *Trametes cingulata*, *Trametes ochracea*, *Trametes pubescens*, *Trametes ectypa*, *Trametes aesculi*,
 20 *Wolfiporia cocos*, *Agaricus augustus*, *Agaricus blazei*, *Agaricus bonardii*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus campestris*, *Agaricus liliceps*, *Agaricus subrufescens*, *Agaricus sylvicola*, *Agrocybe pediades*, *Agrocybe aegerita*, *Agrocybe arvalis*, *Agrocybe praecox*, *Clitocybe odora*, *Conocybe cyanopus*, *Conocybe lacteus*, *Conocybe rickenii*, *Conocybe smithii*, *Conocybe tenera*, *Coprinopsis nivea*, *Coprinopsis lagopus*, *Coprinus comatus*, *Coprinus micaceus*, *Gymnopus hydrophilus*, *Gymnopus peronatus*, *Hypholoma aurantiaca* (*Leratiomyces ceres*), *Hypholoma capnoides*,
 25 *Hypholoma sublateritium*, *Hypsizygus marmoreus*, *Hypsizygus tessulatus*, *Hypsizygus ulmarius*, *Lentinus ponderosus*, *Lepiota procera* (*Macrolepiota procera*), *Lepiota rachodes* (*Chlorophyllum rachodes*), *Lepista nuda*, *Mycena alcalina*, *Mycena pura*, *Mycena aurantiadisca*, *Panellus serotinus*, *Panaeolus foenisecii*, *Panaeolus subbalteatus*, *Pleurotus columbinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus tuberregium*, *Panellus stipticus*, *Panellus serotinus*, *Pluteus cervinus*, *Psathyrella aquatica*,
 30 *Psathyrella condolleana*, *Psathyrella hydrophila*, *Psilocybe allenii*, *Psilocybe azurescens*, *Psilocybe caerulescens*, *Psilocybe coprophila*, *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe cyanescens*, *Psilocybe ovoideocystidiata*, *Psilocybe stuntzii*, *Psilocybe subaeruginosa*, *Stropharia aeruginosa*, *Stropharia cyanea*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Stropharia semiglobata*, *Stropharia semigloboides*, *Stropharia squamosa*, *Stropharia thrausta*, *Stropharia umbonotescens*, *Termitomyces robusta*, *Volvaria bombycina*, *Volvariella volvacea* y combinaciones de los mismos y en donde la
 35 composición comprende una cantidad total del 1 % o menos en volumen de extracto de micelio de setas.

15. Una composición para su uso en mejorar la salud de las abejas aumentando la longevidad y reduciendo la carga vírica, en donde la composición comprende un extracto de un micelio de setas medicinales y un suplemento alimenticio para las abejas, en donde la composición comprende del 0,01 % al 10 % en volumen del extracto de un
 40 micelio de setas medicinales y en donde el micelio de setas medicinales se selecciona entre el grupo que consiste en *Fomes fomentarius*, *Trametes versicolor* y una combinación de los mismos.

