

Manual abreviado para el estudio de la Varroosis en *Apis mellifera* en Latinoamérica

Elaborado por integrantes del Grupo de Estandarización de Técnicas de la Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas (SOLATINA) y RED CYTED COLMENA: Patricia Aldea¹, Belén Branchiccela^{2, 3}, Natalia Bulacio Cagnolo⁴, Agostina Giacobino^{4;5}, Ciro Invernizzi⁶, Adriana Pacini^{4;5}

1. Corporación Apícola Chile (CACH). Unidad de Investigación para la innovación en la apicultura chilena. San Francisco de Mostazal, Región de O'Higgins, Chile.
2. Sección Apicultura, Programa de Producción Familiar, INIA La Estanzuela. Ruta 50, Km 11. Colonia, Uruguay.
3. Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Av. Italia 3318. Montevideo, Uruguay.
4. Estación experimental Rafaela, INTA. Ruta Nacional 34 km 227. Ciudad, Argentina
5. Consejo Nacional de Investigaciones científicas y técnicas (CONICET). Ciudad, Argentina.
6. Sección Etología, Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Iguá 4225, Montevideo, Uruguay.

Aclaración: Este manual ha sido traducido y adaptado del capítulo “Métodos estándar para la investigación sobre Varroa” del manual de técnicas Beebook (Dietemann *et al.*, 2013).

Autores:

Vincent Dietemann, Francesco Nazzi, Stephen J Martin, Denis L Anderson, Barbara Locke, Keith S Delaplane, Quentin Wauquiez, Cindy Tannahill, Eva Frey, Bettina Ziegelmann, Peter Rosenkranz y James D Ellis



Resumen

Este es un manual básico y práctico de estandarización de técnicas para el estudio a nivel de laboratorio y de campo de *Varroa destructor*. Su objetivo es resumir las técnicas vinculadas al estudio de este ácaro, que serán usadas en una primera instancia por los grupos de trabajo de SOLATINA. La selección de las mismas se realizó teniendo en cuenta 1) su practicidad al momento de ser aplicadas por la mayoría de los laboratorios vinculados a la investigación en abejas de Latinoamérica, y 2) que los resultados obtenidos tras su aplicación sean fácilmente comparables entre laboratorios y que dicha comparación sea confiable. Además, se incluye la traducción de las distintas técnicas sugeridas en el capítulo de “Métodos estándar para la investigación sobre *Varroa destructor*” (Dietemann et al., 2013) del Beebook para que su acceso sea más fácil por la comunidad científica Latinoamericana. Con el objetivo de simplificar y adaptar los métodos a las características de la apicultura del continente se han unificado, modificado y eliminado algunas secciones. Todos los comentarios y aportes que puedan mejorar la calidad y utilidad de esta adaptación del manual pueden enviarse al mail solatina2017@gmail.com.

Contenido

1. Introducción	8
2. Taxonomía y sistemática	10
2.1. Taxonomía	10
2.2. Colecta de ácaros para su identificación	12
2.2.1. Apariencia de los ácaros	12
2.2.2. Dónde encontrar ácaros	13
2.2.3. Técnicas de muestreo de <i>Varroa</i> spp.	14
2.2.4. Almacenamiento de muestras de ácaros	14
2.2.4.1. Medio y condiciones de almacenamiento	14
2.2.4.2. Contenedor de almacenamiento.	15
2.2.5. Envío de las muestras	15
2.3. Métodos morfológicos para identificar <i>Varroa</i> spp.	16
2.3.1. Preparación de la muestra	17
2.3.1.1. Receta para la solución de Nesbitt:	18
2.3.1.2. Receta para el medio de Hoyer:	18
2.3.2. Identificación de la muestra	19
2.4. Métodos moleculares y sistemática.	19
2.4.1 Extracción de ADN e identificación de <i>Varroa</i> spp.	20
2.4.2 Haplogrupos e identificación de haplotipos	20
2.4.3. Determinación de parentesco con microsatélites	23
2.5. Perspectivas sobre la taxonomía de <i>Varroa</i> spp.	23
3. Técnicas de laboratorio	25
3.1. Recolección de ácaros	25
3.1.1. Recolección manual	25
3.1.2 Azúcar impalpable	26
3.1.3. Lavado con agua	28
3.1.4. Recolección de ácaros de la cría	29
3.1.4.1. Recolección de ácaros de larvas en estadio L5	29
3.1.4.2. Recolección de ácaros de celdas operculadas	30
3.1.4.2.1. Abrir cada celda de cría	30
3.1.4.2.2. Abrir una gran cantidad de celdas y lavar la cría	31

3.2. Cría de ácaros en el laboratorio	32
3.2.1. Mantenimiento de ácaros en el laboratorio	32
3.2.1.1. Mantener ácaros en abejas adultas	32
3.2.1.2. Mantener ácaros en cría de abejas	34
3.2.1.3. Dieta Artificial	35
3.2.2. Cría de ácaros en el laboratorio	35
3.2.2.1. Infestación Natural	35
3.2.2.2. Infestación artificial	36
3.3. Evaluación de la reproducción de Varroa en el laboratorio.	37
3.3.1. Evaluación de la fertilidad	37
3.4. Técnicas de marcado	37
3.4.1. Oogénesis	37
3.4.2. Sitio de alimentación	38
3.4.3. Marcado de ácaros	40
3.5. Infección de ácaros de Varroa con enfermedades secundarias	40
3.5.1. Micro-inyección	40
3.5.2. Inmersión	41
3.6. Bioensayos	41
3.6.1. Condiciones experimentales	41
3.6.1.1. Ambiente	41
3.6.1.2. Dosis de químicos	41
3.6.1.3. Ácaros a ser utilizados	42
3.6.2. Bioensayos en ecología química de Varroa	42
3.6.2.1. Invasión de celdas	42
3.6.2.1.1. Ácaros a utilizar	43
3.6.2.1.2. Diseño experimental	43
3.6.2.1.3. Análisis de los datos	44
3.6.2.2. Oogénesis	45
3.6.2.2.1. Ácaros utilizados en los bioensayos	45
3.6.2.2.2. Diseño experimental para probar la activación de ovogénesis	45
3.6.2.2.3. Diseño experimental para testear la oviposición	46
3.6.2.3.1. Ácaros para ser utilizados	48

3.6.2.3.2. Diseño experimental	48
3.6.2.3.3. Análisis de los datos	49
3.6.2.4. Fase forética	50
3.6.2.4.1. Ácaros a ser utilizados	51
3.6.2.4.2. Diseño experimental	51
3.6.2.4.3. Análisis de datos	52
3.6.2.5. Bioensayos de apareamiento	53
3.6.2.5.1. Ácaros utilizados en el bioensayo	53
3.6.2.5.2. Diseño experimental	56
3.6.3. Bioensayos para cuantificar la susceptibilidad de la Varroa a los acaricidas	56
3.6.3.1. Ácaros utilizados en bioensayos de susceptibilidad	57
3.6.3.2. Bioensayos para sustancias de contacto.	58
3.6.3.3. Bioensayos para sustancias volátiles.	61
3.6.3.4. Análisis de los datos	61
4. Métodos de campo	62
4.1. Técnicas diagnósticas	62
4.1.1. Tasa de infestación en cría de abejas	62
4.1.2. Tasa de infestación en abejas adultas	63
4.1.2.1. Muestreo	63
4.1.2.2. Separación de los ácaros de las abejas	63
4.1.2.2.1. Lavado en agua con detergente o etanol (75%)	63
4.1.2.2.2. Azúcar impalpable	64
4.2. Analizando la eficiencia de las técnicas de separación de ácaros y abejas.	65
4.3. Evaluación del tamaño poblacional total de los ácaros en la colmena.	65
4.4. Caída natural de ácaros en revisión de pisos técnicos	66
4.4.1. Procedimiento de flotación.	68
4.5. Otras técnicas alternativas	68
4.6. Estimar parámetros de reproducción	69
4.6.1. Evaluación del éxito reproductivo	69
4.6.2. Cuándo medir el éxito reproductivo	70
4.6.3. Cómo medir el éxito reproductivo	71

4.6.4. Evaluar la ovogénesis	73
4.7. Estimación de umbrales de daño	73
4.7.1. Cómo estimar umbrales de daño	74
4.7.1.1. Establecimiento de colonias	75
4.7.1.2 Tratamientos experimentales, tamaño de muestra y disposición de colonias	79
4.7.1.3 Variables dependientes y protocolos de muestreo	80
4.7.1.4 Análisis, interpretación y dificultades	91
4.7.2. Variaciones regionales en los umbrales de daños reportados.	93
4.8. Estandarización de ensayos de campo.	95
4.8.1. Condiciones para comenzar	95
4.8.1.1. Obtención de colonias libres de Varroa.	95
4.8.1.2. Obtención de colmenas libres de residuos	96
4.8.2. Infestación artificial de ácaros	97
4.8.2.1. Cómo introducir muchos ácaros	97
4.8.2.2. Cómo introducir Varroas en las colonias.	98
4.8.2.3. Cómo introducir ácaros dentro de las celdas	98
4.8.2.3.1. Infestación manual	99
4.8.2.3.2. Infestación natural	99
4.8.3. Ensayos de campo de semioquímicos	100
4.8.3.1. Invasión de la celda	100
4.8.3.1.1. Análisis de datos	101
4.8.3.2. Reproducción del ácaro	101
4.8.4. Evaluación de Varroocidas en el campo	102
4.8.4.1. Ensayos preliminares	103
4.8.4.2. Pruebas de eficacia	104
4.8.4.2.1. Análisis estadístico	104
4.8.4.2.2. Colmenas	104
4.8.4.2.3. Colonias	104
4.8.4.2.4. Ubicación	105
4.8.4.2.5. Tratamiento	105
4.8.4.2.6. Observaciones y parámetros	106

4.8.4.2.7. Evaluación de la eficacia	106
4.8.4.2.8. Evaluación de la seguridad del producto para las abejas	107
4.8.4.3. Patrón de resistencia	108
4.9 Cría de ácaros en las colonias	109
4.10. Atracción de la cría	113
4.10.1. Procedimientos para evaluar el atractivo de la cría	114
5. Referencias	116

1. Introducción

La mayoría de los investigadores de las abejas melíferas consideran al ácaro ectoparásito *Varroa destructor* como el enemigo más dañino de la abeja. Recientemente se ha identificado a dicho ácaro, como uno de los principales factores responsables de las pérdidas de colonias en todo el mundo (por ejemplo, Brodschneider *et al.*, 2010; Chauzat *et al.*, 2010; Dahle, 2010; Genersch *et al.*, 2010; Guzman Novoa *et al.*, 2010; Schäfer *et al.*, 2010; Topolska *et al.*, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012; Nazzi *et al.*, 2012). El desarrollo de métodos de control nuevos e innovadores contra el ácaro y los estudios sobre la interacción compleja con la abeja melífera deberían ser prioritarios en la investigación de la salud de las abejas (Dietemann *et al.*, 2012). Al revisar la literatura, los investigadores deben tener en cuenta que las publicaciones anteriores a 2000 mencionan *Varroa jacobsoni* en lugar de *V. destructor*. El nombre de la especie fue cambiado después de que Anderson & Trueman (2000) demostraron con herramientas moleculares que la población invasora no era la especie de Indonesia descrita por Oudemans en 1904.

El ciclo biológico de Varroa (revisado en Rosenkranz *et al.*, 2010) está dividido en dos fases: una fase tradicionalmente llamada forética (sobre la abeja adulta y alimentándose de los cuerpos grasos) (Ramsey *et al.*, 2019), cuya duración es entre 4 y 14 días y otra fase reproductiva (dentro de la celda de cría de obreras y zánganos), que dura entre 12 y 13 días. La madurez sexual se alcanza en el macho en 5,5 / 6 días y en la hembra en 7,5 / 8 días y posteriormente la cópula se produce en la celda de cría. Si la celda parasitada es de obrera, cada hembra fecundada que ingresa dará en promedio 1,6 ácaros hembras fecundadas mientras que, si es de zángano, debido a la mayor duración del periodo de operculado, el número aumenta a 2,7 hembras hijas fecundadas por hembra fundadora. Para iniciar un nuevo ciclo de reproducción (realiza de 1,5 a 2 ciclos en condiciones a campo según Fries & Rosenkranz, 1996) la hembra permanece hasta 6 días en fase forética sobre la abeja con la que emergió antes de volver a una celda de cría.

Varroa destructor presenta adaptaciones al parasitismo que le permiten un desarrollo poblacional eficaz dentro de las colonias. Selecciona hospedadores de acuerdo con la edad y/o la función de las abejas (Calderone *et al.*, 2002; Pernal *et al.*, 2005), parasitando preferentemente abejas nodrizas (mediana edad) porque las acercan a las crías y pecoreadoras (deriva, pillaje), porque les permiten infestar nuevas colonias (Bruno, 2003) o porque pueden propagarse durante la enjambrazón. Varroa presenta tasas de infestación entre 8 y 12 veces mayor en celdas de zánganos comparadas con las celdas de obreras, principalmente porque la diferencia en el tiempo y duración del periodo de

operculado le permite aumentar su eficacia reproductiva (Calderone & Kuenen, 2003).

Cuando la prevalencia parasitaria es alta dentro de las celdas de cría, las abejas emergentes presentan distintos tipos de malformaciones en las alas, patas y abdomen (Marcangeli *et al.*, 1992) con un promedio de vida más corto en el estadio adulto (Amdam *et al.*, 2004). No obstante, el daño producido en las abejas individuales no es indicativo del perjuicio que ocasiona a nivel de la colmena. Para la estimación del impacto real del parásito se debe considerar la organización social de las abejas, como un “Superorganismo” (Moritz & Fuchs, 1998). Este daño es considerado como indicador de la necesidad de un tratamiento terapéutico y depende de la estación del año y la presencia de virus asociados. El umbral de daño determinado es un parámetro de naturaleza económica y no biológica, y por lo tanto se aplica en las decisiones de manejo de colmenas con fines exclusivamente de producción y rentabilidad.

La transmisión de Varroa se puede dar entre distintas colonias a través de la deriva de individuos o entre una colonia y los enjambres que produce y/o dentro de una colonia entre los distintos individuos. Principalmente, la diseminación del ácaro depende de un grupo de factores relacionados al comportamiento de las abejas, como pecoreo, pillaje, enjambrazón, que a su vez están influenciados por factores genéticos y ambientales. Las prácticas de manejo de las colmenas constituyen un segundo grupo de factores que contribuyen a la transmisión horizontal de Varroa, permitiendo que se mantengan las formas más virulentas del parásito en comparación con áreas donde no se han implementado prácticas de control (Fries & Camazine, 2001).

2. Taxonomía y sistemática

2.1. Taxonomía

Los ácaros Varroa se descubrieron por primera vez hace más de 100 años en la abeja asiática *Apis cerana* en Java, Indonesia, y la especie se denominó *V. jacobsoni* (Oudemans, 1904). Fueron asignados a un nuevo género, *Varroa*, y eventualmente a una nueva familia, Varroidae (Delfinado-Baker & Baker, 1974). En la actualidad el género contiene cuatro especies. Desde el descubrimiento inicial, ha quedado claro que los ácaros Varroa son parásitos nativos de la cría de un grupo de abejas melíferas asiáticas que anidan en cavidades y que se encuentran estrechamente relacionadas con *A. cerana*. Estos incluyen, *A. cerana* (que se distribuye en la mayor parte de Asia), *A. koschevnikovi* (Borneo y las regiones circundantes), *A. nigrocincta* (Sulawesi) y *A. nuluensis* (Borneo). En la actualidad, se conoce que los ácaros de Varroa infestan a *A. cerana*, *A. koschevnikovi* y *A. nigrocincta*, y se ha informado escasamente la presencia de ácaros en *A. nuluensis* o *A. indica*. Sin embargo, esos ácaros que fueron encontrados en *A. nigrocincta* en Sulawesi probablemente no eran nativos para esa abeja, sino que su identificación se debió a la simpatría de esas abejas con *A. ceranae* (Anderson & Trueman, 2000).

No existe un registro certero de cuándo la abeja europea *A. mellifera* entró en contacto con Varroa por primera vez, pero ciertamente ocurrió después de que el hombre introdujera esa abeja en Asia (De Jong *et al.*, 1982a). Existen especímenes de Varroa en la Colección Acarologica de Oregon State University, EE. UU., que se recolectaron de *A. mellifera* en China a mediados del siglo pasado (Akratanakul & Burgett, 1975). Los ácaros Varroa que desde entonces han utilizado a *A. mellifera* como hospedero son miembros de *V. destructor*, la especie descrita más recientemente del género, y son nativos de *A. cerana* en el noreste de Asia (Anderson & Trueman, 2000). Por lo tanto, las cuatro especies actuales reconocidas de Varroa se produjeron a través de un largo proceso de especiación en los hospedadores de abejas melíferas asiáticas y, dado el estado taxonómico bastante incierto de esas abejas, es posible que nuevas especies de Varroa esperen por ser descubiertas. La co-evolución prolongada de *V. destructor* y *A. mellifera* hace que estos ácaros también se vuelvan genéticamente diversos (Oldroyd, 1999). Esto se da particularmente a medida que se adaptan gradualmente para vivir en poblaciones aisladas de *A. mellifera*. Sin embargo, el movimiento de las poblaciones de abejas en todo el mundo por el hombre y la práctica de manejar numerosas colonias de *A. mellifera* con reinas emparentadas genéticamente contrarresta, en cierta medida, los procesos evolutivos naturales que pueden conducir a la especiación de Varroa en *A. mellifera*.

Se han utilizado varios métodos a lo largo de los años para determinar la variación dentro de Varroa, todos los cuales han contribuido al nivel actual de comprensión taxonómica. Los métodos más comunes y simples para identificar especies han sido aquellos que proporcionan mediciones de las características físicas de los ácaros (morfología). Los descubrimientos iniciales de *V. jacobsoni* en *A. cerana*, *V. underwoodi* en *A. cerana* y *V. rindereri* en *A. koschevnikovi* resultaron de estudios morfológicos. Más recientemente, los métodos moleculares han ayudado a aclarar la taxonomía de Varroa y han demostrado ser particularmente útiles para identificar la variación genética dentro de las especies e incluso identificar especies crípticas. Estos métodos, que también se describen a continuación, jugaron un papel crucial en el descubrimiento de una nueva especie, *V. destructor*, y en demostrar que era esa especie, y no *V. jacobsoni* como se pensaba anteriormente, la que había colonizado *A. mellifera* después de su introducción en Asia (Anderson & Trueman, 2000).

La taxonomía actual de Varroa en las abejas melíferas asiáticas se puede resumir de la siguiente manera (Lindquist *et al.*, 2009):

Reino Animal
Filo: Artrópodos
Clase: Arachnida
Subclase: Acari
Superorden: Parasitiformes
Orden: Mesostigmata
Familia: Varroidae
Género: Varroa
Especies:
V. jacobsoni (Oudemans, 1904)
V. underwoodi (Delfinado Baker & Aggarwal, 1987)
V. rindereri (De Guzman & Delfinado Baker, 1996)
V. destructor (Anderson & Trueman, 2000).

El estado taxonómico de tres tipos de Varroa genéticamente distintos que infestan a *A. cerana* en Filipinas sigue sin resolverse en la actualidad (Anderson, 2000; Anderson & Trueman, 2000).

Ácaros de sólo dos "haplogrupos" de *V. destructor* (consultar sección 2.4.2."Haplogrupos e identificación de haplotipos") han colonizado *A. mellifera* a

nivel mundial. De los dos, los que pertenecen a un haplogrupo de Corea son los más comunes y extendidos en *A. mellifera*, estando presentes en Europa, Oriente Medio, África, Asia, América y Nueva Zelanda. Los ácaros de un haplogrupo de Japón son menos comunes en *A. mellifera*, y sólo se encuentran en Tailandia, Japón y algunas regiones de las Américas (Anderson & Trueman, 2000; Warrit *et al.*, 2006).

2.2. Colecta de ácaros para su identificación

Las mejores muestras de Varroa para análisis de laboratorio son aquellas que han sido recolectadas vivas y preservadas de inmediato. Un beneficio de tomar muestras de ácaros vivos es que pueden sumergirse en agua caliente antes de su conservación. Esto relaja los tejidos internos del cuerpo y expone los órganos difíciles de ver, como los quelíceros, que generalmente permanecen ocultos en los ácaros recolectados directamente en alcohol.

2.2.1. Apariencia de los ácaros

Las hembras adultas son grandes (alrededor de 1,5 mm de ancho) y de color marrón rojizo, mientras que los estadios de ninfas masculinas y femeninas son más pequeñas y de color nacarado o blanco. Todos los estadios se ven fácilmente a simple vista (Fig. 1). Individuos de los distintos estadios pueden retirarse cuidadosamente de las celdas con la ayuda de unas pinzas finas o pincel suave y sumergirse inmediatamente en líquido conservante. En caso de utilizar alcohol para su conservación, los ácaros morirán inmediatamente y se hundirán en el fondo, mientras que si se conservan en RNA *later* flotarán en la superficie y se arrastrarán por el interior del recipiente antes de morir algún tiempo después.



Figura 1. Familia de ácaros con la madre (color marrón) y progenie de diferentes estadios. Debajo de éstos, estaba la pupa la cual fue removida. Foto: Denis Anderson.

2.2.2. Dónde encontrar ácaros

Los ácaros adultos vivos, las ninfas y los huevos se encuentran más fácilmente en las celdas de cría operculadas de las colonias de abejas, dado que allí se reproducen las hembras adultas de los ácaros. En las colonias de *A. cerana* esto está restringido a las celdas de zánganos, pero en las colonias de *A. mellifera* puede ser en celdas de zángano o de obrera. Después de retirar el opérculo de cera y la cría de abejas, la presencia de depósitos fecales blancos en las paredes de la celda es un indicador seguro de la presencia de hembras reproductoras (Fig. 2). La recolección de ácaros de las celdas de cría con descendencia también proporciona evidencia de que estos ácaros se reproducen en las especies de abejas de las que han sido recolectados, ya que los ácaros a veces se desplazan hacia y desde colonias de especies extrañas en las que no pueden reproducirse (Anderson & Trueman, 2000; Koeniger *et al.*, 2002), lo que podría confundir la especificidad del hospedador que se les atribuye. Sólo se puede recolectar Varroa hembra adulta viva de colonias de abejas sin cría. Estas generalmente se encuentran en los cuerpos o en las cavidades corporales de las abejas obreras.



Figura 2. Sección de una celda (la parte inferior está a la derecha de la imagen), con las heces depositadas en la parte superior. También se pueden visualizar Varroas en estadios maduros e inmaduros. Foto: Swiss Bee Research Institute.

2.2.3. Técnicas de muestreo de *Varroa* spp.

Los ácaros pueden ser muestreados de celdas de cría o de abejas adultas. Las técnicas de muestreo se describen a continuación en la sección 3.1. 'Recolección de ácaros'.

2.2.4. Almacenamiento de muestras de ácaros

2.2.4.1. Medio y condiciones de almacenamiento

Los ácaros recolectados en el campo deben conservarse inmediatamente en alcohol etílico 70-95% o RNA *later*. Esto garantiza que las muestras no se dañen e, incluso si se mantienen así a temperatura ambiente, son buenas para los análisis morfológicos durante al menos unos meses, pero a menudo más tiempo. Sin embargo, si las muestras se van a utilizar en el análisis de ADN, deben almacenarse en un ambiente fresco, como una heladera a 4°C o un congelador a -20°C, unos días después de la recolección para disminuir la degradación del ADN de los tejidos. Las muestras congeladas a -20°C permanecen viables durante varios años, pero para permanecer viables por más tiempo, deben almacenarse a -70°C (consulte sección 2.1.4. "Storing dead adults" en Human *et al.*, 2013).

2.2.4.2. Contenedor de almacenamiento.

Los recipientes ideales para recolectar ácaros son pequeños y de plástico resistente, como el pequeño vial criogénico de plástico de 1,5 ml. Este vial puede contener cientos de muestras de ácaros y tiene un área grande de color blanco en su exterior para una etiqueta. Es importante destacar que su tapa está asegurada en un hilo que corre por el exterior del vial. Esto garantiza que no se expulse ningún líquido conservante del vial mientras se cierra, lo que podría provocar manchas o la eliminación completa de la etiqueta. La etiqueta debe contener información esencial, como la fecha de recolección, el nombre de la especie de la abeja, la ubicación y el nombre del recolector, utilizando un marcador permanente de punta fina. También se puede colocar un pequeño trozo de papel con los datos de recolección escritos con un lápiz (resistente al alcohol) dentro del vial, con la muestra.