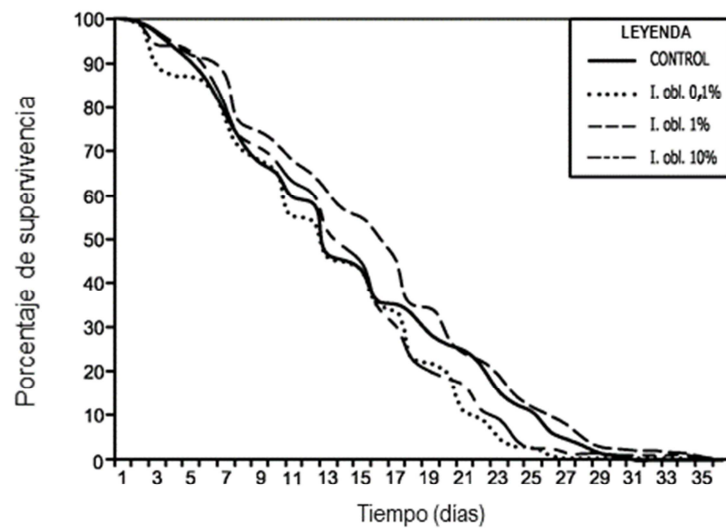


FIG. 1

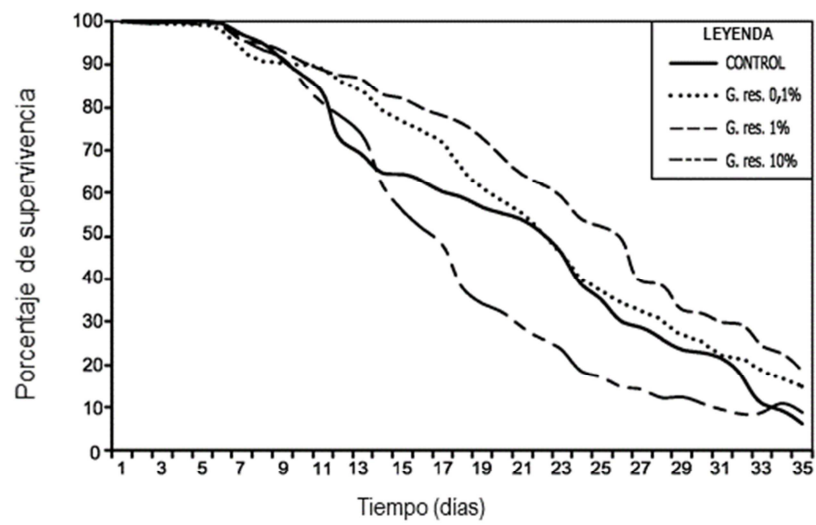


FIG. 2

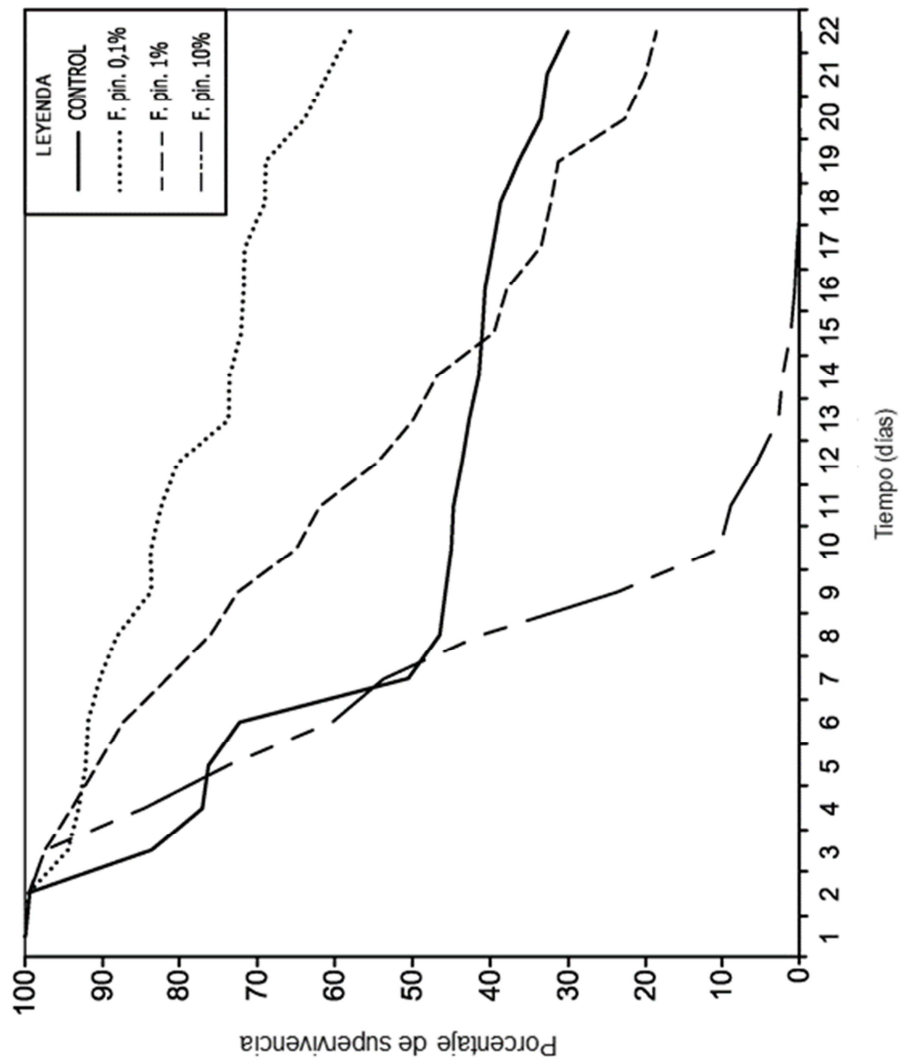