2.2.5. Envío de las muestras

Las muestras deben transportarse a su destino lo antes posible después de la recolección. Algunas aerolíneas prohíben el transporte de especímenes biológicos conservados en alcohol en aviones, mientras que otros son menos estrictos. Vale la pena verificar la política de la aerolínea al respecto antes de intentar enviar o transportar muestras conservadas en alcohol. Una forma conveniente de evitar este problema es verter el alcohol de las muestras poco antes del transporte. De esta manera, las muestras permanecerán cubiertas con una cantidad muy pequeña de alcohol y, por lo tanto, permanecerán saturadas en alcohol y conservadas durante el transporte. Sin embargo, a su llegada, las muestras deben volver a cubrirse bien con alcohol fresco antes del almacenamiento. Algunos servicios de transporte tienen acuerdos con las aerolíneas para transportar especímenes biológicos conservados en alcohol en los aviones.

Algunos países (por ejemplo, Australia y EE. UU.) requieren un permiso oficial de importación de cuarentena para acompañar a los especímenes importados de ácaros Varroa. Otros países (por ejemplo, Brasil) pueden prohibir la exportación de muestras debido a leyes específicas sobre biopiratería. Por lo tanto, antes de enviar o transportar muestras a un país en particular, se debe verificar y seguir la política de ese país sobre la importación de muestras biológicas.

2.3. Métodos morfológicos para identificar *Varroa* spp.

Las cuatro especies reconocidas de Varroa se identifican morfológicamente de manera fácil y se muestran para comparación en la figura 3 .

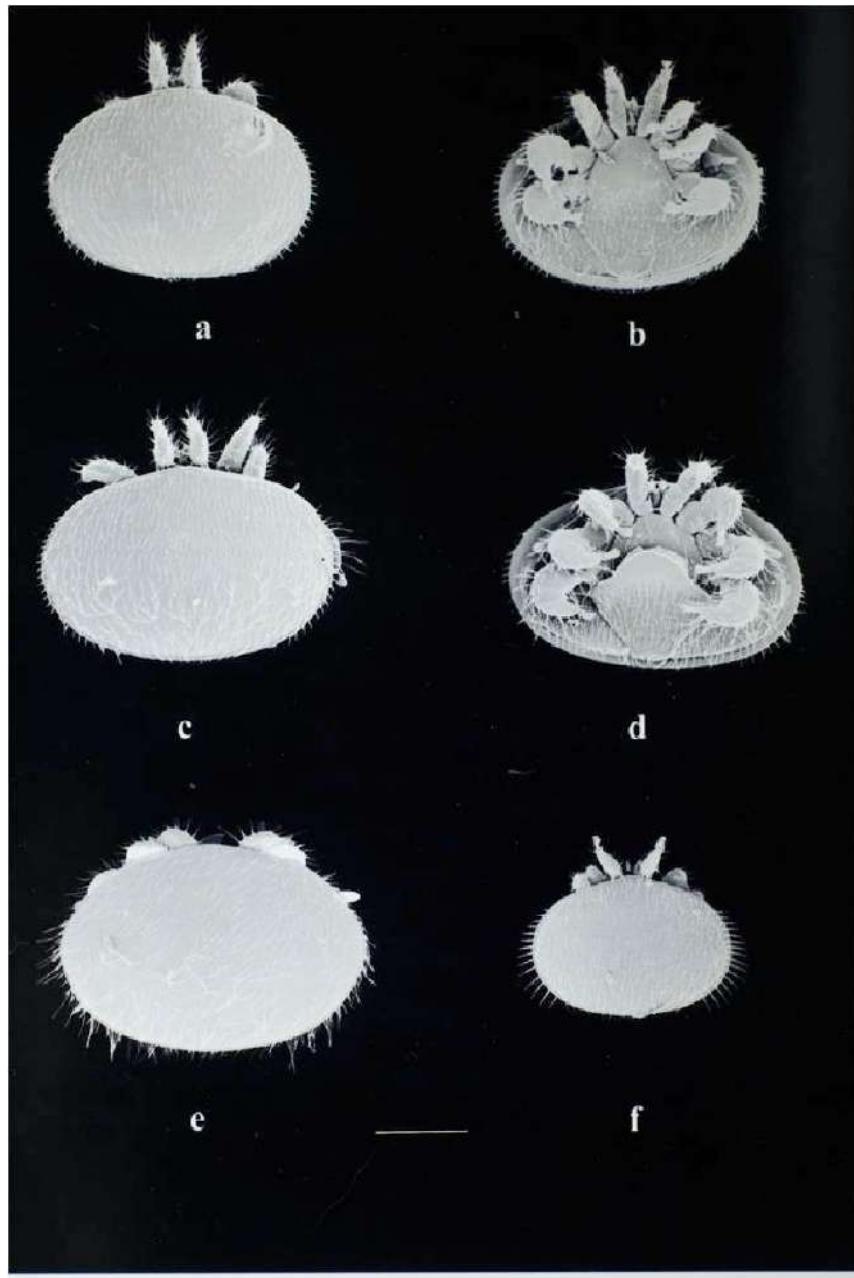


Figura 3. Cuatro especies de *Varroa* spp. **a)** vista dorsal de *V. jacobsoni*; **b)** vista ventral de *V. jacobsoni*; **c)** vista dorsal de *V. destructor*; **d)** vista ventral de *V. destructor*; **e)** *V. rindereri*; **f)** *V. underwoodi*. Foto: Denis Anderson.

2.3.1. Preparación de la muestra

Los análisis morfológicos se llevan a cabo de forma sencilla utilizando ácaros montados en un portaobjetos. Para esto, previamente se deben limpiar los tejidos blandos de cada espécimen.

Esto se consigue de la siguiente manera:

1. Retirar la muestra del medio de conservación.
2. Sumergir la muestra en la solución de Nesbitt (consulte la receta a continuación) en la depresión de un portaobjetos cóncavo.
3. Esperar hasta que la muestra se sature con la solución de Nesbitt y luego empújela debajo de la superficie de la solución para que se hunda hasta el fondo con una aguja fina.
4. Colocar un cubreobjetos sobre la depresión del portaobjeto.
5. Incubar el portaobjetos en un horno durante 1 hora a 45 °C. El espécimen debe quedar libre de tejido corporal y parecer transparente, pero los especímenes más antiguos pueden requerir mayor limpieza en el horno durante varias horas o durante la noche. Este procedimiento se puede acelerar calentando el portaobjetos sobre una llama o placa calefactora durante unos segundos, en lugar de colocarlo en un horno. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado para evitar hervir la solución de Nesbitt, que destruirá la muestra. Se deben usar guantes y bata de laboratorio al limpiar las muestras.

La muestra despejada se monta de la siguiente manera:

6. Retirar la muestra de la solución de Nesbitt y transferirla a una gota de medio de montaje de Hoyer (consulte la receta a continuación) en un portaobjetos de vidrio para microscopio.

Nota: la gota debe ser lo suficientemente grande como para formar una capa delgada cuando se coloca un cubreobjetos encima, sin desbordarse del cubreobjetos.

7. Empujar la muestra hacia abajo a través del Hoyer para que descansen sobre el portaobjetos, utilizando una aguja fina.
8. Bajar suavemente un cubreobjetos (espesor N° 1, diámetro 16 mm) sobre la gota de Hoyer, comenzando desde el borde de la gota y dejando que se asiente

lentamente sobre la gota bajo su propio peso, extendiendo el Hoyer a medida que avanza.

9. Colocar el portaobjetos horizontalmente para curar en un horno a 45 °C durante al menos 2 semanas.

10. Etiquetar y guardar el portaobjetos.

El medio de Hoyer no se endurece por completo y sigue siendo soluble en agua, por lo que el portaobjetos se puede recalentar y la muestra se puede sacar del portaobjetos para su disección o montaje. Para el almacenamiento a largo plazo o para el transporte, los bordes del cubreobjetos deben sellarse con algún material resistente al agua, como barniz de uñas transparente.

2.3.1.1. Receta para la solución de Nesbitt:

- 60 g de hidrato de cloral.
- 10 ml de ácido clorhídrico concentrado (35,4%).
- Todo disuelto en 100 ml de agua destilada.

Nota: se debe tener cuidado al preparar esta solución, ya que es altamente corrosivo para la piel y el microscopio.

2.3.1.2. Receta para el medio de Hoyer:

- 30 g de goma arábiga.
- 200 g de hidrato de cloral.
- 20 ml de glicerol.
- Todo disuelto en 50 ml de agua destilada.

Nota: la mezcla debe agitarse y calentarse suavemente para permitir que la goma arábiga se disuelva, luego se filtra a través de la muselina y se almacena en un recipiente hermético, pero no en un recipiente con tapón de rosca, ya que la tapa se quedará permanentemente atascada.

2.3.2. Identificación de la muestra

Las muestras de ácaros montados se examinan mejor con microscopios de luz de disección o compuestos, que han sido equipados con micrómetros oculares. Se deben considerar las siguientes medidas.

- Tamaño del cuerpo (largo y ancho).
- Estructura y separación (es decir, pelo rígido, cerdas) del escudo dorsal.
- Estructura y quetotaxia de los escudos esternal, epineal, anal y metapodal, peritrema, tritosterno e hipóstomo (consultar Fernández & Coineau, 2007 para una descripción de la morfología de la Varroa).
- Número, disposición y morfología de las setas en las patas y palpos.

Las dos especies, *V. destructor* y *V. jacobsoni*, son morfológicamente similares, excepto en tamaño y forma corporal. *Varroa jacobsoni* es mucho más pequeño y de forma más circular que *V. destructor* (Fig. 3). Sin embargo, algunos especímenes de *V. jacobsoni* (por ejemplo, los encontrados en *A. cerana* en Laos, Asia continental) son mucho más grandes que otros de *V. jacobsoni*. Por lo tanto, siempre es mejor confirmar un diagnóstico de cualquiera de estas especies con información molecular.

2.4. Métodos moleculares y sistemática.

La biología molecular se utilizó por primera vez en la investigación de Varroa durante la década de 1990 para buscar variaciones dentro y entre las poblaciones de ácaros (Kraus & Hunt, 1995; De Guzman *et al.*, 1997, 1998, 1999; Anderson & Fuchs, 1998). Inicialmente era costoso y solo era utilizado por laboratorios especializados. Actualmente, el panorama ha cambiado y se pueden comprar varios *kits* comerciales rápidos y fáciles para extraer ADN del tejido y existen distintos laboratorios que ofrecen servicio de secuenciación de ADN por una tarifa razonable a las pocas horas de su extracción. Los datos de secuencia de pequeños fragmentos de ADN (<1.000 pares de bases) han sido particularmente útiles para proporcionar variaciones genéticas "puntuales" en todo el genoma de Varroa y para su uso en análisis filogenéticos o como marcadores moleculares (Avise, 2004).

2.4.1 Extracción de ADN e identificación de *Varroa* spp.

El ADN se extrae del tejido de Varroa y se conserva en alcohol etílico al 70% o RNA later (como se describe en la sección 2.2.4. "Almacenamiento de muestras de ácaros"). Se puede usar cualquier tejido, pero si el tejido se disecciona de un solo apéndice (como una pata), el resto del ácaro se puede usar para otros fines. Se han descripto distintos métodos de extracción de ADN a partir de Varroa y muchos de estos son los utilizados para extracción de ADN a partir de abejas adultas (consulte sección 3.2.1. "DNA extraction using CTAB" en Evans *et al.*, 2013). Una vez extraído el ADN, es posible identificar de forma molecular mediante PCR un fragmento específico del ácaro. Para esto, se puede utilizar el protocolo y cebadores publicados por Anderson y Trueman (2000). Este protocolo permite la amplificación de un fragmento de 458 pares de bases de ADN del gen *cox1* del ADNmt de Varroa. Una vez obtenido dicho fragmento, se secuencia y esta secuencia es comparada con otras secuencias de la misma región depositadas en la base de datos GenBank. Si esta secuencia muestra un 2% o menos de diferencia de la de la base de datos, se considera miembro de esta especie en particular. Los fragmentos de cada una de las 4 especies reconocidas difieren entre sí en aproximadamente un 6% (Anderson & Trueman, 2000). Se han obtenido secuencias del fragmento del gen COX1 de todas las Varroas que han sido identificadas hasta la fecha por métodos moleculares. Por lo tanto, las secuencias de este fragmento deben incorporarse en todos los nuevos estudios moleculares sobre los ácaros Varroa, ya que ubica este nuevo trabajo en contexto con lo que se ha hecho anteriormente.

2.4.2 Haplogrupos e identificación de haplotipos

El gen *cox1* también es útil para identificar los ácaros de grandes poblaciones dentro de una especie (como las poblaciones de islas) (Anderson & Trueman, 2000). Como las poblaciones más pequeñas dentro de estas poblaciones más grandes pueden identificarse mediante datos de secuencia concatenados (unidos) obtenidos de los genes *cox3*, *atp6* y *cytb* ADNmt, las poblaciones más grandes se han denominado 'haplogrupos' y las poblaciones más pequeñas dentro de ellos 'haplotipos' (Navajas *et al.*, 2010). Las secuencias de cebadores para amplificar todos estos fragmentos, junto con el tamaño de los fragmentos amplificados, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores (y sus nombres) utilizados para la investigación en Varroa para amplificar fragmentos de tamaño particular (pares de bases) de genes del ADNmt. Tomado de Anderson y Fuchs (1998); Navajas *et al.* (2010).

Gen mtDNA	Tamaño del fragmento (pb)	Secuencia del cebador	Nombre del cebador
Cox1	458	GG(A/G) GG(A/T) GA(C/T) CC(A/T) AAT (C/T)T(A/T) TAT CAAC	COXF
		CCT GT(A/T) A(A/T)A ATA GCA AAT AC	COXRa
Cox1	929	CTT GTA ATC ATA AGG ATA TTG GAAC	10KbCOIF1
		AAT ACC AGT GGG AAC CGC	6,5KbCOIR
Atp6-cox3	818	GAC ATA TAT CAG TAA CAA TGAG	16KbATP6F
		GAC TCC AAG TAA TAG TAA AAC	16KbCOIIIR
Cytb	985	GCA GCT TTA GTG GAT TTA CCT AC	10KbCytbF-1
		CTA CAG GAC ACG ATC CCA AG	10KbCytbPRIM

El marcador *cox1* también ha sido útil en estudios filogenéticos. En la Fig. 4 se muestra un árbol filogenético de todos los haplogrupos con especies actualmente conocidos y publicados (consulte la sección 7 “*Phylogenetic analysis of sequence data*”, en Evans *et al.*, 2013).

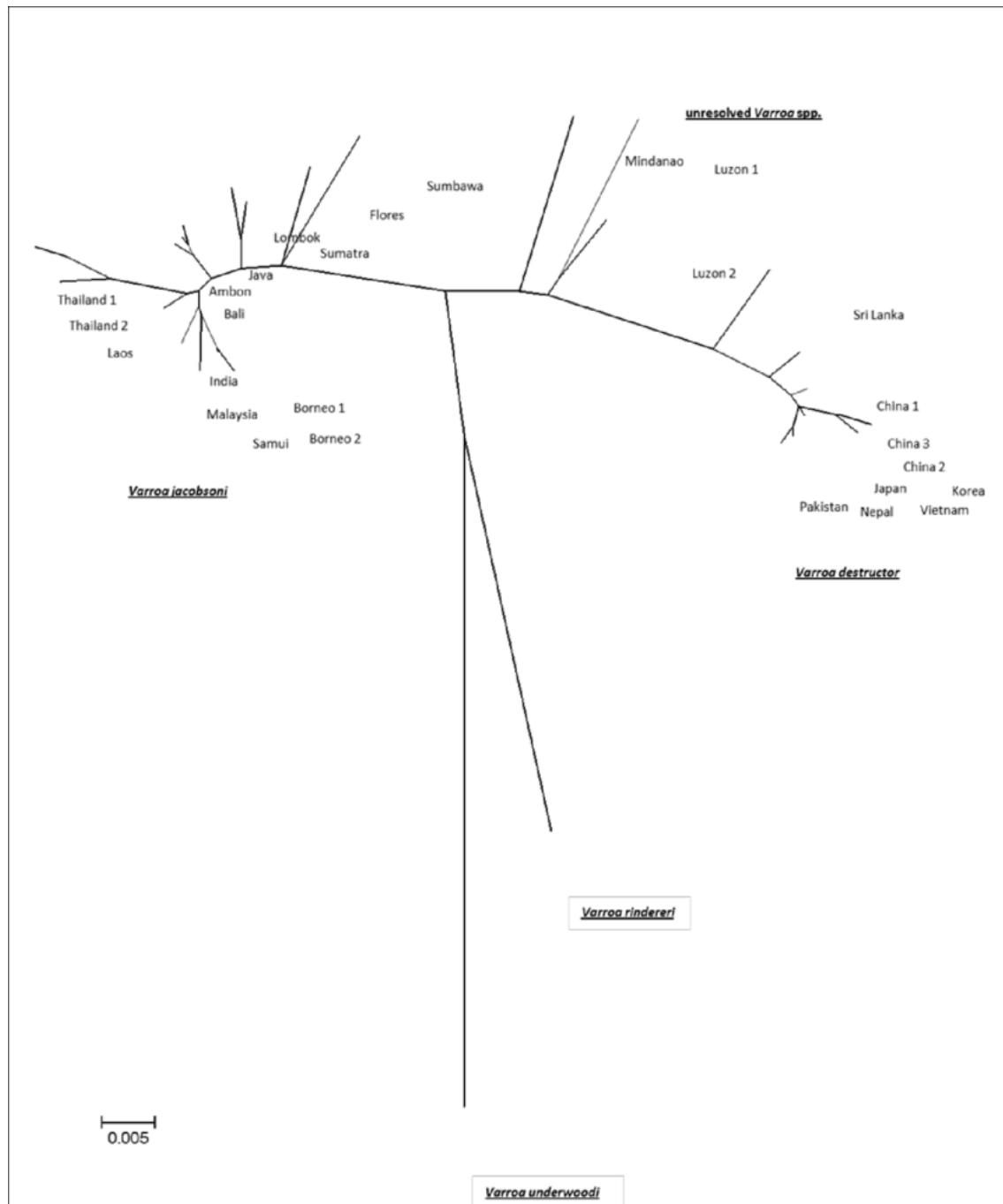


Figura 4. Árbol filogenético de todos los haplogrupos conocidos y publicados hasta el momento.

2.4.3. Determinación de parentesco con microsatélites

Los microsatélites son marcadores útiles para medir las relaciones de parentesco o paternidad dentro de las poblaciones de Varroa. Estos consisten en la secuencia repetitiva de ADN (como GAGAGA) en un solo *locus* (consulte sección 6.3.1. "Microsatellites" en Evans *et al.*, 2013). Los *loci* con repeticiones largas tienen más alelos que los *loci* con repeticiones cortas y, por lo tanto, a menudo permiten identificar un progenitor de un alelo particular. Los *loci* de microsatélites en Varroa han sido publicados por Evans (2000) y Solignac y colaboradores (2005).

2.5. Perspectivas sobre la taxonomía de *Varroa* spp.

Se necesita más investigación para aclarar la taxonomía de los ácaros Varroa de *A. cerana* en Filipinas. Esto requerirá exámenes de las secuencias de ADN nuclear obtenidas de estos ácaros, ya que sus secuencias de ADNmt no proporcionan la resolución necesaria para determinar su identidad (Fig. 4).

De la investigación publicada, hay tres tipos distintos de ácaros en Filipinas, dos de la isla norteña de Luzón y otro de la isla meridional de Mindanao (Anderson & Trueman, 2000). Éstas bien podrían ser especies distintas. También se pueden encontrar nuevas especies de Varroa en otras abejas melíferas asiáticas, particularmente en *A. nigrocincta* en Sulawesi, *A. nuluensis* en Borneo y *A. indica* del sur de la India.

Una característica interesante de los ácaros Varroa en las abejas melíferas de Asia es que la mayoría de ellas carecen de la capacidad de reproducirse en *A. mellifera*. Sin embargo, esto no es por falta de intentos, ya que cuando las colonias de *A. mellifera* se introducen en diferentes regiones de Asia, los ácaros hembras que son propios de la abeja melífera asiática local, invaden fácilmente las colonias introducidas y entran en las celdas de cría que están a punto de ser operculadas, en preparación para la reproducción. Sin embargo, no ponen huevos ni producen descendencia. Desde al menos mediados del siglo pasado, solo unos pocos tipos de ácaros han podido reproducirse en *A. mellifera*, siendo *V. destructor* el más exitoso. Esto sugiere que los ácaros Varroa hembras deben reconocer señales específicas en la abeja hospedera para reproducirse con éxito. Aunque estas señales pueden ser fundamentalmente las mismas entre los diferentes tipos y especies de abejas melíferas, pueden variar entre las poblaciones de abejas. La identificación de estas señales y los genes que las controlan podría conducir a que los genes sean el objetivo para fines particulares, como el control. Este tipo de investigación requerirá una buena comprensión de los genomas del parásito y del hospedero. A pesar de que nuestra comprensión

del genoma de la abeja melífera ha mejorado en los últimos años, los estudios recientes han comenzado a secuenciar el genoma de la Varroa (Cornman *et al.*, 2010). A medida que mejore nuestra comprensión del genoma de este ácaro, también lo hará nuestra comprensión de la taxonomía de Varroa y las formas en que se puede controlar el ácaro en las abejas melíferas europeas.

3. Técnicas de laboratorio

3.1. Recolección de ácaros

Hay diferentes formas de recolectar ácaros de *V. destructor* para utilizar en los experimentos. Algunos de los métodos descriptos a continuación proveen ácaros de edad desconocida y que se han reproducido un número desconocido de veces. Otros métodos proveen ácaros en donde la oogénesis ha comenzado. El método elegido dependerá en cada caso del estado fisiológico de los ácaros que requiera cada experimento en función de sus objetivos (consulte sección 3.6 Bioensayos).

3.1.1. Recolección manual

Los ácaros foréticos pueden ser colectados a mano con un pincel de cerdas finas o un pequeño aspirador de boca.

1. Recolectar las abejas de una colonia. La recolección manual es más fácil cuando la colonia está muy infestada, pero para recolectar ácaros "sanos" se recomienda que la colonia hospedadora no presente síntomas de infestación extrema.
2. Capturar las abejas una por una y examinarlas en busca de ácaros. Los ácaros pueden moverse libremente sobre el cuerpo de la abeja o estar escondidos entre dos esternitos. Encontrarlos y recolectarlos a veces requiere tomar a la abeja por el tórax y aguijón con pinzas para estirar el abdomen, haciendo que los ácaros sean visibles y accesibles.
3. Las abejas melíferas pueden tratarse con CO₂ o enfriarse para facilitar la recolección física. El CO₂ afecta la fisiología de las abejas (Czekońska, 2009), pero los resultados recientes indican que un tratamiento corto con CO₂ no afecta la fertilidad y la fecundidad de las hembras de Varroa introducidas artificialmente en celdas de cría (Rosenkranz *et al.*, datos no publicados). El efecto del enfriamiento no se ha estudiado aún y se considera que pueda tener algún impacto en la supervivencia de los ácaros. Una alternativa al tratamiento con CO₂ y enfriamiento es: (i) dejar que las abejas salgan de su contenedor una por una para que puedan ser atrapadas fácilmente o (ii) cortar la cabeza de las abejas ya que los ácaros tienden a dejar las abejas muertas en poco tiempo.
4. Colocar los ácaros colectados en un recipiente hermético con una fuente de humedad (un tapón de algodón húmedo) para evitar que los ácaros se sequen.

Ventajas: permite la recolección de ácaros que no han sido sometidos a un tratamiento con agua o azúcar impalpable y que entonces pueden estar estresados. Esto es una ventaja si los ácaros se usan en experimentos de larga duración.

Desventaja: tedioso, pocos ácaros pueden ser colectados.

3.1.2 Azúcar impalpable

El azúcar impalpable puede ser utilizada para separar los ácaros de su hospedador recolectado en un frasco (Macedo *et al.*, 2002) o cuando aún se encuentra en la colonia.

Material necesario: frasco de boca ancha con una tapa cuya parte central es reemplazada por una malla o tela de 2 mm de ancho. (Fig. 5a).

1. Colocar 300 abejas en el frasco y cerrar la tapa
2. Volcar en el frasco una cucharada grande (al menos 7 gramos) de azúcar impalpable a través de la malla (Fig. 5a).
3. Batir suavemente el frasco para cubrir todas las abejas con el azúcar (Fig. 5b).
4. Dejar actuar por 1 minuto.
5. Colocar el frasco boca abajo sobre una superficie blanca (Fig. 5c).
6. Batir 1 min.
7. Colocar los ácaros caídos y el azúcar (Fig. 5d) en un tamiz y enjuagar con solución salina tamponada con fosfato 1X (u otra solución salina similar) para eliminar las partículas de azúcar (Fig. 5e).
8. Colocar los ácaros en papel absorbente para que se sequen (Fig. 5f).
9. Colocar los ácaros recolectados en un recipiente hermético para evitar que escapen.
10. Colocar una fuente de humedad en el recipiente para evitar que los ácaros se sequen hasta que sean utilizados en los experimentos.

Este método también puede ser aplicado usando la colmena entera con un piso modificado con malla metálica colocada en la base:

1. Retirar cada cuadro/marco que contenga abejas adultas.

2. Espolvorear con azúcar impalpable de modo que los marcos queden bien cubiertos.
3. Colocar nuevamente en la colmena.
4. Retirar el exceso de azúcar impalpable con los ácaros del piso a intervalos de 10-20 minutos.
5. Colocar los ácaros caídos y el azúcar (Fig. 5d) en un tamiz y enjuagar con solución salina tamponada con fosfato 1X (u otra solución salina similar) para eliminar las partículas de azúcar (Fig. 5e).
6. Colocar los ácaros en papel absorbente para que se sequen (Fig. 5f).
7. Colocar los ácaros recolectados en un recipiente hermético para evitar que escapen.
8. Colocar una fuente de humedad en el recipiente para evitar que los ácaros se sequen hasta que sean utilizados en los experimentos.

Ventajas: es rápido y permite recolectar varios cientos de ácaros en poco tiempo. El tratamiento es amigable con las abejas ya que pocas mueren durante el proceso. Las obreras recogidas en los frascos pueden volver a sus colonias, donde otras abejas las limpiarán.

Desventajas: disminuye la vida útil de los ácaros (Macedo *et al.*, 2002). Esto podría representar un problema para ensayos prolongados (> 3 días).

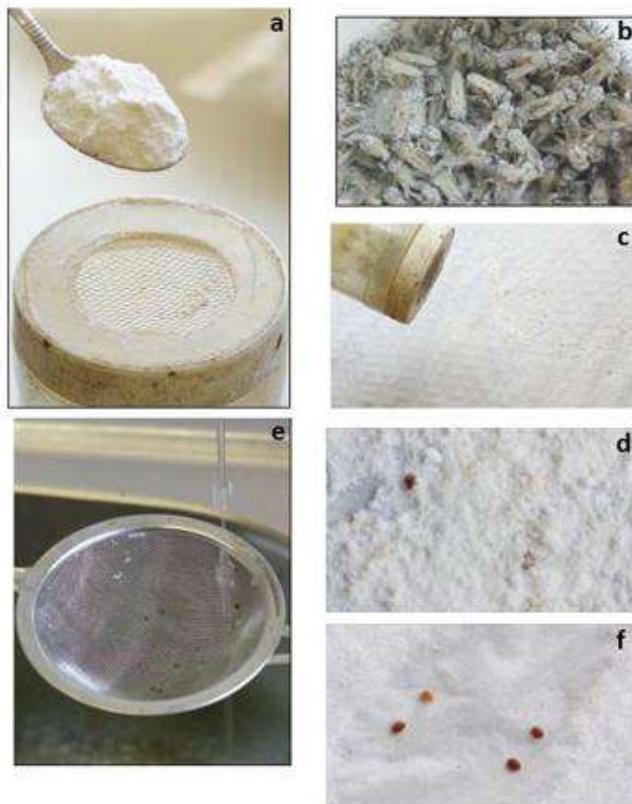


Figura 5. Recolección ácaros con azúcar impalpable. **a.** Colocar un cucharada grande y cargada de azúcar en un frasco con 300 abejas y cuya tapa tiene una rejilla que impide el paso de las abejas. **b.** Rodar el frasco para que todas las abejas queden cubiertas con azúcar. **c.** Colocar el frasco boca abajo y agitar para permitir que los ácaros se desprendan de las abejas. **d.** Ácaros cayendo junto con el azúcar sobre una hoja de papel blanco. **e.** Enjuagar los ácaros con solución salina utilizando un colador para eliminar el azúcar. **f.** Colocar los ácaros en un papel absorbente para acelerar el proceso de secado. Foto: V. Dietemann.

3.1.3. Lavado con agua

1. Recolectar las abejas de una colonia en un recipiente hermético.
2. Llenar el recipiente con solución salina tamponada con fosfato 1X (u otra solución salina similar) para evitar que las abejas salgan volando y agitar el frasco.
3. Verter el contenido del recipiente sobre un primer tamiz (apertura: 2000 μm) para recolectar todas las abejas.

4. Colocar un segundo tamiz (abertura <0.5 mm) debajo para recoger los ácaros.
5. Colocar los ácaros en papel absorbente inmediatamente después de lavarlos para ayudar a que se sequen.
6. Colocar los ácaros recolectados en un recipiente hermético para evitar que escapan.
7. Colocar una fuente de humedad en el recipiente para evitar que los ácaros se sequen hasta que sean utilizados en los experimentos.

Ventajas: es rápido y permite recoger varios cientos de ácaros en poco tiempo.

Desventajas: disminuye la vida útil de los ácaros. Esto podría representar un problema para ensayos prolongados (> 3 días). El tratamiento no es apto para las abejas, ya que muchas de ellas pueden morir durante el proceso.

3.1.4. Recolección de ácaros de la cría

3.1.4.1. Recolección de ácaros de larvas en estadio L5

Ácaros en estado fisiológico similar pueden ser recolectados de celdas de cría recientemente operculadas (Chiesa *et al.*, 1989)

1. Retirar un cuadro de cría con larvas L5 listo para ser operculado en la tarde del día anterior al experimento.
2. Marcar las celdas operculadas con un marcador apropiado (por ejemplo, líquido corrector, marcador de reinas, rotulador).
3. Colocar nuevamente el cuadro en su colonia de origen. Las abejas continuarán operculando celdas maduras.
4. A la mañana siguiente, trasladar el cuadro al laboratorio y desopercular las celdas sin marcar que se han operculado durante la noche.
5. Colocar el cuadro en una incubadora a 34,5 ° C, 60-70% HR.
6. Las larvas infestadas y no infestadas privadas del operculado emergen espontáneamente de celdas de cría en poco tiempo.
7. Recoger los ácaros que han caído de sus celdas de cría junto con las larvas hospedadoras.
8. Colocar los ácaros recogidos en un recipiente hermético para evitar que se escapan.

9. Colocar una fuente de humedad en el recipiente para evitar que los ácaros se sequen.

Ventajas: fácil de recolectar, todos los ácaros están en el mismo estado fisiológico.

Desventajas: no se conoce la edad del ácaro ni cuantos ciclos reproductivos ya ha realizado.

3.1.4.2. Recolección de ácaros de celdas operculadas

3.1.4.2.1. Abrir cada celda de cría

Los ácaros provenientes de celdas de cría pueden ser colectados a mano con un pincel de cerdas finas o un pequeño aspirador de boca, luego de abrir las celdas y remover las pupas. Para obtener ácaros en un momento particular del ciclo reproductivo, la recolección puede realizarse en celdas con cría de edad conocida (consulte sección 2.5. “*Obtaining brood and adults of known age*” en Human *et al.*, 2013). Para ello, la reina debe ser enjaulada en un cuadro vacío en la fecha necesaria.

1. Destapar la celda con pinzas finas o bisturí.
2. Empujar las paredes de la celda para liberar la larva o pupa en desarrollo.
3. Con pinzas suaves, extraer la larva o la pupa de la celda.
4. Observar con cuidado la larva o pupa y las paredes de la celda en busca de ácaros.
5. Colocar los ácaros colectados en un recipiente hermético.
6. Colocar una fuente de humedad en el recipiente para evitar que los ácaros se sequen.

Ventajas: es el método de colección de ácaros menos dañino para el ácaro.

Desventajas: es el método que requiere más tiempo para llevarse a cabo.

3.1.4.2.2. Abrir una gran cantidad de celdas y lavar la cría

Un método más rápido para recolectar ácaros vivos de celdas de cría en mayores cantidades es desopercular grandes cantidades de celdas de un cuadro y forzar la salida de los ácaros sacudiendo los marcos o lavando la cría. Para ello:

1. Desopercular un gran número de celdas de cría.

2. Remover la cría de abejas.

Ambos pasos pueden realizarse al mismo tiempo usando un tenedor de desoperculado utilizado comúnmente en la extracción de miel.

3. Dar vuelta al cuadro sobre una hoja de papel blanco.

4. Tocar en la superficie superior para desligar los ácaros de las celdas.

5. Recoger los ácaros separados que quedarán en el papel blanco.

Un método alternativo para incrementar el número de ácaros muestreados es:

1. Desopercular las celdas de cría.

2. Enjuagar el cuadro con agua tibia que separará la cría y los ácaros.

3. Recoger la cría y los ácaros en un primer tamiz (malla de 5 mm) que retendrá a las abejas.

4. Colocar un segundo tamiz (malla de 0,5 mm) debajo del primero para retener los ácaros.

5. Enjuagar con más agua.

6. Secar los ácaros colocándolos en papel absorbente (Fig. 5f).

Ventajas: permite recolectar grandes cantidades de ácaros (dependiendo de la tasa de infestación de la colonia).

Desventajas: ácaros de edad desconocida, posiblemente acorta la expectativa de vida de los acaros luego del lavado; una gran cantidad de ácaros quedan en el cuadro con el método del “golpe”.

3.2. Cría de ácaros en el laboratorio

Es relativamente fácil mantener ácaros de Varroa durante la fase forética en el laboratorio. Su mantenimiento en jaulas dentro de una incubadora es necesario para evaluar acaricidas o mientras se marcan antes de ser transferidos a las colmenas, por ejemplo. Por el contrario, hay pocos métodos disponibles para criar ácaros de Varroa en el laboratorio. Las condiciones que prevalecen en su ambiente de reproducción, es decir, en las celdas en las que se desarrollan las abejas melíferas, son tan particulares que es muy difícil replicarlas artificialmente. Por lo tanto, obtener un ciclo de vida completo en el laboratorio sigue siendo un desafío que pocos superaron (Donzé & Guérin, 1994; Nazzi & Milani, 1994). Esta sección describe métodos para mantener o criar Varroa en el laboratorio. Los mismos, aún no permiten la cría de ácaros en grandes cantidades como sería deseado para desarrollar experimentos, pero permiten observar el comportamiento de los ácaros y probar productos que puedan afectar el ciclo de vida de los ácaros.

3.2.1. Mantenimiento de ácaros en el laboratorio

3.2.1.1. Mantener ácaros en abejas adultas

Los ácaros pueden mantenerse sobre las abejas en jaulas de mantenimiento a una temperatura de aproximadamente 33°C y 60-70% de HR que se adapta también a los ácaros (consulte sección 5 “Cages in which to maintain adult workers in the laboratory” en Williams *et al.*, 2013). La mortalidad puede ser alta en caso de que se utilicen ácaros foréticos. Su edad es desconocida al momento de la recolección y por lo tanto hay una gran variabilidad en su expectativa de vida. Sin embargo, los ácaros vivirán comúnmente por una semana o más en las jaulas de abejas establecidas como se mencionó anteriormente. Se recomienda usar jaulas herméticas para los ácaros o mantener cada jaula en un contenedor diferente para evitar que los ácaros que puedan escapar de una de las jaulas entren en otra de un grupo de tratamiento diferente. Este procedimiento puede utilizarse en ensayos *in vitro* para evaluar toxicidad de un acaricida, en ensayos en los que el investigador intenta trazar el movimiento de un compuesto (como ARNdh) desde un alimento para abejas (agua azucarada, tortas de polen, etc.), a través de las abejas, y hacia los ácaros, o en otros ensayos similares. Un método común para establecer estudios *in vitro* con abejas adultas infestadas con Varroa consiste en seleccionar individualmente de los cuadros en las colonias, abejas obreras que transporten ácaros y colocarlas en jaulas. Este método es relativamente lento y puede ser particularmente difícil para los investigadores con experiencia limitada en manejo de abejas. Un método

alternativo incluye la recolección separada de abejas y ácaros, seguida de la infestación de las abejas con los ácaros recolectados. Los ácaros se pueden transferir a las abejas enjauladas utilizando un pincel, o si los ácaros se recolectaron en un recipiente, se pueden introducir en una jaula con abejas. Los ácaros se dispersan fácilmente a través de las abejas en minutos. Un beneficio principal de este último método es que es factible que un único investigador y sin demasiada experiencia lo pueda realizar rápidamente. Además, este método evita la necesidad de mantener colonias con altas poblaciones de Varroa (que son preferidas cuando se seleccionan abejas infectadas individualmente).

Recolección de abejas y ácaros:

1. Recolectar abejas adultas de los cuadros de la colonia y colocar en jaulas (consulte sección 5 “*Cages in which to maintain adult workers in the laboratory*” en Williams *et al.*, 2013). El número de abejas colocadas en cada jaula puede variar de acuerdo con los requerimientos de cada experimento.
2. Recolectar los ácaros utilizando los métodos descriptos en la sección 3.1. Recolección de ácaros.

Infestación *in vitro* de abejas con ácaros de Varroa:

3. Agregar 5-10 ácaros a una caja de Petri pequeña (5 cm) conteniendo un círculo de papel de filtro humedecido con 1:1 jarabe de azúcar (por volumen) o agua.
4. Colocar la caja de Petri con ácaros en el fondo de la jaula que contiene las abejas obreras.
5. Golpear ligeramente la jaula para hacer que las abejas caigan desde la parte superior de la jaula hasta el fondo y entren en contacto con los ácaros. Este procedimiento de infestación artificial se basa en el comportamiento de búsqueda de los ácaros, que se adhieren fácilmente a las abejas que los contactan. El jarabe de azúcar impregnado en el papel de filtro mantendrá a las abejas durante más tiempo en el fondo de la jaula para darles más tiempo a los ácaros para encontrar un hospedador.
6. Retirar la caja de Petri después de que todos los ácaros se hayan adherido a las abejas.
7. Repetir los pasos 5-6 hasta que se haya agregado el número deseado de ácaros a la jaula. Otra opción es incorporar los ácaros en forma parcial, en lugar de tratar de agregarlos todos juntos a la jaula, dando como resultado una distribución más uniforme de los ácaros en las abejas. Tenga en cuenta que

algunas abejas inevitablemente llevarán múltiples ácaros y algunas abejas no tendrán ácaros.

Se deberán agregar más ácaros a cada jaula que los necesarios para el experimento. Por ejemplo, agregue 30 ácaros a una jaula cuando el experimento requiera la recuperación de 25 ácaros más adelante en el estudio. Esto es necesario porque algunos ácaros no se adhieren a ninguna abeja. En cualquier caso, el número de ácaros de Varroa por jaula o por abeja puede variar según los criterios experimentales predeterminados.

8. Agregar un alimentador de jarabe de azúcar y suministro de agua a la jaula después de que los ácaros hayan sido agregados en las jaulas (consulte sección 5 “*Cages in which to maintain adult workers in the laboratory*” en Williams *et al.*, 2013). Las abejas deben mantenerse hidratadas y alimentadas para garantizar la supervivencia de los ácaros. Mantener los ácaros en las abejas adultas funciona mejor en jaulas de mantenimiento en comparación con tubos tipo Eppendorf.

3.2.1.2. Mantener ácaros en cría de abejas

Los ácaros adultos se pueden mantener durante muchos días en larvas o pupas de abejas en el laboratorio, en condiciones térmicas e higrométricas estandarizadas necesarias para la cría (34,5 ° C y 60-70% HR). La cría debe ser reemplazada regularmente por individuos más jóvenes antes de que alcancen la etapa adulta (Beetsma & Zonneveld, 1992). Para ello se pueden utilizar pequeñas cajas de Petri con algunas abejas inmaduras. Para mejorar la alimentación y la supervivencia de los ácaros, es deseable un contacto cercano entre los ácaros y la cría. Algunos autores confinan los ácaros individualmente en una larva o pupa en recipientes más pequeños (tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml). Para aumentar la humedad en el tubo, se coloca una pieza húmeda de algodón en el fondo. El exceso de agua que se acumula en la parte superior del algodón debe eliminarse agitando el tubo para evitar que los ácaros se adhieran a las gotas. Perforar la tapa con 1-2 agujeros (diámetro <1 mm) mejorará la ventilación y la respiración. Se pueden guardar hasta 8 ácaros en un tubo. Los ácaros se pueden transferir al tubo con un pincel. Una vez que se transfieren todos los ácaros, la pupa / larva se colocará en el tubo.

Ventajas: fácil para mantener ácaros vivos

Desventajas: no permite la oviposición de los ácaros

3.2.1.3. Dieta Artificial

Para facilitar el mantenimiento y la cría de ácaros en el laboratorio, se hicieron intentos para desarrollar métodos de cría basados en dietas artificiales que los ácaros pudieran succionar a través de una membrana sintética (Bruce *et al.*, 1988; Bruce *et al.*, 1991). Desafortunadamente, a pesar de que tanto la membrana como la dieta parecen adecuadas para este propósito, no se logró una supervivencia y/o reproducción satisfactoria.

3.2.2. Cría de ácaros en el laboratorio

Con el fin de obtener el ciclo de vida completo de Varroa dentro de las celdas de cría en condiciones de laboratorio para observaciones y experimentación, se diseñaron métodos de cría dentro de celdas artificiales hechas con diferentes materiales. Los materiales probados para las celdas incluyen cera, vidrio, plástico, gelatina (Nazzi & Milani, 1994 y citas en el mismo). En general, la reproducción es muy difícil de obtener, debido a la cantidad de señales que se requieren para que el ácaro se reproduzca con éxito. Sin embargo, en algunos casos se han obtenido tasas de reproducción cercanas a las naturales. En particular, Donzé y Guérin (1994, 1997) obtuvieron ciclos reproductivos completos en celdas artificiales. Las celdas utilizadas se mantuvieron primero en la colmena hasta el operculado, luego se llevaron al laboratorio y se colocaron en una incubadora. A pesar de la baja aceptación y tasa de infestación en estas celdas, permite el uso de celda de tamaños real e infestada de forma natural. Nazzi y Milani (1994) desarrollaron un método que permite la reproducción normal de ácaros en condiciones de laboratorio en celdas en las que se introdujeron larvas y que se infestaron artificialmente para permitir un mayor control del proceso.

3.2.2.1. Infestación Natural

Material necesario: celdas cilíndricas de poliestirolo transparente (dimensiones internas: 5,1 mm de diámetro x 14 mm de longitud para obreras y 6,7 mm de diámetro x 16 mm de largo para zánganos).

1. Incorporar las celdas en los cuadros de cera en una inclinación 5-10 grados en grupos de 60-70 celdas.
2. Cubrir con miel para aumentar la aceptación de las celdas por parte de las abejas obreras y estimular el comportamiento de limpieza.

3. En colonias fuertemente infestadas con Varroa, confinar la reina por 12 horas en las celdas artificiales.
4. Liberar la reina luego de ese periodo.
5. Registrar el momento de operculado de las celdas en intervalos de 1-2 horas luego de 8,5 días de la ovoposición de la reina.
6. Remover las celdas de la colonia y el cuadro luego de que han sido operculados.
7. Colocar en una incubadora a 34,5°C y 60-70% HR.

Ventajas: las celdas transparentes permiten la observación del comportamiento, infestación natural y en celdas de tamaño natural.

Desventajas: tedioso, baja aceptación y tasas de infestación.

3.2.2.2. Infestación artificial

1. Recoger los ácaros y las larvas de abejas L5 de los panales de cría como se describe en la sección 3.1.4. “Recolección de ácaros de la cría”.
2. Colocar la larva en una celda de gelatina sosteniendo su dorso entre el pulgar y el primer dedo para estirarla.
3. Insertar el ácaro utilizando un pincel fino.

En función de pruebas sobre diferentes diámetros, se establece que, como regla general, cuanto más estrecho sea el diámetro de la celda, mayor será la reproducción, pero mayor será también la posibilidad de dañar la larva mientras se inserta en la celda. El mejor resultado se logra con celdas de gelatina de 6,5 mm de diámetro.

4. Colocar en una incubadora a 34,5 ° C, 75% HR.
5. Colocar las celdas de modo que las pupas estén boca arriba. La geotaxis es una señal importante para el comportamiento Varroa (Donzé & Guerin, 1994).
6. Fijar la celda a un sustrato para evitar que ruede y manipular sólo ocasionalmente para observaciones.

Ventajas: se puede obtener un alto porcentaje de ácaros fértiles y un número de cría cercano al de infestaciones naturales en las colmenas; las celdas transparentes permiten observar el comportamiento. El procedimiento *in vitro*

permite un control completo sobre el estado de infestación de la abeja ya que las obreras no tienen la oportunidad de eliminar la cría infestada.

Desventajas: tedioso; el tamaño de celda y la infestación no son naturales.

3.3. Evaluación de la reproducción de Varroa en el laboratorio.

3.3.1. Evaluación de la fertilidad

La evaluación de la fertilidad de los ácaros que se reproducen en celdas artificiales (consulte sección 3.2. "Cría de ácaros en el laboratorio") o celdas naturales sigue el mismo principio que el descrito para los métodos de campo (consulte sección 4.6.1. "Evaluación del éxito reproductivo"). La diferencia es que si se usan celdas transparentes (Donzé & Guérin, 1994; Nazzi & Milani, 1994), no es necesario abrir la celda para contar la descendencia. La producción y la supervivencia de la descendencia pueden monitorearse a lo largo del tiempo.

3.4. Técnicas de marcado

3.4.1. Oogénesis

Luego de la activación del ovocito (la ovogénesis) sigue la incorporación de material euplasmático y/o proteínas de la yema. Para confirmar de forma rápida dicha incorporación y consecuentemente el inicio de la oogénesis, marcar los ovarios con azul de toluidina (Garrido *et al.*, 2000).

1. Retirar el escudo ventral de los ácaros con pinzas de disección delgadas bajo un microscopio binocular.
2. Extirpar el ovario junto con la espermateca y el órgano lirato.
3. Colocar en buffer PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2–7,4).
4. Fijar en formalina (4%) durante 30 min.
5. Lavar tres veces con buffer PBS.
6. Incubar en azul de toluidina (0,005%) durante 30 min. La duración de la incubación puede necesitar optimización, que puede probarse en la coloración de los ovocitos activados aproximadamente 12 h después del operculado de la celda.
7. Enjuagar con buffer PBS durante 15 min.

8. Repetir el enjuague dos veces más.
9. Verificar la coloración de los ovocitos bajo un microscopio con un aumento de 400X.

Ventajas: más fácil y rápida que el método histológico alternativo. Detecta la iniciación de la oogénesis con alta resolución.

Desventajas: en alguna medida tedioso; clasificación subjetiva del color del ovocito.

3.4.2. Sitio de alimentación

Las "Varroas fundadoras" perforan la cutícula de las larvas y pupas de las abejas de las que se alimentan ellas y sus crías (Figs. 6a y 6b). En las pupas tardías, la herida se puede ver en la lupa debido al proceso de cicatrización de la cutícula (Fig. 6c). También se puede localizar mediante la observación de los ácaros cuando se alimentan, evento que es relativamente raro y necesita un sistema *in vitro* para ser observado (consulte sección 3.2.2. "Cría de ácaros en el laboratorio"). En la mayoría de los casos, no se puede ver ninguna herida en las larvas o pupas y es necesario un método de tinción para encontrarla (Fig. 6d). Localizar la herida podría ser necesaria para estudios de comportamiento, de comportamiento de alimentación o reproducción, o para estudios de transmisión de enfermedades secundarias (Kanbar & Engels, 2003). Además, este método también se puede utilizar para los casos en los que debe hacerse visible una perforación de la cutícula de las abejas (por ejemplo, inyección de patógenos u hormonas).