FIG. 3

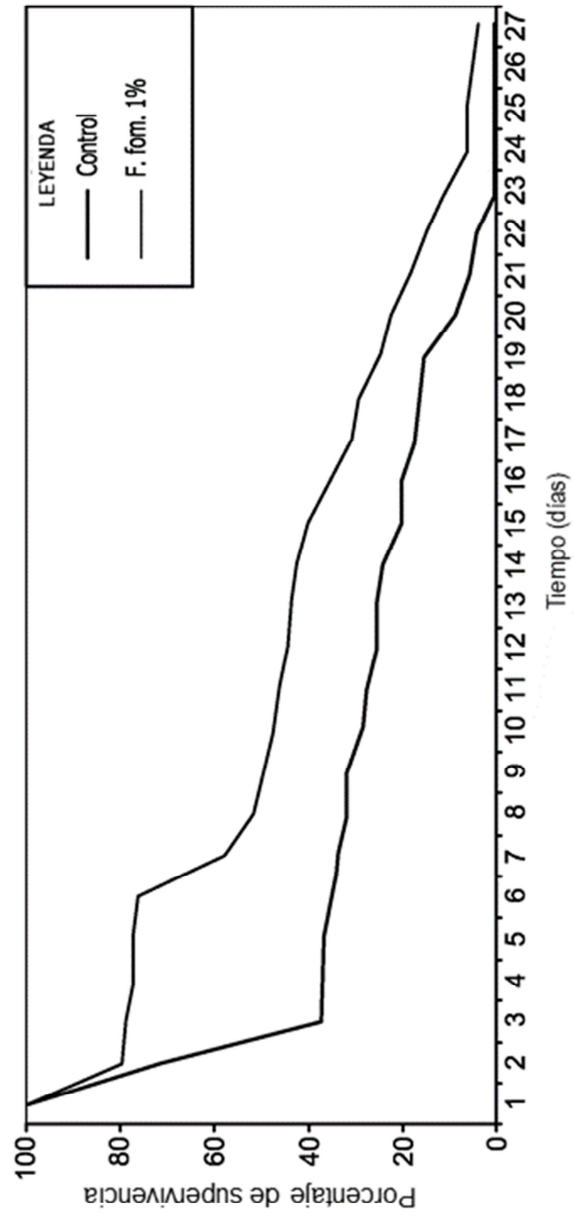


FIG. 4

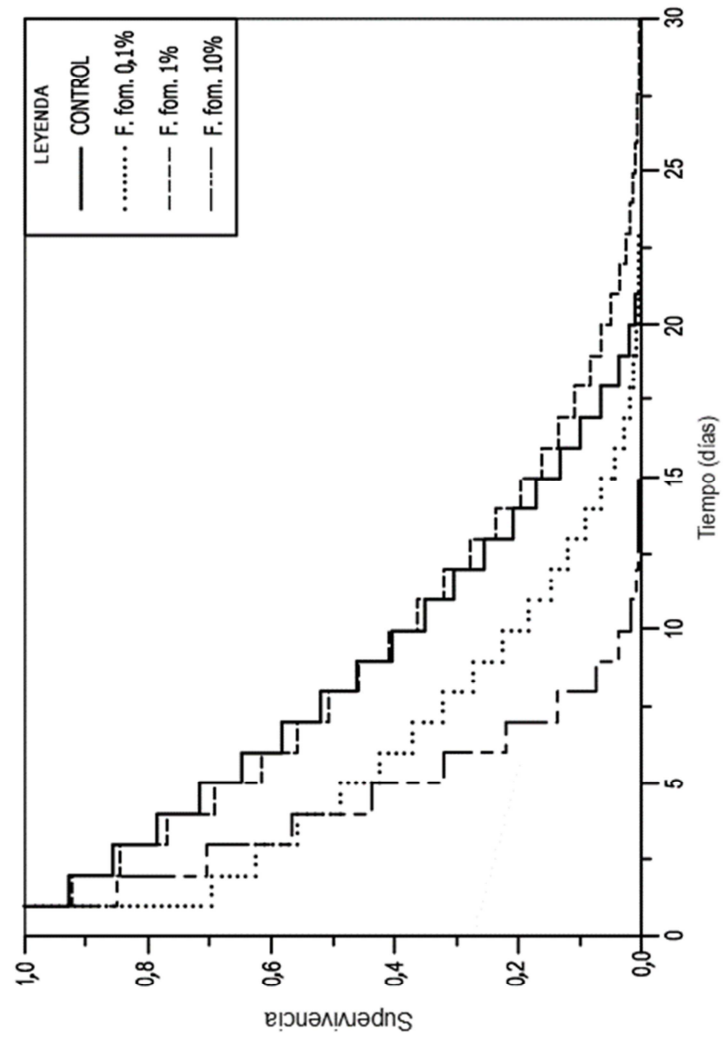


FIG. 5

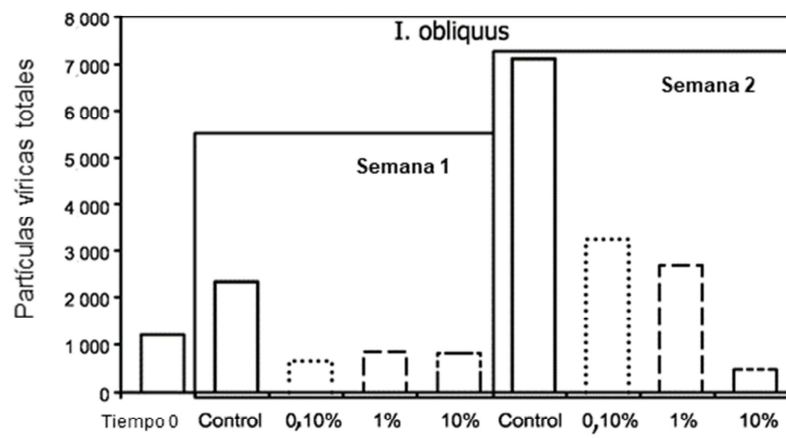