Kanbar y Engels (2004) diseñaron un método de tinción clave que permite la visualización de los sitios de alimentación. Se utiliza el azul Trypan, un colorante que ingresa a células dañadas (Roche, 1999), por ejemplo, células en las larvas, pre-pupas o pupas de la quinta fase del último estadio, que se encuentran alrededor del orificio perforado por la Varroa fundadora. Los sitios de alimentación podrían así teñirse de forma duradera en individuos vivos y observarse en el tiempo (Herrmann *et al.*, 2005). La tinción se puede detectar hasta la etapa en que la cutícula se oscurece al punto de ocultar las células teñidas de azul. En este punto, el teñido ya no es necesario.

Método de tinción:

1. Muestrear larva, pre-pupas o pupas de celdas infestadas con Varroa para realizar la tinción (consulte sección 3.1. "Recolección de ácaros").

2. Sumergir las muestras durante 30 minutos en un volumen de medio de tinción basado en Ringer suficiente para cubrir la mayor parte de la superficie del cuerpo. Larvas y pupas sobreviven a este tratamiento (Kanbar & Engels, 2003).
3. Enjuagar en solución de Ringer puro durante 3 min.

Para preparar la solución de Ringer: Consulte Tabla 1 de la publicación de BEEBOOK sobre cultivos celulares (Genersch *et al.*, 2013).

Medio de tinción vital: 100 ml de solución de Ringer, 0,01 g de azul de Tripano ajustado a pH 6,8 con KOH (0,1 M).

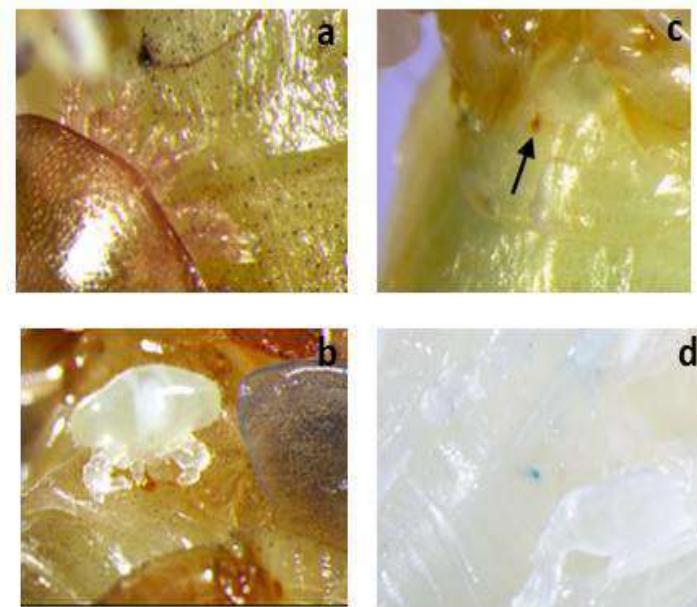


Figura 6. **a.** Ácaro de Varroa adulto succionando hemolinfa de una pupa en el sitio de alimentación (punto negro arriba, a la izquierda). **b.** Ninfa del ácaro Varroa succionando hemolinfa de una pupa en el sitio de alimentación (entre las piernas de la ninfa). **c.** Sitio de alimentación melanizado (flecha). Es visible sin tinción. Estas instancias son más frecuentes en pupas grandes o viejas. **d.** Sitio de alimentación (punto azul) en pupa blanca luego de tinción con azul de tripano. Fotos: Swiss Bee Research Institute.

3.4.3. Marcado de ácaros

Los ácaros de Varroa pueden marcarse con marcadores de pintura, pintura de esmalte para modelos, corrector de brillo de poliéster fluido o pigmento fluorescente (Schultz, 1984; Harris, 2001; Kirrane *et al.*, 2012). Los métodos con pintura son más rápidos de usar y han demostrado ser más seguros para los ácaros. La toxicidad se debe principalmente a los solventes incorporados en los productos. Para la aplicación de la pintura, se recomienda el uso de herramientas suaves para evitar dañar los ácaros. Se puede colocar una gota de pintura en un portaobjetos de microscopio y se pueden recolectar pequeñas cantidades con un pincel muy delgado o un hilo de pescar para su aplicación en el ácaro (Kirrane *et al.*, 2012). Las cerdas de un pincel se pueden cortar dejando suficientes para obtener el tamaño deseado. El tamaño correcto de la herramienta de aplicación se obtiene cuando el punto de pintura es visible, pero no afecta el comportamiento del ácaro.

Si los ácaros se utilizarán para observaciones de comportamiento durante la etapa forética o reproductiva, se debe poner cuidado en que la marca de pintura sea plana de manera que permita a los ácaros empujarse entre los esternitos de las abejas y alimentarse. También para permitir el movimiento libre de los ácaros dentro del área pequeña que representa el espacio entre las pupas y las paredes de las celdas.

Antes de utilizarse en ensayos o estudios a gran escala, debe realizarse una prueba de toxicidad para garantizar que la pintura elegida no sea tóxica para el ácaro: los ácaros marcados y los controles (en los cuales se debe realizar la misma manipulación, pero sin pintarlos) deben mantenerse en condiciones similares y se debe comparar su longevidad. Los ácaros marcados deben vivir tanto como los ácaros no marcados. Para minimizar el riesgo de que el punto de pintura salga de la cutícula y evitar así el reconocimiento del ácaro marcado al final del experimento, se deben realizar pruebas preliminares con diferentes marcas para seleccionar una pintura de larga duración.

3.5. Infección de ácaros de Varroa con enfermedades secundarias

3.5.1. Micro-inyección

Todavía no se han desarrollado técnicas de micro-inyección específicas para Varroa (consulte sección 2.3. "Microinjection" en Human *et al.*, 2013). Campbell y colaboradores (2010) mencionan diversos inconvenientes al probar dichos métodos. La manipulación es laboriosa, requiere de equipo especializado y resultó en la muerte de la mayoría de los ácaros inyectados.

3.5.2. Inmersión

La inmersión de los ácaros en una solución que contiene ARNdh permite inducir el *knockdown* de ciertos genes lo que demuestra el potencial de esta técnica para infectar o contaminar a los ácaros con microorganismos o material genético (Campbell *et al.*, 2010). Campbell y colaboradores (2010) demostró que cuando se establece la osmolalidad adecuada (en este caso se utilizó NaCl al 0,9%) para la solución de inmersión, un gran número de ácaros Varroa (80%) puede sobrevivir largos períodos de inmersión (14 hs a 4 °C), condición necesaria para la infección/contaminación. Hasta el momento, los métodos de inmersión rara vez se han utilizado en estudios con Varroa, motivo por el cual se deben realizar ensayos de optimización de la técnica para mejorar la supervivencia del ácaro después de la inmersión.

3.6. Bioensayos

La influencia de factores físicos y químicos en *V. destructor* han sido abordados en distintos bioensayos. Estos bioensayos han sido útiles en dos ámbitos de investigación en Varroa: el estudio de semioquímicos involucrados en la interacción entre el ácaro y la abeja, y en el estudio de resistencia del ácaro a acaricidas.

3.6.1. Condiciones experimentales

3.6.1.1. Ambiente

El ácaro vive en la colmena bajo condiciones estrictamente controladas, por lo que, con el objetivo de obtener una representación realística del ácaro hacia un químico, debe testearse en las mismas condiciones de temperatura (32-35°C) y humedad relativa (70%).

3.6.1.2. Dosis de químicos

Con el objetivo de evitar algún desajuste vinculado al efecto real del químico, éstos deben ser testeados en dosis cercanas a su rango biológico. Por ejemplo, la mayoría de los químicos cuando son testados a dosis muy altas, resultan repelentes. Desafortunadamente, este aspecto no ha sido muy considerado en el estudio de la ecología química de Varroa (ver ejemplos en Milani, 2002). En estudios de dosis-respuesta en los que se analiza el efecto de distintas dosis en

alguna variable biológica, es importante considerar la dosis en escala logarítmica.

3.6.1.3. Ácaros a ser utilizados

En estudios de ecología química, los ácaros que se utilizan en los bioensayos deben ser los involucrados en el proceso en estudio (por ejemplo, si el estudio se trata de la invasión de celdas, se utilizan los ácaros que invaden las celdas de cría). En estudios de eficacia de los acaricidas, la etapa de vida de los ácaros probados debe corresponderse a lo que estará expuesto al producto bajo análisis. En contraste con muchos otros artrópodos cuya ecología es estudiada por medio de bioensayos, actualmente no se dispone de ningún método altamente efectivo de cría artificial para el ácaro Varroa (consulte sección 3.2. "Cría de ácaros en el laboratorio"); por lo tanto, la estandarización es una tarea difícil cuando se trata de recolectar ácaros que son homogéneos para la edad, condición fisiológica, estado de apareamiento, etc. Una solución a este problema es usar ácaros que están en la misma etapa de su ciclo de vida (consulte sección 3.1. "Recolección de ácaros").

3.6.2. Bioensayos en ecología química de Varroa

Algunos de los bioensayos utilizados hasta ahora en el estudio de la ecología química de Varroa fueron adaptaciones simples de las que ya se usaban para el estudio de semioquímicos en otros artrópodos (Baker & Cardé, 1984). En particular, la respuesta del ácaro Varroa hacia diferentes fuentes de olor y los compuestos puros se probaron usando varias configuraciones de propósito general incluyendo olfatómetros "four-arms" (Le Conte *et al.*, 1989), servosferas (Rickli *et al.*, 1992), y mazes (Kraus, 1993), túneles de viento (Kuenen & Calderone, 2002) y arenas de observación (Rickli *et al.*, 1994). En otros casos, los bioensayos se diseñaron específicamente para el estudio del ácaro Varroa. En esta sección, nos concentraremos en este último. Los estímulos químicos que influyen en el comportamiento del ácaro durante las siguientes etapas del ciclo biológico del ácaro se han estudiado mediante bioensayos de invasión de celdas, apareamiento y oviposición.

3.6.2.1. Invasión de celdas

En este caso, la atención está en las señales que influyen en la entrada del ácaro en la celda de cría que contiene una larva de abeja L5 (consulte sección 2.5.

“*Obtaining brood and adults of known age*” en Human *et al.*, 2013) para una descripción de estadios larvarios), durante las 20-60 horas previas al operculado (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Aquí se describen los métodos para bioensayos adecuados para estudiar atrayentes vinculados a la invasión de celdas obreras (Rosenkranz, 1993; Nazzi *et al.*, 2001; Nazzi *et al.*, 2004; Aumeier *et al.*, 2002) y repelentes involucrados en la repulsión del ácaro a celdas reina (Nazzi *et al.*, 2009).

3.6.2.1.1. Ácaros a utilizar

Se desconoce qué determina el final de la fase forética de los ácaros. Por lo tanto, el uso de ácaros foréticos para este ensayo no es ideal ya que los ácaros muestreados al azar podrían no estar 'motivados' para ingresar a las celdas y responder al estímulo provisto. Por lo tanto, es recomendable usar ácaros que han expresado recientemente este comportamiento y lo repetirán nuevamente. Sin embargo, varios experimentos confirman que, durante la temporada, la mayoría de los ácaros foréticos están dispuestos a reproducirse (por ejemplo, Rosenkranz & Bartalszky, 1996; Martin & Cook, 1996; Garrido & Rosenkranz, 2003; Frey *et al.*, en preparación) y por lo tanto también podrían usarse para este tipo de experimentos (consulte sección 3.1. "Recolección de ácaros" para obtener una descripción de cómo obtenerlos).

3.6.2.1.2. Diseño experimental

Este bioensayo fue descrito por Nazzi y colaboradores (2001) y representa una modificación del dispositivo utilizado por Rosenkranz (1993).

1. Utilizar una arena que consiste en una placa de vidrio con cuatro pocillos (7 mm diámetro; 8 mm de profundidad) equidistante (1 cm) desde el centro.
2. Colocar una tapa de vidrio en un anillo metálico circular (5,6 cm de diámetro) para confinar a los ácaros en la arena.
3. Aplicar el tratamiento a dos pocillos opuestos mientras que los otros dos pocillos se utilizan como controles.
4. Colocar una larva de abeja en cada pocillo.
5. Colocar una hembra adulta en el centro de la arena entre los cuatro pocillos con un pincel fino (Fig.7).

6. Mantener las arenas en una cámara a 34,5 °C y 60-70% HR durante la duración del bioensayo.

7. Chequear la posición de los ácaros cada 5 min durante 30 min.

Para obtener un tamaño de muestra suficiente, se utilizan veinte arenas a la vez y las pruebas se replican en días diferentes varias veces (típicamente un mínimo de tres) usando un total de al menos 60 ácaros.

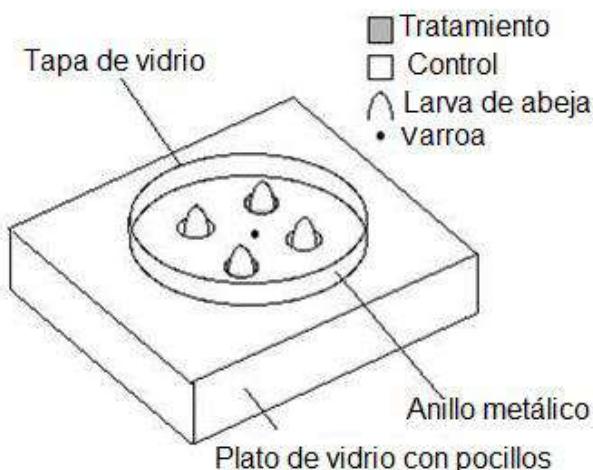


Figura 7. Arena utilizada para los ensayos de comportamiento de invasión de celdas.

3.6.2.1.3. Análisis de los datos

Debido a que no se conoce la distribución de las variables a muestrear, se realiza una prueba de aleatorización muestreada. Esta prueba es preferible a las pruebas de estadística paramétrica convencionales ya que a menudo conducen a sobreestimar la importancia de las diferencias.

Para cada arena, la cantidad de veces que se observa el ácaro en los pocillos tratados y de control, respectivamente, durante el período de 30 minutos son utilizados como datos para el análisis estadístico. Esto se hace independientemente de si el ácaro había cambiado los pocillos entre observaciones o simplemente se quedó en el mismo pocillo. Luego, se construye una matriz con tantas filas como el número de ácaros utilizados en el bioensayo, y dos columnas que contiene los datos de los pocillos tratados y de control para cada uno de los ácaros probados. Los datos provenientes de los grupos tratados y control son comparados por una prueba de aleatorización muestreada (Manly,

1997; Sokal & Rohlf, 1995). La distribución de aleatorización se debe volver a muestrear un número suficiente de veces (por ejemplo, 106 veces).

3.6.2.2. Oogénesis

Aproximadamente 70 h después del operculado, el ácaro comienza a poner huevos, lo cual continúa a intervalos de 30 h hasta 5-7 generaciones de descendencia (Rosenkranz *et al.*, 2010). Las señales que influyen en la oviposición fueron estudiadas utilizando celdas de cría artificiales (Milani & Chiesa, 1990; Trouiller & Milani, 1999).

3.6.2.2.1. Ácaros utilizados en los bioensayos

Para estudiar los factores que afectan la ovogénesis, deben utilizarse ácaros que aún no han sido estimulados para comenzar la ovogénesis. Tener en cuenta que, si un ácaro ha estado en contacto con una larva L5 durante 6 h, se inicia la ovogénesis (Garrido *et al.*, 2000). Por lo tanto, se deben usar los ácaros foréticos. Sin embargo, no todos los ácaros foréticos iniciarán la reproducción y ovogénesis ya que son de diferentes edades y estados fisiológicos. Para analizar los factores que desencadenan la oviposición una vez que la oogénesis del ácaro se ha activado y completado, se deben colectar los ácaros de celdas de entre 24 hs y 123 hs de operculada (después de lo cual dejan de reproducirse, Nazzi inédito). Una vez colectados deben ser introducidos en celdas que contienen una pupa joven suficiente para permitir el ciclo reproductivo normal (consulte sección 3.1.4. “Recolección de ácaros de la cría” para obtener ácaros de sus celdas). Para estos estudios, se deben considerar las diferentes fases del desarrollo ontogenético del ácaro (Steiner *et al.*, 1994).

3.6.2.2.2. Diseño experimental para probar la activación de ovogénesis

Bioensayo para evaluar el efecto de compuestos volátiles o no volátiles para su efecto sobre la activación de la ovogénesis.

En el campo:

1. Tratar las celdas de cría con el estímulo bajo prueba o tratar los ácaros. Tener cuidado con la toxicidad del solvente para abejas y ácaros.
2. Abrir las celdas un mínimo de 70 h después de la introducción del ácaro.

3. Chequear la presencia de huevos en las celdas. Abrir las celdas más tarde (por ejemplo, entre 7 y 10 días) facilita la detección de huevos y crías, pero aumenta las posibilidades de remoción por parte de las abejas.

Ventajas: menos tiempo en comparación con el bioensayo de laboratorio. Muchas celdas de cría pueden tratarse bajo condiciones naturales.

Desventajas: los estímulos no se pueden evaluar independientemente de otros factores (larvas, actividad de abejas nodrizas).

En el laboratorio

Este protocolo está basado en Garrido y Rosenkranz (2004) para probar el efecto de los volátiles en la activación de la ovogénesis:

1. Ofrecer compuestos volátiles en un trozo de papel de filtro colocado en un tubo de PCR de 0,2 ml.
2. Agregar un ácaro hembra en el tubo.
3. Evitar que el ácaro llegue al papel de filtro con una gasa de plástico.
4. Retirar los ácaros ocho horas después de la exposición al supuesto factor desencadenante
5. Diseccionar el tracto reproductivo de los ácaros.
6. Teñir el tracto reproductivo para determinar el desarrollo de los ovocitos terminales (consultar secciones 3.4. "Técnicas de marcado" y 3.4.1. "Oogénesis").

Ventajas: Es la única prueba de estímulo posible.

Desventajas: demanda mucho tiempo. Debido a la falta de nutrición del ácaro, la prueba solo se puede realizar durante aproximadamente 8 h.

3.6.2.2.3. Diseño experimental para testear la oviposición

1. Tratar la celda o el ácaro con el compuesto bajo prueba. Tener cuidado con la toxicidad del solvente para abejas y ácaros.
2. Transferir los ácaros a las celdas que contienen un hospedero a una edad temprana suficiente, que permite la reproducción del ácaro para proceder normalmente.

3. Monitorear la reproducción después de un intervalo de tiempo dado. Cuando se necesita medir la fecundidad, la celda debe ser abierta un día antes de que emerja. Este período puede ser más corto si solo la fertilidad (es decir, responder a la reproducción sí o no) es de interés, pero debe pasarse 70 h después del límite (Tabla 2).

3.6.2.3. Orientación dentro de la celda operculada

Estudios cuidadosos del comportamiento del ácaro dentro de la celda de cría llevado a cabo por Donzé y Guérin (1994) han revelado una buena distribución de actividad espacial y temporal. Los químicos involucrados en esta etapa crucial del ciclo de vida del ácaro se estudiaron principalmente utilizando bioensayos basados en arenas de observación (Donzé *et al.*, 1998; Calderone & Lin, 2001).

3.6.2.3.1. Ácaros para ser utilizados

Los ácaros deben tomarse a partir de celdas infestadas de forma natural en la etapa en el que se expresa el comportamiento bajo análisis (consulte sección 3.1. "Recolección de ácaros").

3.6.2.3.2. Diseño experimental

Donzé y colaboradores (1998) utilizaron una modificación del bioensayo descrito por Rickli y colaboradores (1994) para estudiar los químicos que inducen el secuestro de ácaro.

1. Usar una placa de vidrio limpiada con acetona y pentano.
2. Dibujar tres círculos concéntricos de 12 y 24 y 36 mm diámetro en la parte inferior del vidrio (Fig. 8).
3. Aplicar el compuesto a probar en la parte superior de la placa de vidrio en el anillo delimitado por los círculos de 12 y 24 mm.
4. Colocar un ácaro en el centro de los círculos (los ácaros que no alcanzan el área de tratamiento dentro de los primeros 300 seg son descartados).
5. Observar la actividad de caminar del ácaro.
6. Tener en cuenta el tiempo que pasó en el área tratada. Este tiempo se usa como una medida de la actividad de secuestro del estímulo bajo prueba.
7. Detener el ensayo cuando el ácaro cruce el círculo exterior de 36 mm o después de 300 seg.

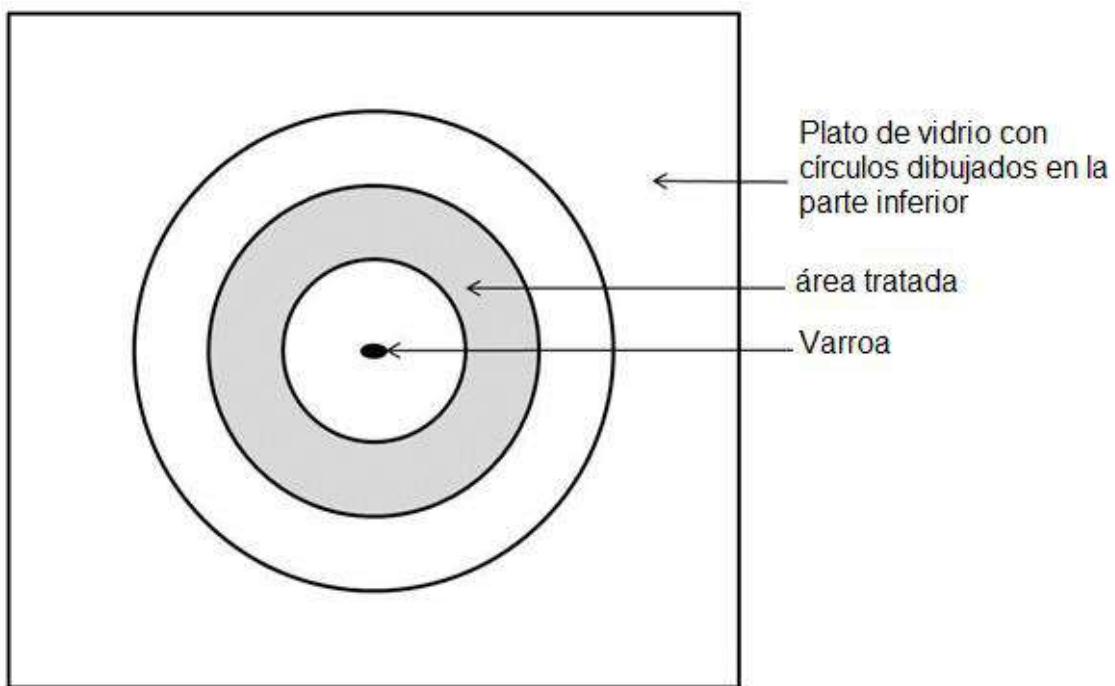


Figura 8. Arena de testeo para bioensayo de secuestro de ácaro.

3.6.2.3.3. Análisis de los datos

Para verificar diferencias entre tratamientos y controles, se comparan los tiempos pasados dentro del área tratada con diferentes estímulos usando test no paramétricos como las pruebas de Mann–Whitney y Friedman (para experimentos simples y repetidos, respectivamente). Debido a algunas réplicas desequilibradas, es posible utilizar una generalización de la prueba de Friedman (Del Fabbro & Nazzi, 2008).

Tabla 2. Tiempo mínimo de post-operculado para el cual varios parámetros de reproducción del ácaro pueden ser medidos de manera precisa. Adaptado de Martin, 1994 y 1995a. *Para la identificación del ácaro fisiogástrico, ver la Figura 14. Al comparar este ácaro con un ácaro no fisiogástrico, los segmentos de este último aparecen conectados y sin bordes blancos (membrana intersegmental).

Clasificación de la reproducción del ácaro	Tiempo desde el operculado (horas)	Comentarios
anormal	>60	luego de que el primer huevo debería haber sido puesto
anormal con un solo macho	>140	luego de que el segundo huevo debería haber eclosionado
Sin reproducción	30-50	si la madre fundadora no es fisiogástrica
	>70	ausencia de huevos
ácaro muerto atrapado en la pared de la celda	>30	luego de finalizada la construcción del capullo por parte de la larva
ácaro muerto en la celda	>0	en cualquier momento

3.6.2.4. Fase forética

Después de emerger de la celda de cría, el ácaro ingresa a la fase forética en abejas adultas y dura allí hasta la invasión de una nueva celda de cría para comenzar la fase de reproducción. Los bioensayos han sido utilizados por varios autores para trabajar en las señales químicas que afectan al ácaro en las abejas adultas. Kraus (1994) usó un bioensayo de doble elección para probar varios productos químicos por su efecto sobre el ácaro, como un procedimiento de detección para identificar las posibles sustancias que se utilizarán en los métodos de control biológico.

Él y otros autores utilizaron bioensayos de laboratorio para investigar los estímulos que afectan la elección del hospedero por el ácaro (Hoppe & Ritter, 1988; Kraus, 1990, 1994; Del Piccolo *et al.*, 2010). Todos estos bioensayos están basados en el mismo tipo de configuración. Aquí se presentará el diseño de bioensayo descrito por Del Piccolo y colaboradores (2010), el cual fue utilizado para estudiar la preferencia de la Varroa para el polen y las abejas nodrizas.

3.6.2.4.1. Ácaros a ser utilizados

Los ácaros se muestran con el hospedero que los porta. Los ácaros son separados de su abeja hospedera por medio de un aspirador bucal o un cepillo de pintura. La recolección de ácaros con el método de azúcar en polvo no es recomendado dado los posibles efectos del azúcar sobre la vitalidad de los ácaros (consulte sección 3.1. "Recolección de ácaros").

3.6.2.4.2. Diseño experimental

1. Limpiar una placa de Petri de vidrio pequeña (60 mm de diámetro) con acetona y hexano o pentano.
2. Colocar 2 abejas adultas muertas en 2 lados diametralmente opuestos de la placa de Petri, cerca de las paredes (Fig. 9).
3. Tratar a una abeja con la sustancia probada, tratar a la otra (control) abeja con el disolvente utilizado para transferir la prueba sustancia en la primera abeja. Use un volumen de solvente lo más pequeño posible para evitar perturbar la capa de hidrocarburos cuticulares. En caso de un bioensayo de remoción/restauración, la cutícula de las abejas debe ser lavada con un solvente para eliminar los hidrocarburos.
4. Colocar las placas de Petri en una cabina termostática, en la oscuridad, a 34,5 °C y 60-70% de humedad relativa.
5. Colocar un ácaro hembra adulta en el centro de la placa de Petri.
6. Observar la posición del ácaro cada 10 min durante 60 min. Se consideran tres posiciones: ácaro en la abeja tratada, ácaro en la abeja de control, los ácaros que no se encuentran en las abejas.
7. Probar 10 ácaros en diferentes placas de Petri simultáneamente y replicar 6 veces. Alternar los lados de las abejas tratadas y de control para cada réplica para controlar la influencia de factores externos en la locomoción de los ácaros.

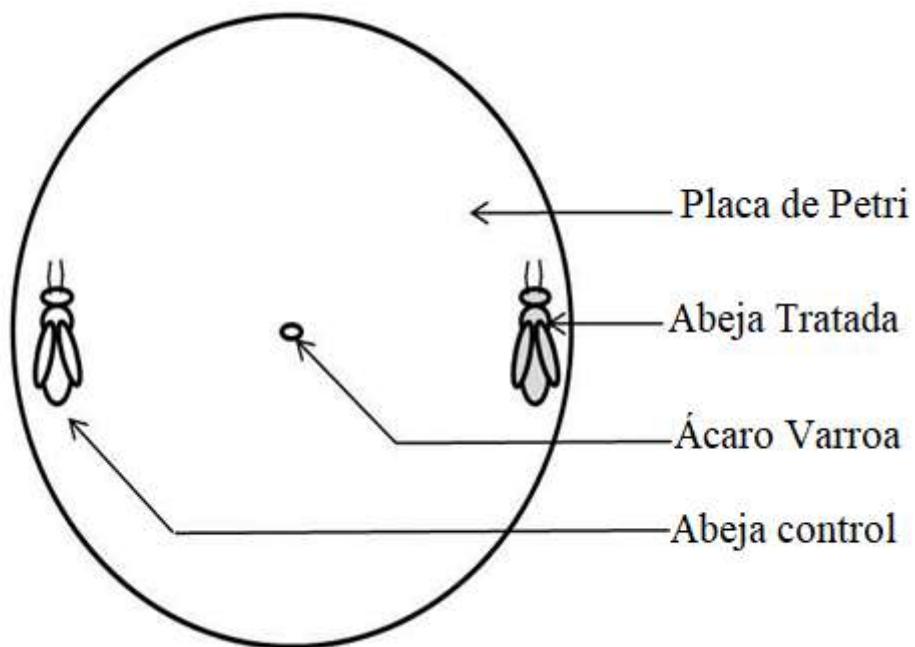


Figura 9. Arena de testeо para bioensayo de atracción de ácaros foréticos.

3.6.2.4.3. Análisis de datos

Para cada placa de Petri, se calcula una puntuación sumando el número de ácaros que se encontraron en las abejas durante las seis observaciones. Esta cifra puede variar entre 0 y 6 y es representativa del tiempo que el ácaro Varroa está en las abejas. La puntuación se puede considerar como una medida de la preferencia del ácaro por el estímulo bajo prueba. Los datos de todas las réplicas se organizan en una matriz con un número de filas equivalente al número de ácaros utilizados en el bioensayo, y 2 columnas que contiene las puntuaciones de los 2 estímulos a comparar. Como las variables en estudio tienen una distribución desconocida, las puntuaciones de diferentes estímulos en un conjunto de datos se comparan mediante una muestra de prueba de aleatorización (Sokal & Rohlf, 1995; Manly, 1997). La distribución de aleatorización debe volverse a muestrear un número de veces suficiente (por ejemplo, 106 veces). Los productos químicos activos identificados mediante bioensayos de laboratorio pueden ser probados en el campo. Por metodologías relacionadas consulte sección 4.8.4. "Evaluación de Varroacidas en el campo". Esta guía describe la prueba de efectos acaricidas; sin embargo, también se puede usar cuando se usan sustancias que no matan a los ácaros, pero perturban su orientación y reproducción. El efecto esperado no es la muerte de los ácaros, sino una reducción en el tamaño de la población de ácaros en la colonia lo cual también puede ser detectado con este método.

3.6.2.5. Bioensayos de apareamiento

Este bioensayo permite la observación y el análisis de comportamiento de apareamiento de los ácaros en condiciones de laboratorio y también es adecuado para probar sustancias que puedan estimular o perturbar el comportamiento de apareamiento.

3.6.2.5.1. Ácaros utilizados en el bioensayo

Machos adultos y todas las otras etapas relevantes de ácaros para el bioensayo de apareamiento se pueden encontrar en las celdas de cría de obreras con una edad de entre 8-9 días post-operculado. Consultar sección 3.1.4. "Recolección de ácaros de la cría" para la descripción de cómo recoger ácaros de las celdas. Las hembras obtenidas poco después de la muda adulta deben ser utilizadas para la observación general del comportamiento de apareamiento y experimentos de perturbaciones. Las deuteroninfas (Fig. 10) no son atractivas para machos y se pueden usar como "muñecos" cuando el objetivo es probar señales de estímulo. Los ácaros deben separarse según el sexo (consulte sección 4.6.1. "Evaluación del éxito reproductivo" y las Figs. 10 y 11) y deben ser guardados en grupos de máximo 5 individuos a 28-30 °C para evitar copulaciones no deseadas y una disminución de la aptitud física.

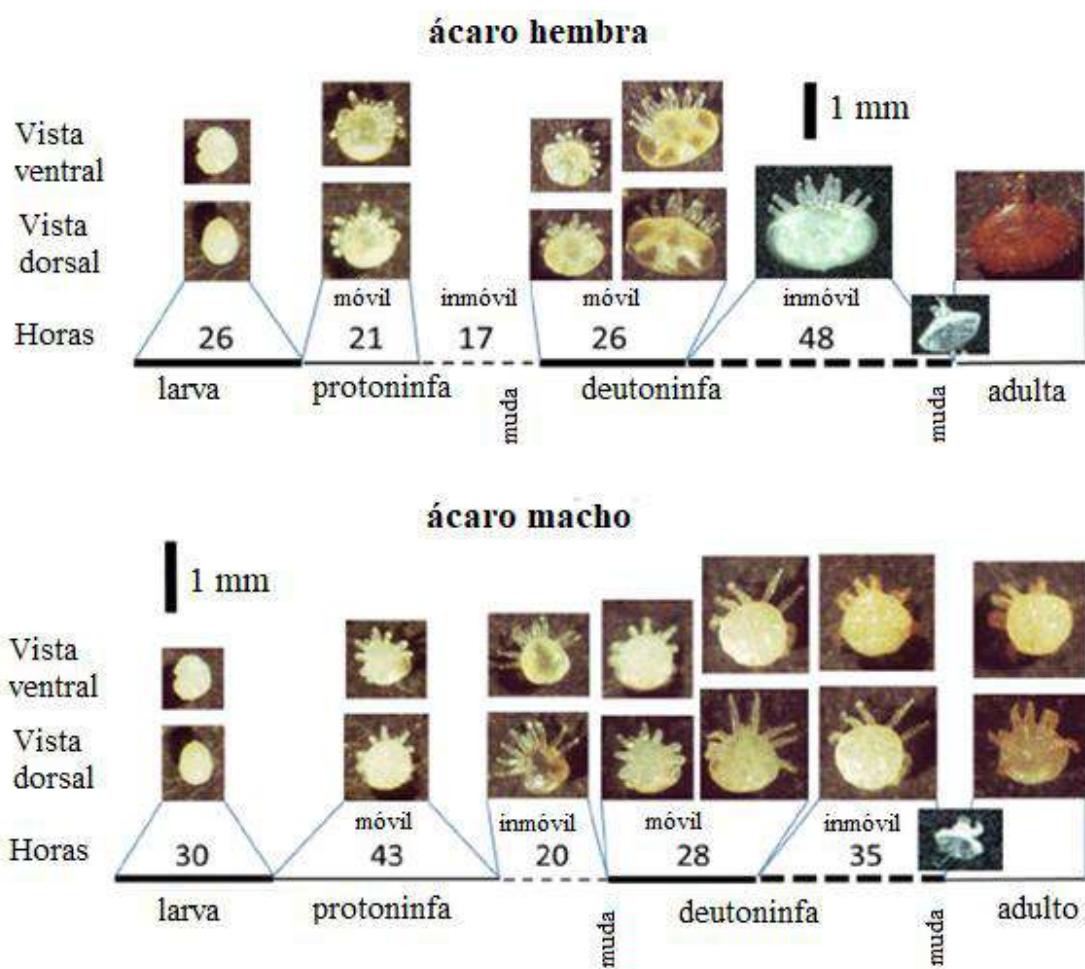


Figura 10. Vista ventral y dorsal de los estadios de desarrollo de las hembras de *Varroa destructor* (arriba) y de los machos (debajo) en cría de *A. mellifera*. El tiempo de desarrollo aproximado se muestra arriba de las líneas horizontales de diferente espesor que delimitan los estadios. Las líneas continuas representan las fases móviles mientras que las líneas de puntos representan las fases inmóviles previo a la muda (de acuerdo con Donzé *et al.*, 1994). Las fases móviles e inmóviles sólo pueden distinguirse en material vivo, no en muestras frizadas. Fotos: R. Nennelli y S. Martin.

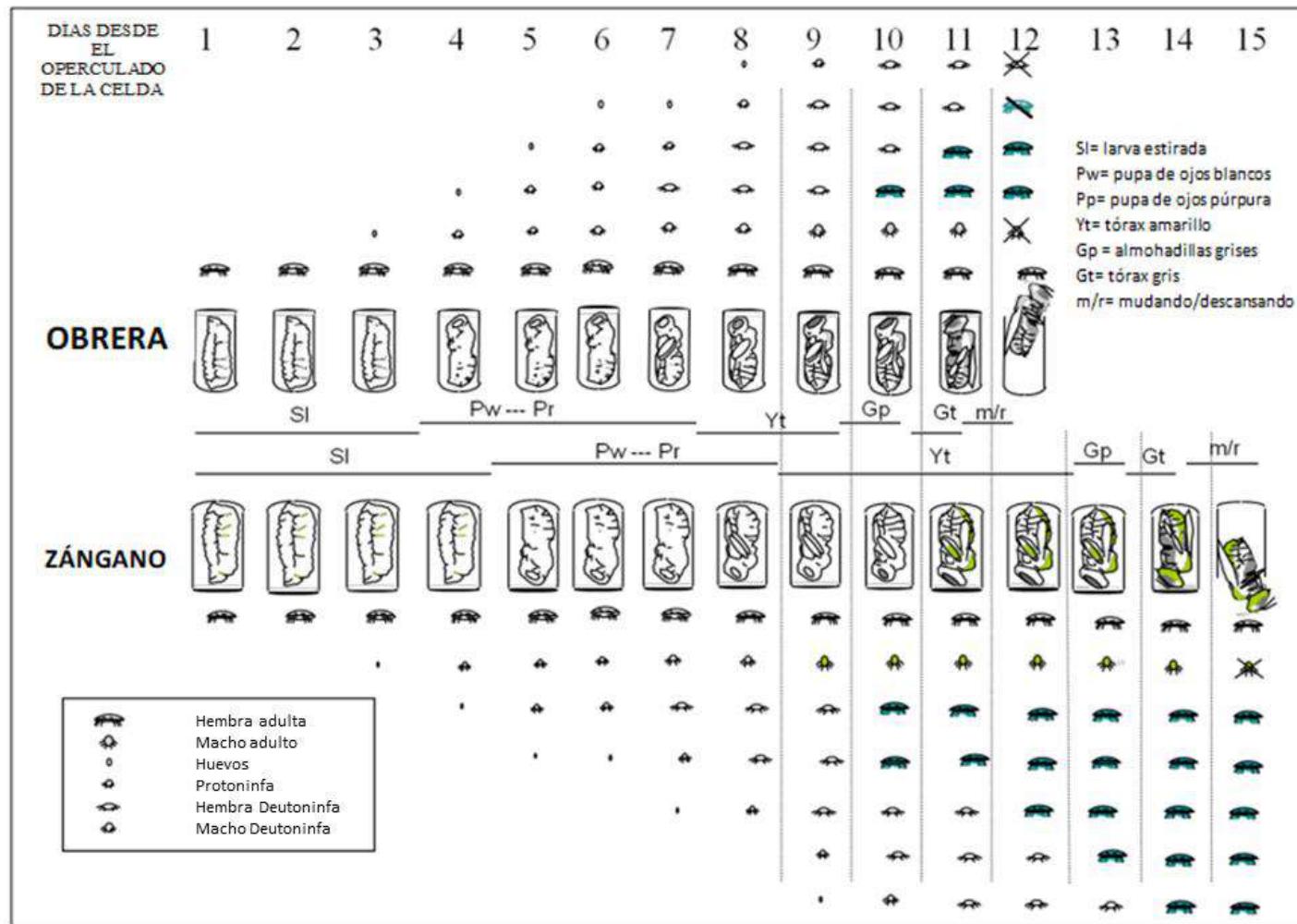


Figura 11. Tabla con el desarrollo de Varroa en su hospedero, *Apis mellifera*.

3.6.2.5.2. Diseño experimental

Este bioensayo fue descrito por Ziegelmann *et al.* (2012).

1. Se pueden utilizar las copas de celdas de reina Queen (por ejemplo, Nicot system®) como prueba de arena. Se recomienda embeber las copas de celdas con cera en una placa de Petri de vidrio.
2. Asegurar una temperatura de 28-30 °C en la copa de la celda colocando el diseño previamente mencionado en una placa de calor.
3. Transferir los estadios de ácaros que interesan en la copa de la celda. Cuando se analizan extractos o sustancias individuales, siga los pasos 4 y 5, mientras que, si solo se observa comportamiento, pase a 6.
4. Aplicar sustancias de prueba volátiles a un trozo de papel de filtro (tamaño: 1,5 mm x 15 mm).
5. Colocar sustancias volátiles en las proximidades de la hembra; aplique sustancias no-volátiles directamente al ácaro hembra. Para la aplicación de la sustancia de prueba, elija un solvente que no daña ni repele a la hembra.
6. Cubrir con una placa de vidrio para evitar que escapen los ácaros.
7. Registrar las respuestas masculinas con, por ejemplo, el software Observer (Tecnología de la información de Noldus) durante 5 o 10 minutos.
8. Clasificar las respuestas masculinas de la siguiente manera: 1. movimiento alrededor de la hembra; 2. montar el dorso de la hembra; y 3. Cópula contra el vientre de la hembra.

3.6.3. Bioensayos para cuantificar la susceptibilidad de la Varroa a los acaricidas

La resistencia al acaricida representa un gran problema para la apicultura y se ha relacionado con pérdidas generalizadas de colonias de abejas. Para reducir el impacto de tales pérdidas, es vital una detección rápida de la resistencia a Varroa en la población. También hay una necesidad de descubrir nuevas sustancias Varroacidas. Milani (1995) ideó un bioensayo para el estudio de acaricidas que son activos por contacto (es decir, el ingrediente activo contamina la cutícula de las abejas y es absorbido por el ácaro por contacto indirecto). Este es el caso de la mayoría de los acaricidas utilizados actualmente (por ejemplo,

piretroides y algunos ácidos orgánicos). El bioensayo descrito se ha utilizado para probar la actividad de varios acaricidas incluyendo tau-fluvalinato, flumetrina (Milani, 1995), perizina y Cekafix (Milani & Della Vedova, 1996), ácidos oxálico y cítrico (Milani, 2001), así como para el estudio de reversión de resistencia (Milani & Della Vedova, 2002). Para aquellos acaricidas que son ampliamente utilizados para el control del ácaro Varroa y son transmitidos por el aire, el bioensayo anterior no es adecuado. Para estos casos un nuevo bioensayo desarrollado por el Laboratorio de la abeja melífera de la Universidad de Udine se presenta en la sección 3.6.3.3. “Bioensayos para sustancias volátiles”.

3.6.3.1. Ácaros utilizados en bioensayos de susceptibilidad

Para este ensayo, se deben utilizar los ácaros que estarían expuestos al producto en las colonias. Algunos productos solo afectan a la Varroa forética, otros también afectan a los ácaros en las celdas de cría. Los ácaros adultos en la etapa reproductiva podrían tener diferente susceptibilidad en comparación con los ácaros foréticos o sus descendientes porque su cutícula no está endurecida o debido a diferencias fisiológicas. Milani (1995) y Milani y Della Vedova (1996) probaron compuestos que solo afectan a los ácaros foréticos, pero mostraron que la mortalidad fue más homogénea en los ácaros recolectados de la cría. Esto podría deberse a una fisiología más homogénea comparado a la de los ácaros foréticos. Por lo tanto, se recomienda probar todas las etapas de la vida para obtener una imagen completa de la susceptibilidad a los ácaros. Cuando se prueban los ácaros de cría, se colectan panales (o trozos de panal) de colonias infestadas después de abrir e inspeccionar celdas operculadas. Los ácaros que parasitan la cría de diferentes etapas de desarrollo tienen diferentes susceptibilidades a los acaricidas (Milani & Della Vedova, 1996). Para las pruebas, por lo tanto, los ácaros se agrupan según la edad de su hospedero de cría y se analizan por separado. La edad de las larvas o pupas que se encuentran en estas celdas puede ser predeterminado marcando la celda en el momento de operculado y abriéndola luego en un momento dado. Alternativamente, la edad aproximada de la cría se puede inferir en función de la morfología y pigmentación de la larva o la pupa (consulte sección 2.5. “*Obtaining brood and adults of known age*” en Human *et al.*, 2013). Es posible mezclar los ácaros obtenidos de diferentes etapas sólo si estudios previos indican que no hay diferencias entre las distintas etapas de desarrollo (Milani, 1995), ya que dichas diferencias podrían influir en su susceptibilidad a la actividad de diferentes compuestos independientemente del desarrollo del hospedero, aunque esto no ha sido probado todavía. Los ácaros se mantienen en su larva o pupa hospedera en

placas de Petri hasta que se recoja un número suficiente. Esto asegura que puedan alimentarse si tienen hambre y la presencia de su propio hospedero asegura que su estado fisiológico no cambia. Solo hospederos del mismo estadio pueden mantenerse en la misma placa, ya que los ácaros pueden abandonar su larva o pupa y subir a otra.

3.6.3.2. Bioensayos para sustancias de contacto.

1. Para formar la arena, limpiar con acetona y hexano un anillo de acero inoxidable (56 mm de diámetro interno, 2–3 mm de altura) y 2 círculos de vidrio (62 mm de diámetro; NaCa vidrio).
2. Aplicar el producto a analizar y la solución de control en las piezas de la arena. Probar diversas concentraciones de los productos. Para definir estas concentraciones consultar Medrzycki y colaboradores (2013). La aplicación del ingrediente activo en las piezas de arena varía según sus propiedades fisicoquímicas.

2.1. Para ingredientes activos solubles en agua (compuesto polar):

- 2.1.1. Mezclar el ingrediente activo con un solvente conveniente.
- 2.1.2. Rociar los discos de vidrio y el anillo con una solución del compuesto lo más uniformemente posible.

Esto se puede hacer por medio de un "spray de precisión Potter torre" (por ejemplo, Burkard Manufacturing Co; Reino Unido) (Milani, 2001). Para hacerlo, cargar el depósito con 1 ml de solución; ajustar a una distancia entre la superficie rociada desde el extremo inferior del tubo a 11 mm y usar una boquilla de 0,0275 pulgadas. La presión se ajusta (generalmente en el rango de 350 a 500 hPa) hasta que la cantidad de solución depositada sea $1 \pm 0,05 \text{ mg/cm}^2$. Alternativamente, si dicho equipo no está disponible, se puede utilizar la placa de Petri de vidrio como arena. La solución (ingrediente activo en un solvente de bajo punto de ebullición) se vierte en la placa para cubrir todo el fondo de la placa y dejar evaporarse bajo una campana extractora. Dependiendo de la tensión superficial del ingrediente activo, dará como resultado una capa uniforme de sustancia en el fondo de la placa. Luego, los ácaros pueden ser expuestos a la sustancia en la placa de Petri. Este método no se puede utilizar cuando la tensión superficial del ingrediente es demasiado alta y se forman gotas en la placa de Petri.

2.2. Para ingredientes activos solubles en lípidos (compuesto apolar):

- 2.2.1. Derretir 10 g de cera de parafina (por ejemplo, Merck 7151, punto de derretimiento de 46-48 °C) en un recipiente de vidrio mantenido en baño de agua a 60 °C.
 - 2.2.2. Disolver la cantidad requerida del ingrediente activo en un disolvente apropiado (por ejemplo, hexano o acetona).
 - 2.2.3. Agregar esta solución a la cera derretida. El disolvente solo se agrega a la cera de control.
 - 2.2.4. Pese los discos de vidrio y los anillos de hierro antes de cubrirlos con la cera.
 - 2.2.5. Agitar la mezcla durante 30 min.
 - 2.2.6. Sumergir los anillos de acero en la cera de parafina fundida, un lado de los discos de vidrio se recubre bajando los discos sobre la parafina fundida.
 - 2.2.7. Pesar los discos de vidrio y los anillos de hierro después del recubrimiento. Desechar las arenas (anillo + círculos de cristal) con un total de recubrimiento fuera del rango 1,6-2 g.
 - 2.2.8. Mantener las piezas de arena durante al menos 24 h a temperatura ambiente para permitir que el solvente se evapore.
 - 2.2.9. Almacenar a 32,5 °C hasta su uso.
3. Colocar el anillo entre los círculos de cristal para construir una jaula. Las jaulas se usan dentro de las 60 h de preparación, por no más de tres ensayos.
 4. Introducir de 10 a 15 ácaros en esta jaula y una las piezas con gotas de cera derretida. Utilizar ácaros recogidos de larvas curvadas, larvas estiradas, pupas con ojos blancos y con ojos oscuros y cuerpo blanco y pálido (consulte sección 2.5. "Obtaining brood and adults of known age" en Human *et al.*, 2013)
 5. Despues de 4 h, transferir los ácaros a una placa de Petri de vidrio limpia (60 mm diámetro) con dos o tres larvas de obreras tomadas de las celdas de 0-24 h después del operculado (obtenidas según se describe en la sección 3.1.4. "Recolección de ácaros de la cría") o con dos o tres pupas de ojos blancos (45 días después de la limitación).
 6. Observar los ácaros bajo un microscopio de disección, 4, 24 y 48 h después del inicio del tratamiento (es decir, en el momento en que se transfiere a la placa de Petri) y clasificar como:

6.1. Móviles: caminan cuando están de pie, no estimulados o después de la estimulación.

6.2. Paralizados: mueven uno o más apéndices, no estimulados o después de la estimulación, pero no pueden moverse.

6.3. Muerto: inmóvil y no reacciona a luego de 3 estimulaciones posteriores.

Se puede utilizar una aguja para estimular los ácaros al tocar sus patas. Limpiar las agujas o utilizar nuevas agujas para estimular grupos control y evitar su contaminación con residuos de ingredientes activos de ácaros tratados. Los ensayos se llevan a cabo a 32,5 °C y 60-70% de humedad relativa. Si la mortalidad en los controles supera el 30%, se excluye la réplica. Cada experimento debe ser replicado con un número suficiente de jaulas (consulte en Medrzycki *et al.*, 2013 y Pirk *et al.*, 2013). Si los ácaros son escasos, realizar más repeticiones y analizar más ácaros a dosis que se encuentren alrededor de la mediana de la densidad letal, de forma de aumentar la resolución estadística en esta región.