FIG. 6

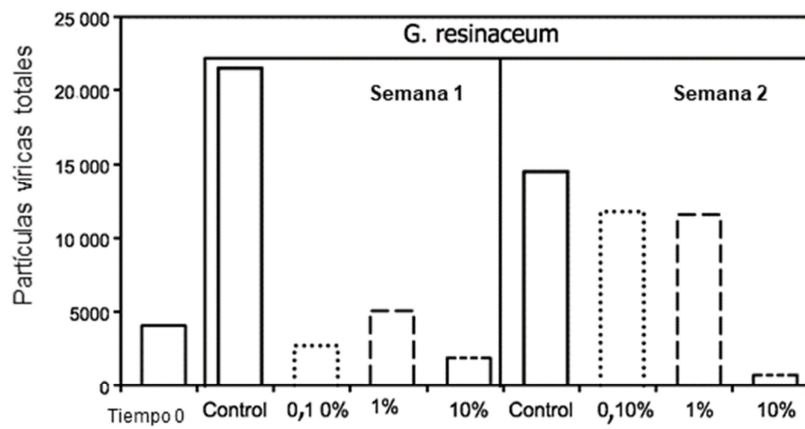


FIG. 7

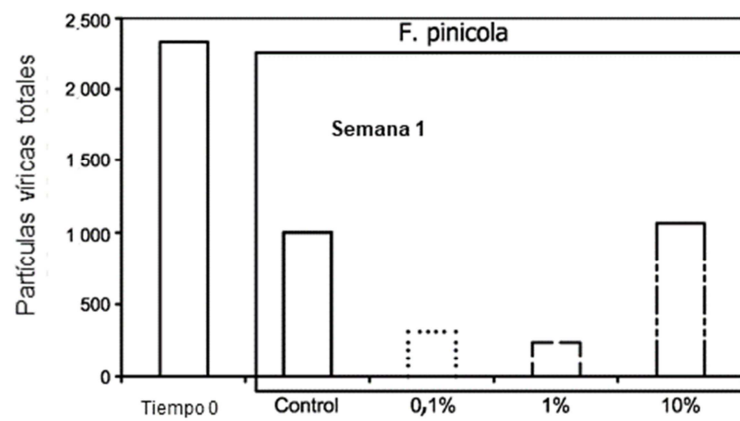


FIG. 8