3.6.3.3. Bioensayos para sustancias volátiles.

1. Disolver el ingrediente activo (por ejemplo, timol) en un disolvente adecuado (por ejemplo, éter di-etílico) a una concentración de 0,5 g /ml.
2. Tratar un área circular (diámetro = 6 cm) del lado interno de la tapa de una placa de Petri de vidrio (diámetro = 14 cm) con 250 μ l de la solución.
3. Dejar que el solvente se evapore.
4. Colocar de 10 a 15 ácaros en el fondo de la placa de Petri y mantener diferentes grupos dentro del contenedor cerrado durante 0, 15, 30, 45, 90, 135 min a temperatura ambiente.

Utilizar ácaros del mismo origen que para el bioensayo de susceptibilidad para contactar sustancias (consulte sección 3.6.3. “Bioensayos para cuantificar la susceptibilidad de la Varroa a los acaricidas”).

5. Después de cada intervalo, trasferir el grupo a pequeñas placas de Petri (diámetro = 6 cm) con una larva de abeja por cada cinco ácaros.
6. Colocar en una incubadora a 34,5 ° C y 60-70% de humedad relativa.
7. Monitorear la supervivencia de los ácaros a las 48 horas.

3.6.3.4. Análisis de los datos

Los datos se analizan utilizando la transformación probit. Considerar la tasa natural de mortalidad utilizando el abordaje iterativo según Finney (1949). Computar las concentraciones que matan a una determinada proporción de ácaros y sus límites fiduciales según Finney (1971). Consultar en Medrzycki y colaboradores (2013) para estos cálculos.

4. Métodos de campo

4.1. Técnicas diagnósticas

Se describen a continuación tres métodos diagnósticos para estimar la tasa de infestación con Varroa y que proveen resultados comparables (Branco *et al.*, 2006). En caso de que el porcentaje de infestación resultante sea menor al 2%, consultar el apartado final (otras técnicas alternativas), ya que las técnicas que se describen a continuación son efectivas cuando los porcentajes de parasitación son superiores al 2%.

4.1.1. Tasa de infestación en cría de abejas

1. Examinar 200 celdas operculadas de ambos lados de 2 cuadros con cría operculada (50 celdas por lado, por cuadro). La elección de las celdas a muestrear debe ser al azar intentando revisar celdas distribuidas en las distintas regiones del cuadro. Esto es importante, ya que el ácaro puede concentrarse en zonas de cría y en caso de muestrear una única zona del cuadro existe la posibilidad de subestimar o sobreestimar los niveles de infección. Además, muestras de celdas provenientes de diferentes cuadros considerarán la irregularidad espacial de la infestación con Varroa. El conteo puede realizarse en el apiario utilizando una mesa portátil, un porta-cuadros, una lupa de bolsillo y una linterna que ayude a explorar el interior de las celdas. **Recomendación:** cuando debido a la distancia entre el apiario y los lugares acondicionados para conteo o en momentos con altos niveles de pillaje, se puede cortar el cuadro con gradilla equivalente al área de cría. Rotular y realizar el conteo en el laboratorio.
2. Abrir cada celda y examinarlas para determinar la presencia o ausencia de Varroa. En primer lugar, debe observarse si hay Varroas adheridas a las pupas extraídas de cada celda. En segundo lugar, debe observarse con la ayuda de una lupa y luz adecuada la presencia de Varroas en el interior de la celda. Esta puede ser diagnosticada por observación directa de los ácaros o de sus heces (materia blanca y gomosa localizada la mayor parte de las veces en las paredes de las celdas cerca del fondo).
3. Contar el número de las celdas abiertas.
4. Contar el número de celdas infestadas, independiente del número de ácaros.
5. Dividir el número de celdas infestadas por el total de las celdas abiertas para obtener la proporción de celdas infestadas con Varroa.

6. Multiplicar la proporción por 100 para obtener la tasa de infestación en 100 celdas cría.

4.1.2. Tasa de infestación en abejas adultas

4.1.2.1. Muestreo

Materiales: Frascos de plástico que deberán estar correctamente rotulados identificando el número de colmena al que pertenece la muestra.

Colectar 200–300 abejas de ambos lados de al menos 3 cuadros con cría sin opercular (excepcionalmente pueden ser dos cuadros en temporadas con disminución de disponibilidad de cría). Sostener el cuadro inclinado a 10 grados aproximadamente en forma vertical. En la cara orientada hacia arriba, deslizar el recipiente de arriba hacia abajo de manera que caigan las abejas en el recipiente. Chequear previamente que no se encuentre la reina en el cuadro.

4.1.2.2. Separación de los ácaros de las abejas

4.1.2.2.1. Lavado en agua con detergente o etanol (75%)

Materiales: frascos de plástico conteniendo aproximadamente la mitad de su volumen con agua o alcohol al 95% (para su conservación).

1. Si la muestra está en etanol, filtrar y realizar un enjuague de la muestra.
2. Agregar agua con detergente para cubrir las 300 abejas.
3. Batir el frasco por 20 segundos para desprender los ácaros de las abejas.
4. Lavar el contenido del frasco utilizando un primer tamiz (abertura de 3-4 mm) para colectar las abejas y un segundo tamiz (abertura < 0,5 mm) debajo del primero para colectar los ácaros.
5. Chequear el frasco por posibles ácaros pegados en las paredes o tapa.
6. Lavar las abejas y los ácaros con una buena cantidad de agua tibia. Estandarizar fuerza y volumen del flujo de agua para el lavado y el tiempo de lavado.
7. Repetir los puntos 4 al 6 dos veces más para obtener un total de tres lavados de cada muestra. Importante: si se detecta al menos un ácaro en el tercer lavado agregar un lavado más para asegurar que no queden ácaros sin registrar.

8. Contar los ácaros colectados en el segundo tamiz en los tres o cuatro lavados y sumarlos.
9. Contar las abejas en la muestra.
10. Dividir el número de ácaros por el número de abejas en la muestra para determinar la proporción de individuos infestados.
11. Multiplicar por 100 para obtener el número de ácaros en 100 abejas.

Ventajas: bajo impacto ambiental si se usa agua, bajo costo.

Desventajas: no es práctico en apiarios lejanos ya que se necesita grandes cantidades de agua y una fuente de calor. Si se utiliza alcohol es más caro y no es amigable con el ambiente.

4.1.2.2.2. Azúcar impalpable

Materiales: frascos de boca ancha con una tapa cuyo centro esté reemplazado por una malla o tela de 2 mm.

1. Poner 300 abejas provenientes del frasco de muestreo en el frasco modificado y cerrar con la tapa.
2. Colocar 1 cucharada colmada de azúcar impalpable (por los menos 7 gramos) a través de la malla o tela de la tapa.
3. Girar y batir el frasco para cubrir todas las abejas con el azúcar.
4. Dejar reposar por un minuto
5. Dar vuelta el frasco sobre una superficie blanca de modo que los ácaros desprendidos caigan y puedan ser contabilizados.
6. Contar el número de abejas en la muestra.
7. Dividir el número de ácaros por el número de abejas y multiplicar por 100 para determinar el número de ácaros por cada 100 abejas.

Ventajas: práctico, bajo costo, no destructivo y amigable con el ambiente.

4.2. Analizando la eficiencia de las técnicas de separación de ácaros y abejas.

Es importante separar a los ácaros de todas las muestras de forma estandarizada de modo que las tasas de infestación medidas sean comparables entre muestras. Cuando el objetivo es comparar las tasas de infestación de las muestras, el cálculo de la eficiencia de lavado no es necesario. En contraste, cuando el número absoluto de ácaros es importante, la eficiencia del método de lavado debe ser evaluada para corregir posibles errores. Además, es necesario obtener los valores absolutos para comparar las cifras obtenidas con otros estudios y por lo tanto se recomienda el cálculo de la eficiencia en todos los casos. Para ello, considerar lo siguiente:

1. Realizar lavados adicionales (con el mismo u otro solvente) hasta que no se encuentren más ácaros.
2. Chequear manualmente las abejas para evaluar la presencia de ácaros luego del lavado o tratamiento con azúcar.
3. Agregar el número de ácaros encontrados luego de los lavados repetidos y la inspección manual al total de ácaros contabilizados durante el primer lavado o tratamiento con azúcar para obtener el total de ácaros en la muestra.
4. Dividir el número de ácaros del primer lavado o tratamiento con azúcar por el número total de ácaros en la muestra obtenido en el punto 3 para obtener la eficiencia del método.
5. Repetir en 5 a 10 muestras para obtener un promedio de eficiencia.
6. Dividir el número de ácaros en las muestras de interés por el promedio de eficiencia para obtener los valores corregidos.

4.3. Evaluación del tamaño poblacional total de los ácaros en la colmena.

A partir de la tasa de infestación de abejas adultas o de cría de abejas es posible estimar la tasa de infestación de toda la colmena (Martin, 1998). Sin embargo, es más preciso y se recomienda enfáticamente evaluar ambos parámetros en muestras y luego calcular el total para cada colmena de acuerdo con la estimación de la cantidad de adultos y de cría.

1. Medición de la fortaleza de la colmena en las mismas fechas en que se determina la infestación con Varroa (consulte sección 4. "Measuring colony strength at end of experiment" en Delaplane *et al.* 2013).

2. Multiplicar el número total de abejas en la colmena por la proporción de abejas adultas infestadas en la muestra analizada para obtener el tamaño de la población de Varroa en estado forético.
3. Multiplicar el número celdas de cría cerrada en la colmena por la proporción de celdas infestadas en la muestra analizada para obtener el tamaño de la población de Varroa en estado reproductivo.
4. Sumar los números obtenidos en los puntos 2 y 3 para obtener el tamaño poblacional total de los ácaros en la colmena.

Con esta información, la distribución de ácaros entre las fases forética y reproductiva se puede determinar cómo la proporción de ácaros en abejas adultas o ácaros en la cría en relación con la población total de ácaros dentro de la colmena.

4.4. Caída natural de ácaros en revisión de pisos técnicos

IMPORTANTE: Varios trabajos obtuvieron conclusiones contradictorias en relación a la precisión de la caída natural como método para determinar la tasa de infestación total dado que la caída natural es un parámetro determinado principalmente por la cantidad de cría infestada que emerge (Lobb & Martin, 1997). Por lo tanto, se recomienda su utilización como técnica complementaria o excepcionalmente cuando la cámara de cría de la colmena no puede ser examinada.

Este método está basado en la cuantificación de ácaros muertos naturalmente y aquellos eliminados por *grooming*. Las colmenas deben estar equipadas con pisos técnicos donde se recolectan los desechos. El piso debe estar protegido por una malla metálica para prevenir que las abejas remuevan los ácaros muertos. El tamaño de la malla debe permitir el paso de los ácaros (3 mm). El conteo debe ser exhaustivo (es más preciso si se realiza con una guía o lámina cuadriculada, Fig. 12).

Material: piso técnico o bandeja de plástico/melanina, lámina u hoja con patrón contenido una capa de vaselina sólida sobre el piso para asegurar la adherencia de los ácaros.

Nota: asegurarse que las colmenas sean inaccesibles para las hormigas y use (en caso de ser necesario) una lámina pegajosa para control de insectos plagas que se venden en el comercio. Se recomienda que el análisis de las muestras se realice en el laboratorio.

Procedimiento:

1. Retirar la bandeja o piso técnico debajo de la colmena.
2. Retirar la lámina pegajosa y colocar en una bolsa correctamente rotulada para identificar la colmena a la que pertenece.
3. Chequear abejas muertas (si hay en la bandeja) debido a que pueden actuar como imán para ácaros caídos vivos.
4. Adaptar la frecuencia de conteo a la tasa de caída de ácaros ya que muchos ácaros en la bandeja o piso son difíciles de contar y que el aumento de la cantidad de detritos acumulados a lo largo del tiempo hace que el conteo sea difícil. El tiempo sugerido es de 5 días.
5. Colectar datos por dos semanas y calcular el promedio para obtener la caída semanal. Este periodo cubre la variación natural en la caída de ácaros debido al ciclo de dinámica poblacional el parásito en el hospedador.

Ventajas: no es destructivo o invasivo, rápido.

Desventajas: requiere de seguimiento y es poco confiable debido a la variabilidad en la tasa de mortalidad. Requiere equipamiento específico en las colmenas y no permite comparar entre varios estudios.



Figura 12. Se coloca una guía sobre la bandeja del piso de la colmena para ayudar en el conteo y evitar conteos dobles.

4.4.1. Procedimiento de flotación.

Importante: en el caso que la cantidad de detritos no permita la detección fácil de los ácaros, pueden limpiarse y examinarse de la siguiente manera:

1. Secar desechos por 24 h.
2. Inundar con alcohol de grado industrial.
3. Revolver continuamente durante 1 minuto o hasta 10-20 minutos si los residuos contienen cera o partículas de propóleos.
4. Chequear la superficie de alcohol para detectar la presencia de los ácaros.

4.5. Otras técnicas alternativas

Excepcionalmente, el tratamiento acaricida puede ser utilizado en casos donde las colmenas tienen menos de 3.000 celdas de cría o cuando la tasa infestación en cría es menor al 2% (salvo que se tomen una gran número de muestras, consultar Pirk *et al.*, 2013) o cuando la colmena está colapsando debido a una reducción en la cantidad cría (consultar Branco *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010a).

Importante: usar acaricidas de síntesis para estimar el tamaño de la población del parásito en el hospedador es confiable utilizando productos con alta eficiencia (> 95%, considerando una posible resistencia del ácaro). Sin embargo, es un método destructivo (se mata a los ácaros y se contaminan las colmenas) y sólo puede ser utilizado para cuantificación o diagnóstico en casos o situaciones muy específicas. Otra alternativa, cuando es necesario conocer la tasa de infestación

real de una colmena es proceder a matar toda la colmena colocándola en un freezer. Para más información en relación con estas técnicas consulte Dietemann y colaboradores (2013).

4.6. Estimar parámetros de reproducción

4.6.1. Evaluación del éxito reproductivo

El éxito reproductivo de los ácaros se define como la capacidad de un ácaro madre de producir al menos una descendencia hembra apareada viable antes de que la pupa de abeja en desarrollo nazca como un adulto.

La reproducción exitosa de los ácaros requiere la maduración de al menos dos huevos puestos por una madre reproductora dentro de la celda de cría: un ácaro macho y una hermana hembra, que deben aparearse antes de la emergencia de la abeja hospedera. La descendencia de ácaros machos morirá cuando la abeja emerja de la celda, pero cualquier ácaro hija hembra madura se unirá a la población de ácaros de la colonia junto con su madre para encontrar una nueva celda de cría para la reproducción. Un ácaro madre que 1) no pone huevos, 2) pone un solo huevo, 3) no produce descendencia masculina o 4) comienza a poner huevos demasiado tarde en relación con el desarrollo larvario, no contribuirá con ninguna progenie a la población de ácaros. La fecundidad (número de huevos puestos) es un parámetro adicional que puede determinar la variación en el número de hembras viables que cada ácaro madre contribuye a la población. La fecundidad no necesariamente contribuye a la capacidad del ácaro para reproducirse con éxito. En cambio, representa solo el número de huevos puestos sin tener en cuenta la edad de la descendencia o la probabilidad de que alcancen la madurez. Por lo tanto, la fecundidad puede no ser independiente de la incidencia de la demora en la puesta de huevos, ya que cualquier ácaro que comience a poner huevos tarde puede poner menos huevos. Por lo tanto, se requiere información sobre los siguientes parámetros para evaluar la reproducción exitosa: la fertilidad (si el ácaro madre puso huevos); la presencia o ausencia de descendencia masculina; la proporción de descendencia muerta; y la incidencia de retraso en la puesta de huevos por los ácaros madre, identificado al relacionar la etapa de desarrollo de la descendencia de los ácaros con la apariencia del desarrollo y, por lo tanto, la edad determinada de la pupa infestada (consulte sección 2.5 “*Obtaining brood and adults of known age*” en Human *et al.*, 2013). Estos datos son importantes ya que las diferencias relativamente pequeñas en los factores reproductivos pueden tener un gran efecto en la dinámica de la población a nivel de población (Martin & Medina, 2004).

4.6.2. Cuándo medir el éxito reproductivo

La evaluación más precisa del éxito reproductivo de los ácaros se puede obtener justo antes de la emergencia de la obrera. Sin embargo, las horas previas a la emergencia no son óptimas ya que la última etapa del desarrollo de las abejas dificulta el reconocimiento de los ácaros. Por lo tanto, se recomienda evaluar este parámetro a más tardar un día antes de la emergencia y proyectar el desarrollo de la descendencia de Varroa comparando la etapa de desarrollo de las pupas con la etapa de desarrollo de la descendencia de los ácaros. Si se requieren comparaciones directas entre estudios para varios rasgos reproductivos, entonces los datos deben recopilarse durante el mismo período de tiempo. Es decir, la fecundidad no se puede medir con precisión hasta 220 horas después del operculado de celdas de obreras y 240 horas en celdas de zánganos, ya que es solo después de este período que puede poner todos los huevos potenciales. Solo es posible determinar varios patrones reproductivos anormales 60 horas después del límite. La Tabla 2 muestra el tiempo después del límite para el cual se pueden medir con precisión varios rasgos relacionados con el éxito reproductivo. Para obtener una gran cantidad de crías de edad relevante en las que se pueda evaluar el éxito reproductivo del ácaro, enjaule a la reina de una colonia altamente infestada en un marco vacío durante varias horas en el momento apropiado antes de la medición.

Ventajas: los ácaros son fácilmente reconocibles en las pupas.

Desventajas: un inconveniente es que el macho o las hijas podrían morir antes de la emergencia de la abeja y ser contados como parte del éxito reproductivo; la determinación de la edad de la pupa basada en la apariencia es aproximada.

4.6.3. Cómo medir el éxito reproductivo

El éxito reproductivo de un ácaro se evalúa reconstruyendo la familia de ácaros en celdas infestadas (Martin, 1994, 1995a). Consulte sección 4.6.2. "Cuándo medir el éxito reproductivo" para determinar el momento óptimo cuando se mide este parámetro. Es importante examinar las celdas infestadas por un ácaro madre en lugar de las celdas infestadas múltiples, ya que las infestaciones múltiples agregan un efecto adicional sobre el éxito de la reproducción de los ácaros. Si solo se reproduce un ácaro 'madre' puede ser difícil determinar en celdas con múltiples ácaros maduros (pigmentados), pero el uso de la guía de desarrollo de ácaros (Figs. 10 y 11) indicará lo que se espera y dará una buena idea del número de ácaros madre presentes. Para el análisis estadístico, se deben examinar al menos 30 celdas infestadas de ácaros individuales por colonia. Se pueden medir diferentes aspectos de la reproducción de los ácaros. Dentro de cada celda se puede recopilar la siguiente información: sexo, etapa de desarrollo y vitalidad. Los ácaros vivos o muertos se identifican fácilmente si se utiliza material fresco. Si se utiliza material congelado, se debe confiar en la apariencia de los ácaros. Una apariencia anormal deshidratada o arrugada significa que estaba muerta antes de la congelación. Esta característica también se puede utilizar para distinguir a un individuo muerto de un individuo en una etapa de desarrollo inmóvil en muestras vivas. Además, la tasa de mortalidad se puede estimar indirectamente comparando las etapas de desarrollo obtenidas con la referencia: el desarrollo de cualquier individuo muerto se detiene prematuramente y, por lo tanto, se puede identificar con la ayuda de las Figs. 10 y 11.

1. Con unas pinzas, abrir cuidadosamente cada celda operculada retirando su parte superior, y empuje las paredes de la celda.
2. Retirar la pupa de la celda. Esto se hace mejor deslizando las pinzas a cada lado del cuello entre la cabeza y el tórax y levantando suavemente. Al sacar la pupa de la celda, colóquela en un portaobjetos de microscopio al lado de la celda para evitar que los ácaros caigan en el panal.
3. Registrar su etapa de desarrollo en función de la descripción de la apariencia dada en la Fig. 11. Es importante examinar las pupas bajo un microscopio estereoscópico una vez que se retira de la celda para asegurarse de que la progenie de ácaros no se descarte con las pupas. Las paredes de las celdas también deben inspeccionarse meticulosamente para detectar ácaros y exuvias. El uso de una fuente de luz de fibra óptica es particularmente adecuado para dirigir el haz hacia el fondo de la celda e inspeccionarla después de la eliminación de la pupa.

4. Retirar las familias completas de ácaros junto con las exuvias y pupas de sus celdas con un cepillo fino.
5. Examinar bajo un microscopio estereoscópico.
6. Clasificar a toda la descendencia femenina en grupos de acuerdo a la etapa de desarrollo usando las Figs. 10 y 11 como guía. Las protoninfas se pueden distinguir de las deutoninfas jóvenes de aspecto similar por la cantidad de pelos en la región intercoxal (entre el cuarto par de patas en el lado ventral). Las protoninfas masculinas y femeninas tienen 3 y 4 pares de pelos, respectivamente, mientras que las deutoninfas tienen 56 pares (ver dibujos pp. 55-57 en Fernández & Coineau, 2007).

Esta información permite que la familia de los ácaros se reconstruya en orden de nacimiento o para verificar la infestación múltiple y la normalidad del desarrollo. Las protoninfas generalmente no son sexuadas, pero el número de pelos en la región intercoxal y el patrón de pelos irregular en el dorso de los machos en comparación con el patrón homogéneo y denso de las hembras proporcionan rasgos de reconocimiento (Fernández & Coineau, 2007). Para el número de huevos puestos por los ácaros y para permitir una comparación más precisa entre los estadios, sólo se comparan los ácaros que pusieron dos o más huevos. Los ácaros que no producen huevos (no reproductivos) o un huevo (único macho) se consideran categorías reproductivas distintas (ver b y c a continuación). La mortalidad de la descendencia del ácaro en las celdas de obreras y de zánganos se calcula comparando el número de descendientes vivos y muertos en cada posición en el orden de nacimiento, es decir, la primera descendencia, la segunda descendencia, etc. Luego, el número promedio de hembras sobrevivientes (no fertilizadas y fertilizadas) se calcula utilizando solo los niveles de mortalidad de descendencia.

7. Todas las celdas infestadas se analizan colocando los ácaros madre en una de las siguientes seis categorías:

- a) Madre muerta
- b) Madre (viva), sin descendencia
- c) Madre más solo descendencia masculina
- d) Madre más descendencia masculina (vivo) y femenina madura, por lo que se supone que hubo apareamiento.
- e) Madre más descendencia femenina (viva) y descendencia masculina muerta. Esta descendencia femenina podría permanecer sin fertilizar ya que el macho podría haber muerto antes de aparearse (Harris & Harbo,

1999). La disección de la espermateca y el examen microscópico de su contenido pueden ayudar a determinar su estado de apareamiento (ver Steiner *et al.*, 1994 para obtener imágenes del tracto reproductivo con espermateca).

f) Madre sin descendencia femenina (viva). Cuando trabaje con material congelado, tenga cuidado con los ciclos repetidos de congelación y descongelación ya que esto daña las muestras. Solo retire del congelador la cantidad de material que se puede tratar en un momento dado.

Ventajas: si se recopila este tipo de datos, se puede comparar con estudios previos (por ejemplo, Martin, 1994, 1995a, b; Medina & Martin, 1999; Martin & Kryger, 2002), donde se obtuvieron los mismos datos para los parámetros reproductivos de los ácaros utilizando exactamente las mismas metodologías.

Desventajas: tedioso, lento.

4.6.4. Evaluar la ovogénesis

Para estimar la ovogénesis en los ácaros, consulte la sección sobre métodos de marcado 3.4.1. "Ovogénesis".

4.7. Estimación de umbrales de daño

Esta sección describe los métodos utilizados para medir el daño de Varroa a nivel de colonia y asociar ese daño con umbrales de daño económico.

Uno de los objetivos del Manejo Integrado de Plagas (*Integrated Pest Management- IPM*) es la reducción de la dependencia de los apicultores de los pesticidas en la colmena. La erradicación de los ácaros no es un objetivo necesario, ya que la filosofía de IPM reconoce que la erradicación puede requerir prácticas que son excesivamente tóxicas, invasivas o poco prácticas. Varroa IPM otorga una recompensa a las prácticas de manejo no químico que eliminan los ácaros de una colonia (como la captura de varroas en crías de zánganos) o ralentizan la tasa de crecimiento de la población de ácaros (como la resistencia genética del hospedero). Las prácticas de IPM de Varroa más prometedoras han sido revisadas por Rosenkranz y colaboradores (2010). Desafortunadamente, se ha demostrado de manera anecdótica, así como en simulaciones por computadora (Hoopingarner, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001) que pocas o ninguna de estas prácticas pueden mantener por sí mismos o indefinidamente a los ácaros en niveles no dañinos. Por lo tanto, en este punto parece mejor pensar

en IPM como un medio para retrasar, no necesariamente eliminar, la aplicación de acaricidas (Delaplane, 2011). Se obtienen muchos beneficios si el tiempo entre los tratamientos químicos se retrasa, a saber, la reducción de la liberación de sustancias tóxicas a las abejas y al medio ambiente, la reducción de los residuos químicos en la miel, disminución de la presión de selección para la resistencia química y la conservación de alelos susceptibles en la población de ácaros que prolongan la vida comercial de los acaricidas.

Dado que el enfoque de IPM no es la erradicación de los ácaros, sino más bien el manejo de los ácaros, todo el sistema depende de la existencia de criterios que pueden distinguir las densidades de ácaros que son tolerables de aquellos que se acercan a niveles perjudiciales. Los principios clásicos de IPM (Luckmann & Metcalf, 1982) identifican el nivel de daño económico (*Economic Injury Level-EIL*) como esa densidad de plagas en cuyo punto el productor está experimentando pérdidas económicas. El objetivo es evitar que ocurra este nivel, en otras palabras, identificar una densidad de plagas más temprana y más baja en cuyo punto un tratamiento podría evitar alcanzar el EIL. Esta menor densidad de plagas se denomina de manera diversa umbral económico, umbral de tratamiento, umbral de acción o umbral de daño. El uso de umbrales de daño está implícito en el reconocimiento de que algunos niveles de plagas son tolerables y no garantizan el uso de un pesticida. Un buen umbral de daño no solo distinguirá las densidades de plagas dañinas de las no dañinas, sino que también acomodará variaciones locales debido a la geografía y la biología del hospedero y el parásito.

Los umbrales son simplemente una forma aplicada de modelado de población y, como cualquier modelo, son tan buenos como los datos, los detalles y la especificidad aplicados en su construcción.

4.7.1. Cómo estimar umbrales de daño

Las siguientes instrucciones son una síntesis de los umbrales de daño derivados de estudios de campo de Delaplane y Hood (1997, 1999) y Delaplane y colaboradores (2010) para el sureste de EE. UU., Strange y Sheppard (2001) para el noroeste de EE. UU., y Currie y Gatien (2006) para Manitoba, Canadá. Todos estos estudios utilizaron un diseño en el que se establecen experimentalmente colonias de fortaleza y densidad de ácaros uniformes, se realizan aplicaciones de acaricida en diferentes momentos para crear una historia de propagación de los ácaros y el estado de las colonias y se toman muestras regularmente para documentar los niveles de ácaros y el estado de las colonias. En algunos, los controles negativos están presentes como colonias que

nunca se tratan, y los controles positivos están presentes como colonias que se tratan continuamente. Por lo tanto, existe un rango de densidades de ácaros a través del experimento en el espacio y el tiempo, y cada colonia tiene un historial de niveles conocidos de ácaros y fortaleza de la colonia en el momento en que fue tratada.

4.7.1.1. *Establecimiento de colonias*

1. Igualar las colonias de campo con respecto a la población de abejas, la cría, los recursos alimenticios y ácaros dentro de las unidades de replicación experimental de orden superior, es decir, bloques o parcelas completas, generalmente basadas en la geografía (consultar sección 3. “*Setting up experimental colonies of uniform strength*” en Delaplane *et al.*, 2013). Se deben utilizar al menos dos colonias de origen más que el número objetivo de colonias experimentales para dar cuenta de la pérdida de abejas por muerte o enjambrazón. En caso de trabajar con abejas africanizadas, es aconsejable aumentar este número.
2. Recoger las abejas adultas y los ácaros foréticos para la configuración experimental sacudiendo a las obreras provenientes de una diversidad de colonias en una gran jaula común, permitiendo que las obreras (y los ácaros) se mezclen libremente (Harbo, 1993) (Fig. 13).
3. Mantener la jaula en condiciones frescas para evitar la muerte de las abejas por sobrecalentamiento durante al menos 24 horas para permitir una mezcla completa de abejas y ácaros, lo que da como resultado una mezcla uniformemente heterogénea.
4. Distribuir las cohortes de obreras de igual tamaño (preferiblemente en peso, aproximadamente 1 Kg) en colmenas previamente abastecidas con cantidades casi iguales de cría, miel, polen y celdas vacías (Fig. 14).
5. Proporcionar a cada colonia una reina hermana criada de la misma madre y fecundada en la misma vecindad para minimizar la variación debido a la genética de las abejas.
6. Recoger una sub-muestra de aproximadamente 300 abejas obreras de cada incipiente colonia.
7. Pesar las muestras.
8. Contar el número de abejas para obtener una medida específica de colonias del peso promedio de las abejas frescas (mg).

9. Dividir el tamaño inicial de la cohorte (Kg) entre el peso fresco promedio de los individuos (mg) para obtener la población inicial de abejas.
10. Recolectar una muestra de aproximadamente 300 abejas obreras (pueden ser de la misma muestra que la anterior después de pesarlas frescas) para obtener una medida de la densidad inicial de los ácaros foréticos.
11. Separar los ácaros de las abejas. Consulte la sección 4.1.2. "Tasa de infestación en abejas adultas" (Fig. 15).
12. Contar el número de abejas y el número de ácaros para obtener una medida específica de colonias de densidad de ácaros/abejas.
13. Multiplicar este número por la población inicial de abejas para obtener la población de ácaros foréticos.
14. Conservar las muestras en alcohol para referencia futura.



Figura 13. Las abejas adultas con sus ácaros foréticos provenientes de varias colmenas son mezcladas para homogeneizar el nivel de infestación inicial en las réplicas.

15. Recolectar crías para colonias experimentales incipientes de las mismas colonias de origen utilizadas para recolectar adultos.
16. Asignar una cantidad casi igual de cría a las colonias experimentales sin tener en cuenta la fuente (consulte la sección 3. "Setting up experimental colonies of uniform strength" en Delaplane *et al.*, 2013).
17. Medir la cantidad inicial de cría operculada para calcular la población inicial de ácaros de las colonias. Esto se realiza superponiendo a cada lado de cada panal de cría una cuadrícula marcada previamente en cm^2 y sumando visualmente el área de cría operculada (Fig. 16).



Figura 14. Las cámaras son equipadas con cantidades similares de cría, miel, polen y celdas vacías para hospedar a las colonias experimentales.

18. Convertir el área (cm^2) de cría operculada en celdas de cría operculada multiplicando cm^2 por la densidad de celdas promedio por cm^2 (consulte sección 3. "Setting up experimental colonies of uniform strength" en Delaplane *et al.*, 2013). La densidad de celdas por cm^2 varía según la geografía; en el sureste de los EE. UU se utilizan factores de conversión entre 3.7 y 3.9 (Delaplane & Harbo, 1987; Harbo, 1993). Este valor debe verificarse con el linaje de las abejas melíferas utilizado para el experimento.
19. Medir la población inicial de ácaros en la cría abriendo al menos 200 celdas de cría operculada por colonia experimental y examinando bajo luz intensa y aumento para ver y contar los ácaros esclerotizados (consulte sección 4.1.1. "Tasa de infestación en cría de abejas").

20. Multiplicar la densidad de ácaros / celdas por celdas de cría operculada para obtener la población de ácaros en las celdas.
21. Sumar los ácaros foréticos + ácaros en las celdas para obtener la población total inicial de ácaros.
22. Tomar medidas correctivas si las medidas iniciales exponen valores atípicos en poblaciones iniciales de abejas, crías o ácaros. En general, las correcciones destinadas a minimizar el error experimental son permisibles hasta el punto en que se inician los tratamientos.
23. Una vez que se establecen colonias y se liberan reinas y se confirma la puesta, se recomienda recolectar una o más medidas relativas iniciales de ácaros. Las medidas relativas más comúnmente reconocidas son los ácaros recuperados por 24 h en las láminas del piso técnico (consulte sección 4.4. "Caída Natural de ácaros en revisión de pisos técnicos") y los ácaros por abeja adulta recuperados de las muestras (como se describe en la sección 4.1.2. "Tasa de infestación en abejas adultas"). Es de esperar que estas medidas relativas se correspondan estrechamente a las poblaciones reales de ácaros de las colonias, y se alienta al investigador a verificar la validez de las medidas relativas con análisis de regresión contra la población total de ácaros.
24. El mantenimiento de la colonia debe incluir el control de enfermedades y trastornos, la prevención de enjambres y la alimentación, según sea necesario. El objetivo de estas manipulaciones es disminuir el error residual experimental.

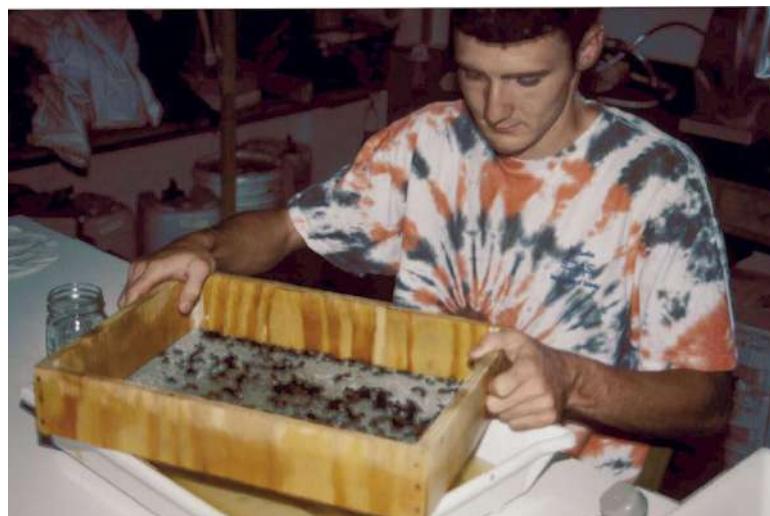


Figura 15. El número de abejas y ácaros son contabilizados para obtener una medida de la densidad inicial de ácaros foréticos.

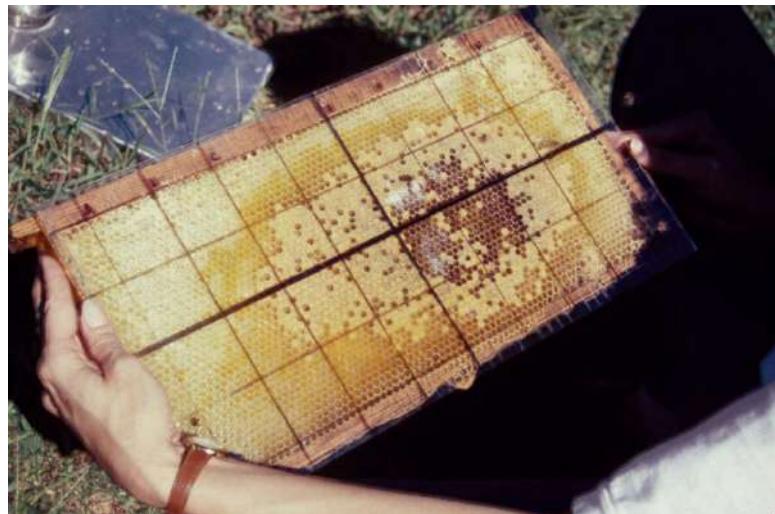


Figura 16. Medición de la cantidad inicial de cría operculada.

4.7.1.2 Tratamientos experimentales, tamaño de muestra y disposición de colonias

1. Crear un rango de densidades de colonias de Varroa tratando grupos de colonias con acaricida en diferentes puntos de una temporada, agrupando lo más ampliamente posible los meses de actividad de las abejas específicos de la región. Por lo menos, un tratamiento debe ser temprano en la temporada cuando las abejas están emergiendo de la senescencia de invierno; un tratamiento debe estar en el pico de la temporada activa, y otro debe ocurrir en otoño, que suele ser el período de mayor proporción de ácaros: abejas. Más intervalos mejorarán la resolución del modelo resultante. Es imperativo que el diseño incluya un control negativo (un conjunto de colonias sin tratar), y se recomienda encarecidamente que el diseño incluya un control positivo, un conjunto de colonias tratadas continuamente. La inclusión de ambos controles proporcionará la gama más amplia posible de densidades de Varroa dentro de las cuales el investigador puede buscar retrospectivamente densidades de ácaros que sean dañinas o no dañinas.

2. Utilizar un tamaño de muestra promedio (número inicial de colonias por tratamiento) de 11. La literatura indica un rango 7- 20. Los estudios que usan tamaños de muestra dentro de este rango nunca fallaron en detectar los efectos del tratamiento para al menos algunas variables dependientes.

3. Utilizar un acaricida de confianza. Esto evita el riesgo de error de confusión experimental debido a la variación en la eficacia del acaricida o los efectos subletales desconocidos en las abejas (los investigadores a veces incluyen

diferentes acaricidas en sus tratamientos, aparentemente con el fin de ajustar las recomendaciones de control para su región).

4. Tener en cuenta la resistencia de los ácaros a los acaricidas al elegir el tratamiento. Se puede evaluar si la población es resistente a un producto en particular siguiendo el método descrito en la sección 3.6.3. "Bioensayos para cuantificar la susceptibilidad de la Varroa a los acaricidas".

5. Controlar o al menos monitorear la disposición espacial de la colonia. Los ácaros Varroa pueden propagarse horizontalmente a través de las obreras infestadas y zánganos que se desplazan entre las colonias (Greatti *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 2011) ejerciendo una fuerte influencia en los resultados. Dependiendo de los objetivos, uno puede configurar apiarios para estimular la deriva (asignar tratamientos dentro del mismo apiario) o reducir la deriva (asignar tratamientos por apiario). El primer escenario reconoce que la re-infestación puede confundir los resultados, sin embargo, esta condición se presume más "real" porque la apicultura moderna a menudo fomenta la transmisión horizontal de ácaros con alta densidad de colmenas. Sin embargo, esta opción no es relevante si los tratamientos se realizan con ingredientes activos persistentes que se distribuyen por contacto entre las abejas (por ejemplo, fluvalinato). El segundo escenario, por el contrario, ofrece una descripción más ordenada de los efectos del tratamiento tardío. La inclusión de ambas condiciones permite probar el supuesto de que los umbrales ocurren antes en condiciones de re-infestación altas de ácaros. En cualquier caso, se recomienda que el objetivo sea explícito y la disposición espacial diseñada en consecuencia: 1. Si se va a minimizar la re-infestación, asigne a todas las colonias dentro de un colmenar el mismo tratamiento y colmenas espaciales lo más separadas posible, o 2. Si la re-infestación debe ser maximizada asignar todos los tratamientos dentro del mismo apiario. Otras prácticas de reducción de la deriva, como pintar símbolos en las entradas de la colmena u organizar colonias en círculos, no sustituirán a grandes distancias espaciales entre colonias de diferentes tratamientos.

4.7.1.3 Variables dependientes y protocolos de muestreo

Se mide una variedad de parámetros que se relacionan con los umbrales de daño de las colonias que contienen diferentes tamaños de población de parásitos (Tabla 4). Para algunas de las medidas más invasivas, es decir, las medidas tomadas sobre las abejas o la cría (Tabla 4), es común durante los intervalos de muestreo a mitad del experimento tomar muestras de solo un subconjunto de colonias en cada tratamiento. Estos números han oscilado entre 3 (Delaplane & Hood, 1999) a 4 (Delaplane & Hood, 1997) a 2 (Strange & Sheppard, 2001). Es

importante recordar que estas medidas experimentales no se realizan en busca de diferencias estadísticas, *per se*, sino para proporcionar una retrospectiva instantánea de la condición de la colonia en el momento del tratamiento o cuando se alcanzó el umbral. También aumentarán ligeramente dentro de la variabilidad del grupo de los parámetros medidos. Todas las colonias se desmantelan y se miden completamente al final del estudio, cuando es deseable el rigor estadístico para identificar los regímenes de tratamiento que optimizan la condición de la colonia.

1. Colocar las láminas debajo de una malla de alambre y colóquelas debajo de la colmena (consulte la sección 4.4. “Caída Natural de ácaros en revisión de pisos técnicos”).
2. Retirar la hoja después de 24-48 h.
3. Contar el número de ácaros y ajuste el número a los ácaros recuperados en 24 h.
4. Recolectar muestras de 300-900 abejas adultas.
5. Contar la cantidad de ácaros y la cantidad de abejas (consulte sección 4.1.2. “Tasa de infestación en abejas adultas”).
6. Informar los datos como ácaros / 100 abejas.
7. Derivar el peso de la abeja fresca (mg) tomando muestras de las abejas vivas del panal en frascos pre-pesados o tarados, pesando el frasco, restando el peso del mismo para obtener el peso neto de la abeja, contando las abejas y dividiendo por el peso neto de la abeja para obtener mg por abeja. Este muestreo se puede combinar con el muestreo de ácaros por abeja adulta como se describió anteriormente.
8. Obtener la población final de abejas de la colonia de acuerdo con los métodos descritos en la sección 4. “*Measuring colony strength at end of experiment*” en Delaplane *et al.*, 2013), o una variación de este método usando el peso neto de la abeja de la colonia (Kg) y el peso promedio de la abeja fresca (mg):
 - 8.1. Obtener el peso neto de las abejas de la colonia cerrando primero la entrada de la piquera con una malla ventilada por la tarde o temprano en la mañana antes de tomar muestras para atrapar a todas las abejas dentro.
 - 8.2. Pesar toda la colmena en el campo (Fig. 17).
 - 8.3. Abrir la colmena.

- 8.4. Cepillar todas las abejas de cada superficie del panal (use una colmena temporal).
- 8.5. Pesar nuevamente la colmena sin abejas.
- 8.6. Calcular la diferencia de peso, que es el peso neto de las abejas.
- 8.7. Dividir este número entre el peso de la abeja fresca para obtener la población de abejas de la colonia.
9. Contar el número de celdas de cría operculada como se describe en la sección 4.7.1.1., Pasos 17 y 18.
10. La población de ácaros de cada colonia se deriva de los métodos descritos en la sección 4.7.1.1. Una vez que el investigador conoce la población final de abejas, los ácaros foréticos por abeja, el número de celdas de cría operculada y los ácaros por celda de cría operculada, entonces se puede extraer a (población de ácaros foréticos + población de ácaros en cría) = población total de ácaros por colonia.
11. Cuantificar los trastornos de cría visibles. Los trastornos de la cría a veces se asocian con parasitismo de Varroa (Shimanuki *et al.*, 1994) y pueden contribuir al daño de la colonia.
 - 11.1 Seleccionar dos áreas de cría relativamente contiguos en estadios tardíos operculados (estadios con mayor probabilidad de expresar síntomas visibles).
 - 11.2 Superponer en cada área una transecta horizontal de 10 cm y una transecta vertical de 10 cm que se cruzan en el centro (Fig. 18).
 - 11.3 Examinar a lo largo de cada transecta cada celda de cría bajo luz intensa y aumento para detectar trastornos visibles, es decir, síntomas típicos de la Loque americana (De Graaf *et al.*, 2013), Loque europea (Forsgren *et al.*, 2013), Cría ensacada (De Miranda *et al.*, 2013), o Cría yesificada (Jensen *et al.*, 2013).
 - 11.4 Informar el parámetro como porcentaje de cría que expresa trastornos visibles.
12. Cuando se necesita considerar el rendimiento de miel como un parámetro del umbral económico, calcular el rendimiento de la colonia (Kg.) al pesar las alzas melarias antes y después de colocarlos en las colonias durante un flujo de néctar.
13. Medir la tasa de infestación por *Acarapis woodi* en las colonias. Esta tasa podría verse afectada por la presencia de Varroa y su medida podría ser necesaria como económicamente relevante. Para esta muestra, recolecte 50

obreras por colonia y colóquelas en alcohol. Consultar sobre los ácaros traqueales en Sammataro y colaboradores (2013) para conocer el método para detectar la presencia de estos ácaros.



Figura 17. Toda la colmena es pesada en el campo para obtener la población de abeja adulta final.

Tabla 4. Variables dependientes y protocolos de muestreo recomendados y empleados en la literatura sobre umbrales de daño derivados de campo. Teniendo en cuenta la diversidad de acaricidas utilizados en los distintos países y la existencia de poblaciones de Varroa resistentes, esta tabla se modificó generalizando a “acaricida sintético” en sustitución del fluvalinato y cumafós, cuyos acaricidas son los sugeridos en el texto original y referenciados (Delaplane y Hood (1997); Delaplane & Hood (1999); Delaplane *et al.* (2010); Strange & Sheppard (2001); Currie & Gatien (2006)). Se sugiere utilizar aquellos acaricidas más efectivos en cada región. * acaricida sintético el primer año y timol en el segundo año; **tratamiento orgánico más utilizado según la región: ácido fórmico aplicado durante 4 días, ácido oxálico en jarabe o en tiras de liberación lenta.