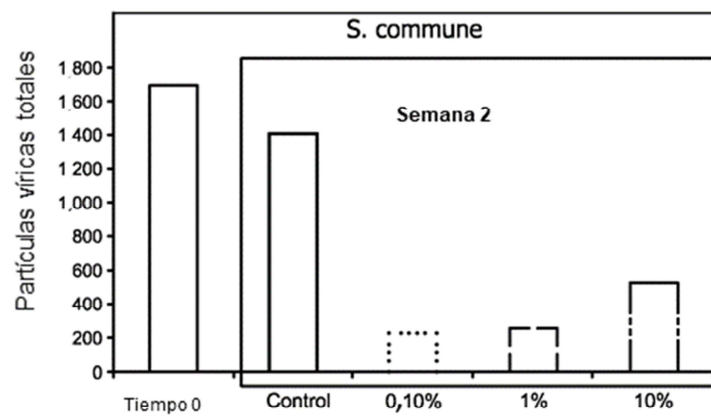


FIG. 9

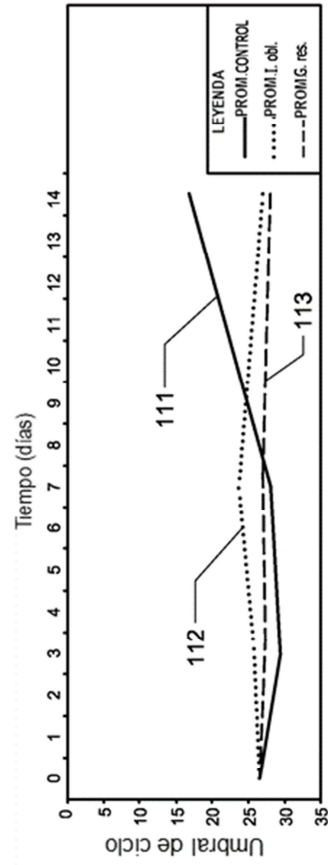


FIG. 10

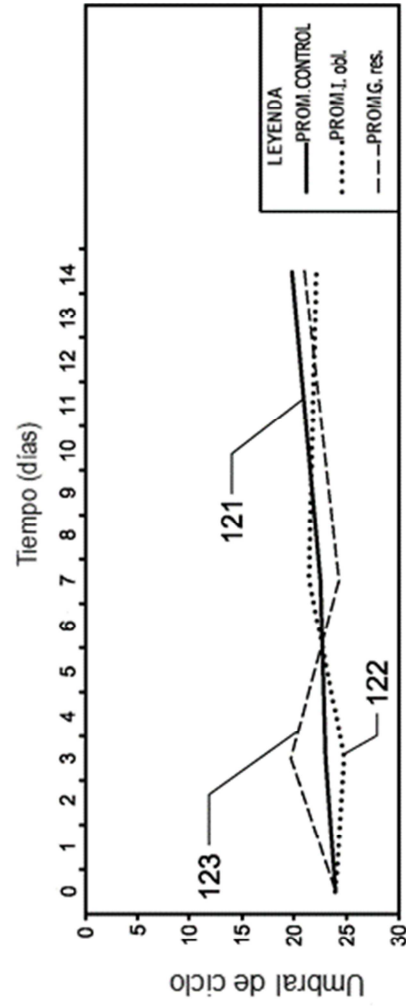


FIG. 11