Tratamientos experimentales	Variables dependientes medidas en cada grupo de tratamiento	Intervalos de muestreo
1. acaricida temprano en la temporada 2. acaricida en la temporada alta 3. acaricida al final de la temporada 4. colonias no tratadas (control negativo) 5. acaricida tratamiento continuo (control positivo)	1. cantidad de ácaros / 24 h en pisos técnicos 2. ácaros / 300 abejas 3. peso de la abeja fresca (mg) 4. población de abejas 5. número de celdas de cría operculada 6. poblaciones de ácaros 7. trastornos de cría visibles y otras enfermedades 8. rendimiento de miel (Kg) 9. calificación subjetiva de "supervivencia" al comienzo de la temporada del siguiente año	en intervalos regulares durante el año y a mitad de la temporada

Tratamientos experimentales	Variables dependientes medidas en cada grupo de tratamiento	Intervalos de muestreo
<p>1. Acaricida sintético a principio de verano (diciembre en el hemisferio sur - junio en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región)</p> <p>2. Acaricida sintético en verano (febrero en el hemisferio sur - agosto en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región)</p> <p>3. Acaricida sintético en otoño (abril en el hemisferio sur - octubre en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región)</p> <p>4. sin tratamiento</p>	<p>1. cantidad de ácaros / 18 h en pisos técnicos</p> <p>2. ácaros / 300 abejas</p> <p>3. peso de la abeja fresca (mg)</p> <p>4. población de abejas</p> <p>5. número de celdas de cría operculada</p> <p>6. poblaciones de ácaros</p> <p>7. trastornos de cría visibles (solo en diciembre)</p>	<p>Principio de verano, pleno verano, otoño e invierno</p>

Tratamientos experimentales	Variables dependientes medidas en cada grupo de tratamiento	Intervalos de muestreo
<p>1. acaricida sintético en pleno invierno (agosto en el hemisferio sur - febrero en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región)</p> <p>2. acaricida sintético en pleno verano (febrero en el hemisferio sur - agosto en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p> <p>3. acaricida sintético en invierno y verano (o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p> <p>4. acaricida sintético aplicado de forma continua durante todo el año</p> <p>5. sin tratamiento</p>	<p>1. ácaros / 20 h en pisos técnicos</p> <p>2. ácaros / 300 abejas</p> <p>3. peso de la abeja fresca (mg)</p> <p>4. población de abejas</p> <p>5. número de celdas de cría operculada</p> <p>6. poblaciones de ácaros</p> <p>7. trastornos de cría visibles (estimado en otoño (abril-mayo en el hemisferio sur o setiembre-octubre en el hemisferio norte).</p> <p>8. calificación subjetiva de "supervivencia" (sólo en invierno, julio en el hemisferio sur y enero en el hemisferio norte).</p>	<p>Agosto, noviembre, febrero, marzo-abril en el hemisferio sur o febrero, mayo, agosto, septiembre-octubre en el hemisferio norte.</p>

Tratamientos experimentales	Variables dependientes medidas en cada grupo de tratamiento	Intervalos de muestreo
<p>1. tratamiento continuo* a partir de fines de primavera-principios de verano (diciembre en el hemisferio sur y junio en el hemisferio norte).</p> <p>2. tratamiento* en verano (febrero en el hemisferio sur y agosto en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p> <p>3. tratamiento* en otoño (abril en el hemisferio sur y octubre en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p>	<p>1. ácaros / 100 abejas</p> <p>2. peso de la abeja fresca (mg) (sólo a fines de primavera-principios de verano)</p> <p>3. población de abejas</p> <p>4. peso de la colonia (Kg) (sólo a fines de otoño-principios de invierno: junio en el hemisferio sur y diciembre en el hemisferio norte)</p> <p>5. cm² de cría (todos los estadios)</p> <p>6. poblaciones de ácaros</p> <p>7. % de abejas infectadas con <i>Acarapis woodi</i> (solo en diciembre solo a fines de otoño-principios de invierno: junio en el hemisferio sur y diciembre en el hemisferio norte)</p>	<p>Febrero, abril y junio en el hemisferio sur o agosto, octubre y diciembre en el hemisferio norte.</p>
Tratamientos experimentales	Variables dependientes medidas en cada grupo de tratamiento	Intervalos de muestreo

1. tratamiento sintético en primavera (octubre en el hemisferio sur, abril en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).
2. tratamiento sintético en verano (febrero en el hemisferio sur, agosto en el hemisferio norte, o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).
3. tratamiento sintético en otoño (abril en el hemisferio sur, octubre en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).
4. tratamiento sintético en primavera y otoño (octubre y abril en el hemisferio sur o abril y octubre en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).
5. tratamiento sintético continuo
6. sin tratamiento
7. tratamiento sintético en primavera (octubre en el hemisferio sur, abril en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).

1. ácaros / 20 h en hojas adhesivas
2. ácaros / 300 abejas
3. peso de la abeja fresca (mg)
4. población de abejas
5. número de celdas de cría operculada
6. poblaciones de ácaros

Diciembre, febrero, abril, mayo y octubre en el hemisferio sur o en junio, agosto, octubre, noviembre y abril en el hemisferio norte.

Tratamientos experimentales	Variables dependientes medidas en cada grupo de tratamiento	Intervalos de muestreo
<p>1. Tratamiento sintético a fines de la primavera (noviembre en el hemisferio sur y mayo en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p> <p>2. Tratamiento sintético a principios del otoño (marzo en el hemisferio sur, setiembre en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p> <p>3. Tratamiento orgánico* a partir de primavera (noviembre en el hemisferio sur o mayo en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p> <p>4. Tratamiento orgánico* a partir de otoño (marzo en el hemisferio sur o setiembre en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial).</p> <p>5. Tratamiento orgánico* a partir de primavera (noviembre en el hemisferio sur o mayo en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial).</p> <p>6. Tratamiento sintético a fines de primavera (noviembre en el hemisferio sur y mayo en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p> <p>7. Tratamiento sintético a principios de otoño (marzo en el hemisferio sur y setiembre en el hemisferio norte o el equivalente en términos de desarrollo colonial y productivo según la región).</p> <p>8. sin tratamiento</p>	<p>1. ácaros por abeja</p> <p>2. rendimiento de miel (kg) (solo a fines de la temporada productiva)</p>	<p>En el pretratamiento (primavera y otoño), luego en el postratamiento semanalmente durante 3 semanas en la primavera y a continuación cada dos semanas.</p>



Figura 18. Selección e inspección de celdas de cría para detección de enfermedades

4.5.1.4 Análisis, interpretación y dificultades

Los diseños presentados en esta sección se prestan a un análisis directo de la varianza para probar el efecto de la fecha del tratamiento en los parámetros de fortaleza de la colonia al final del estudio (Tabla 4). Dependiendo de la presencia de réplicas de orden superior, como bloques, el investigador debe estar alerta a las interacciones entre los tratamientos y el factor de bloque que, si está presente, determinan que el investigador pruebe los principales tratamientos por separado. El número de colonias supervivientes al final del estudio (n) puede diferir entre los tratamientos, por lo que puede ser necesario acomodar tamaños de muestra desiguales mediante el uso de transformación de medias armónicas o medias. Las medias de tratamiento se separan ($\alpha \leq 0.05$) mediante una prueba convencional como Tukey's o t-Student- Newman- Keuls. Si el investigador adquirió poblaciones enteras de ácaros (consulte el paso 10 de la sección 4.7.1.3 junto con medidas relativas más amigables para el usuario, como el conteo de Varroa (consulte sección 4.4 “Caída Natural de ácaros en revisión de pisos técnicos”) y ácaros por 100 abejas (consulte sección 4.1.2. “Tasa de infestación en abejas adultas”), entonces es deseable probar el rigor de las medidas relativas para predecir poblaciones reales de ácaros mediante el uso de análisis de regresión que prueban términos lineales, cuadráticos y cúbicos.

Este análisis permitirá al investigador comparar el estado de la colonia al final de la temporada en los diferentes regímenes de tratamiento (tiempos de aplicación de acaricidas). El umbral de daño se determina retrospectivamente como la densidad media más alta de ácaros al momento del tratamiento asociado con la condición de la colonia significativamente diferente de los controles positivos al

final de la temporada. En un ejemplo real, el umbral se definió como las condiciones que prevalecieron cuando las colonias fueron tratadas de forma puntual en plena temporada productiva, ya que esas colonias presentaron un desempeño similar en comparación a las colonias tratadas de forma continua (Delaplane & Hood, 1999). Los muestreos de mitad de temporada permiten al investigador describir las poblaciones de ácaros, las medidas relativas de ácaros fáciles de usar y los parámetros de fortaleza de las colonias que prevalecieron en los umbrales de tiempo alcanzados. La densidad de ácaros retrospectiva más alta, en lugar de la más baja, se usa debido al énfasis conservador de IPM en prolongar el intervalo entre tratamientos el mayor tiempo posible. Una tolerancia baja o nula a las plagas es rara, innecesaria en el sistema de IPM Varroa / *Apis mellifera*, y se asocia más comúnmente con sistemas de cultivo para los cuales el daño estético inducido por plagas es un problema para los consumidores.

Este análisis también identificará las densidades de ácaros que son irremediablemente perjudiciales, en otras palabras, las densidades de ácaros en cuyo momento el tratamiento no previene el deterioro comparativo de colonias al final del estudio. En otro ejemplo real, se demostró que las densidades de ácaros que prevalecieron al finalizar la temporada productiva excedieron un nivel recuperable, porque al final de esta etapa las colonias tratadas estaban significativamente peor que las tratadas de forma continua (Delaplane & Hood, 1997).

Alternativamente, Strange & Sheppard (2001) definieron el umbral de daño como: 1) los niveles de ácaros correspondientes a los grupos de tratamiento de colonias al final de la temporada con un peso de abejas inferior a los niveles iniciales (0,92 Kg en este caso), y 2) colonias con $<1150 \text{ cm}^2$ de cría operculada: un número derivado de análisis de regresión que predicen la cantidad de cría que debería estar presente en colonias con abejas de 0,92 Kg. Con estas condiciones límite, los autores pudieron identificar retrospectivamente los niveles de ácaros heredados que eran tolerables o irrecuperablemente altos.

Un obstáculo en los estudios de campo descritos aquí es un efecto de confusión, inherente al diseño, entre la estación (tiempo de tratamiento) y las densidades de los ácaros en las colonias. El crecimiento de la población de ácaros está regulado por la duración de la temporada de cría, la relación entre la cría de obreras y la cría de zánganos y el número de celdas de cría (Fries *et al.*, 1994) y tiende a aumentar a lo largo de la temporada activa. Delaplane & Hood (1997) señalaron este efecto de confusión cuando dijeron: "Por lo tanto, nuestro umbral de tratamiento es confiable para las colonias de agosto que cumplen con las condiciones descritas en [la tabla que muestra las descripciones retrospectivas de colonias], pero puede no ser confiable para las colonias de agosto con

significativamente diferentes cantidades de abejas o crías ". Un modelo de campo altamente resuelto replicaría cada uno de estos términos independientemente del mes de tratamiento.

Otro obstáculo proviene de la comprensión emergente de que la morbilidad de las abejas melíferas no siempre es producto de un simple proceso lineal o un factor, sino más bien una red de factores que interactúan (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Se necesitan umbrales de daño más sofisticados que puedan integrar más de un factor de morbilidad y dar cuenta de sus posibles interacciones.

Ventajas: permite la definición de umbrales de daño como base de la implementación de IPM

Desventajas: alta carga de trabajo, tedioso.

4.7.2. Variaciones regionales en los umbrales de daños reportados.

La Tabla 5 ofrece algunos umbrales de daños publicados en el campo y su geografía de origen.

Tabla 5. Umbral de daño a Varroa y mes de ocurrencia en diferentes localidades.
a. Delaplane y Hood (1999); **b.** Delaplane *et al.*, (2010); **c.** Strange y Sheppard (2001); **d.** Currie y Gatien (2006); **e.** Gatien y Currie (2003).

Umbrales de daño de Varroa y mes de ocurrencia (según el hemisferio norte)		Ubicación	Referencia
Febrero	Agosto		
1. población de ácaros en la colonia: 7-97	1. población de ácaros en la colonia: 3172-4261	Sudeste de USA	A
2. 0,4 ácaros por cada 100 abejas	2. 13 ácaros por cada 100 abejas		
3. cantidad de ácaros caídos durante toda la noche en piso técnico: 0,6-10	3- cantidad de ácaros caídos en piso técnico: 59-187.		
	1. población de ácaros en la colonia: 1111	Sudeste de USA	B
	2. 20 ácaros por cada 100 abejas		
Abril	Agosto		
1. 1 ácaro por cada 100 abejas	1. 5 ácaros por cada 100 abejas	Noroeste de USA	C
2. cantidad de ácaros caídos durante 48 hs en piso técnico: 24	2. cantidad de ácaros caídos durante 48 horas en piso técnico: 46		
Mayo	Agosto tardío a mediados de Setiembre		
2 ácaros por cada 100 abejas (para prevenir disminución en la cantidad de miel)	4 ácaros por cada 100 abejas (para prevenir disminución en la cantidad de miel).	Manitoba, Canadá	D
	5 a 8 ácaros por cada 100 abejas	Manitoba, Canadá	E

4.8. Estandarización de ensayos de campo.

4.8.1. Condiciones para comenzar

4.8.1.1. Obtención de colonias libres de Varroa.

Las colonias libres de Varroas pueden obtenerse de áreas libres del ácaro. Estas colonias también estarán libres de residuos de acaricidas ya que estos tratamientos no son utilizados. Usualmente no es posible obtener colonias así, por lo que es necesario aplicar un acaricida potente que remueva la mayor cantidad de ácaros posibles de las colonias experimentales y que sea el adecuado para las condiciones de cada región donde se realizará el estudio. La aparición de poblaciones resistentes debe ser considerada. Cuando se escoja un acaricida para este propósito (consulte sección 3.6.3. "Bioensayos para cuantificar la susceptibilidad de la Varroa a los acaricidas" como método para testear resistencia). La eficacia de los tratamientos debe ser chequeada, así como la re-infestación putativa desde apiarios vecinos (Greatti *et al.*, 1992). Dependiendo de los ensayos planeados, los residuos que quedan por el uso de estos podrían sesgar los resultados provocando mortalidades tardías de ácaros. En tal caso, se debe usar un tratamiento libre de residuos como el ácido oxálico en los enjambres. Marcos de cría sin opercular con larva L5 (consulte sección 2.5. "Obtaining brood and adults of known age" en Human *et al.*, 2013) debieran ser llevados a las colmenas experimentales con el objetivo de no trasladar ácaros. Un tratamiento con ácido fórmico también puede ser utilizado en colonias completas sin crías ya que el ácido afecta a los ácaros dentro de las crías operculadas (Adelt & Kimmich, 1986; Koeniger *et al.*, 1987; Fries, 1991; Calis *et al.*, 1998). Aunque, estos dos métodos son eficientes sólo en un 95% en promedio, lo que podría influenciar en el experimento planeado. Productos basados en ácido oxálico y fórmico están disponibles en el mercado y debieran ser utilizados según las recomendaciones del fabricante. En tales experimentos, un grupo control de colonias tratadas continuamente debiera ser necesario. Esas colonias deben ser separadas del grupo experimental ya que la deriva y el robo de abejas podría contaminar los ensayos en el apiario (especial y principalmente con acaricidas sintéticos; Allsopp, 2006). Por la misma razón, el apiario experimental y el control debieran estar separados por la misma distancia (~2 Km) desde los apiarios vecinos sin control. Sin embargo, la distancia comprometida entre el apiario experimental y control debe asegurar que ambos apiarios estén bajo las mismas condiciones medioambientales.

4.8.1.2. Obtención de colmenas libres de residuos

La presencia de residuos de un acaricida con un efecto residual prolongado (Bogdanov *et al.*, 1998) en las celdas de cera o en la miel puede influenciar los resultados de los experimentos en los cuales la supervivencia de los ácaros es un parámetro relevante. Existen varios métodos para reemplazar la cera con residuos por aquella libre de residuos para apicultores que cambian a apicultura orgánica (Imdorf *et al.*, 2004). El método descrito aquí permite disminuir los residuos bajo niveles detectables en 1 año. Esto no significa que todos los residuos vayan a desaparecer, pero ellos serán diluidos suficientemente para que no representen un problema para la calidad de los productos de la colmena. El cómo la cantidad mínima de residuos que aún está presente en la cera afectará la supervivencia de los ácaros es sin embargo incierta. Este método basado en la remoción completa de la cera puede ser utilizado para reducir la cantidad de residuos en la cera para propósitos de investigación.

La remoción completa de los panales es mejor hecha al comienzo de la temporada apícola cuando los panales son construidos rápidamente por las obreras.

1. Dividir la colonia.
2. Fuera de la división, crear un enjambre libre de crías y con la reina vieja.
3. Raspar todo el propóleo y la cera, lavar con soda cáustica y quemar la superficie con un mechero las partes usadas de la colmena para remover residuos antes de introducirlos a la colonia; alternativamente, usar material nuevo en las colmenas.
4. Colocar el enjambre en los cajones con láminas de cera estampada libres de residuos (originarios desde las locaciones donde no se utilizan acaricidas con efecto residual y con cera correctamente esterilizada mediante el fundido $>121^{\circ}\text{C}$ por >30 min).
5. Alimentar la primera mitad del enjambre.
6. En la otra mitad del enjambre, dejar la cría y desde ella se formará una nueva reina.
7. Cuando la mayoría de la cría haya emergido y la reina haya comenzado su postura, remover los panales viejos.
8. Reemplazar con láminas de cera estampada libres de residuos.
9. Alimentar la segunda parte del enjambre.

También es posible dejar que las abejas construyan nuevos panales desde su propia producción de cera en sustitución de colocar láminas de cera estampada.

Alternativamente, lo siguiente puede ser hecho al final de la temporada apícola en todas las colonias.

1. Capturar la reina en una caja grande hecha como un excluidor de reinas permitiendo el paso a las obreras.
2. Dejar que toda la cría emerja y la colonia quede sin cría.
3. Raspar todo el propóleos y cera, lavar con soda y quemar la superficie con una llama en las partes usadas de las colmenas para remover los residuos antes de introducirlas a la colonia; alternativamente, use nuevo material en las colmenas.
4. Retirar los paneles viejos.
5. Reemplazar con cuadros con láminas de cera estampada libre de residuos.
6. Alimentar a la colonia.

Ventajas: Reduce los residuos de acaricidas bajo niveles detectables.

Desventajas: aunque es putativo, podrían permanecer residuos en cantidades mínimas y tener un efecto biológico desconocido.

4.8.2. Infestación artificial de ácaros

4.8.2.1. Cómo introducir muchos ácaros

El número de ácaros a introducir en una colonia depende del desarrollo del experimento. Hay varios factores que considerar:

- La relevancia estadística: se debe obtener un número mínimo de infestaciones exitosas (Pirk *et al.*, 2013).
- Un número alto de ácaros introducidos reduce la importancia de los ácaros residentes locales/residuales.
- El nivel de infestación depende de qué tanto tiempo la colonia deberá sobrevivir: a mayor cantidad de ácaros introducidos, más rápido podría colapsar la colonia.
- El método de introducción: introducir ácaros en la parte superior de los marcos podría resultar en altas pérdidas, pero es fácil. Alternativamente,

ponerlos sobre las abejas reduce esas pérdidas y permite una reducción en el número de ácaros utilizados. Introducir ácaros en las celdas es un método altamente controlable que requiere pocos ácaros, pero es tedioso.

- La tasa de rechazo de ácaros por obreras que realizan acicalamiento o conducta higiénica.
- La esterilidad de algunos ácaros.
- La falta de control de usar ácaros viejos.
- La disponibilidad de ácaros.

En general, el número de ácaros a ser introducidos en colonias experimentales debiera ser sobreestimado para garantizar un tamaño muestral suficiente.

4.8.2.2. Cómo introducir Varroas en las colonias.

Existen dos formas para obtener colonias infestadas: ácaros obtenidos desde otras colonias pueden ser introducidos o la población existente puede ser medida y la colonia manipulada para obtener el nivel de infestación deseado. Las abejas pueden ser tomadas fuera de una colonia y el ácaro puesto directamente sobre su hospedero. Esto puede realizarse colocando los ácaros colectados en la superficie de las obreras en una caja o tomando ácaros uno a uno con un pincel y ponerlo directamente sobre la obrera. Se debe dar tiempo necesario para que el ácaro pueda refugiarse en las placas abdominales de las abejas antes de ponerlas de regreso en su colonia. Este método es más eficiente que tirar los ácaros sobre los marcos porque más ácaros pueden fijarse a un hospedero. Alternativamente, y si el nivel de infestación deseado no es muy diferente del nivel inicial de la colonia, la colonia puede ser dividida para obtener el nivel deseado. Si el nivel de infestación está sobre el nivel deseado, algunos marcos de crías operculadas (en donde están capturados los ácaros) pueden ser removidos.

4.8.2.3. Cómo introducir ácaros dentro de las celdas

Una ventaja de introducir ácaros directamente en las celdas es la posibilidad de monitorear los eventos que ocurrirán en estas celdas en particular. Las celdas pueden ser manualmente infestadas o pueden ser dejadas para infestación natural si las celdas infestadas pueden ser reconocidas después. Aquí se describe este método artificial de infestación.

4.8.2.3.1. Infestación manual

1. Utilizando cría recientemente operculada ej. dentro de las primeras 6 horas de operculada haga un pequeño agujero en el lado del opérculo (Consulte 2.5. "Obtaining brood and adults of known age" en "Human et al., 2013").
2. Introducir un ácaro utilizando un pincel fino húmedo.
3. Cerrar y volver a sellar el agujero llevando nuevamente el opérculo a su posición original. Las obreras volverán a sellar el agujero cuando el marco de cría es re-introducido a la colonia. Usar cera fundida para evitar el escape del ácaro no es recomendable porque se podría dañar la larva.
4. Marcar la ubicación de la celda en una lámina transparente puesta bajo el panal.

Este método requiere de práctica. En un inicio el 20% de la cría infestada artificialmente es aceptada, hasta alcanzar casi el 80%. Esta tasa de aceptación es variable acorde a la colonia y al experimento. La tasa de éxito puede ser chequeada mediante la remoción del marco luego de pocas horas y verificando el estado de la celda. Importante: las abejas que cubren el panal que será usado para la transferencia artificial deben ser cuidadosamente removidas con un cepillo y evitar sacudirlas, lo que podría dañar a la pupa y los ácaros. Una celda abierta y marcada significa que las obreras removieron la larva y el ácaro. Las obreras podrían descartar el opérculo viejo y resellar la celda sin remover la larva. Esto puede ser reconocido por la apariencia de una capa fresca privada de la capa del capullo. En este caso el ácaro debió haber escapado o ha sido removido antes del reoperculado.

4.8.2.3.2. Infestación natural

Boot y colaboradores (1992) diseñaron un método que permite localizar celdas infestadas de forma natural. Está basado en un panal de un solo lado del cual las paredes de las celdas fueron removidas del fondo. Las paredes fueron luego fundidas en una lámina transparente. Estos panales son consolidados por las obreras cuando se reintrodujeron en las colonias y fueron aceptados para la oviposición de la reina. Podría ser necesario cubrir el lado expuesto de la lámina transparente para prevenir que las obreras construyan en él. Beetsma y colaboradores (1994) también describió columnas simples de celdas con dos paredes transparentes que ayudan a localizar y observar la infestación natural.

4.8.3. Ensayos de campo de semioquímicos

Los semioquímicos con los cuales se probará algún efecto en la conducta del ácaro o en su fisiología, necesitan ensayos de laboratorio para ser testeados bajo las condiciones naturales de la colonia. Por ejemplo, semioquímicos involucrados en la invasión de las celdas y la reproducción fueron testeados con este método (Milani *et al.*, 2004).

4.8.3.1. Invasión de la celda

En el caso de que un compuesto afecte la invasión de la celda (ya sea atrayendo o repeliendo), los ensayos de campo involucran celdas de crías tratadas con los químicos bajo estudio y la evaluación del número de ácaros que ingresaron a la celda después de que fue operculada.

1. Disolver el compuesto a ser testeado en 1 μ l de agua ionizada u otro solvente apropiado. La dosis usada para los bioensayos de campo es normalmente la más bio-activa en los bioensayos en laboratorio. Tenga cuidado de que el solvente disuelva la cera de las paredes de la celda.
2. Seleccionar una colonia altamente infestada.
3. Identificar las celdas que contienen larvas L5 (consulte sección 2.5. “*Obtaining brood and adults of known age*” en “Human *et al.*, 2013”).
4. Aplicar la solución a estas paredes de las celdas con una jeringa de Hamilton de 10 μ l.
5. Tratar una misma cantidad de celda con 1 μ l de solvente como un control.
6. Marcar la posición de las celdas en una lámina transparente para el subsecuente seguimiento.
7. Abrir las celdas operculadas 18 horas después del tratamiento.
8. Inspeccionar la celda para detectar la presencia de ácaros y contar los ácaros.

4.8.3.1.1. Análisis de datos

La proporción de celdas tratadas y control que fueron infestadas son compradas usando el método Mantel-Haenszel después de testear la homogeneidad de los *odds ratios* de las réplicas en tablas de 2 x 2. Cualquier prueba capaz de comparar proporciones podría ser utilizada en reemplazo. Sin embargo, si hay más réplicas, utilizando un cierto número de celdas cada vez, se recomienda utilizar una prueba que permita el análisis de estratos. El número de ácaros en las celdas tratadas y control en la colonia del bioensayo, puede ser comparado por una prueba de muestreo al azar estratificada.

4.8.3.2. Reproducción del ácaro

En el caso que los compuestos afecten la reproducción del ácaro, las pruebas de campo involucran el tratamiento de celdas de cría con el químico en estudio y la evaluación conjunta de la fertilidad y la fecundidad del ácaro reproductivo en la celda.

1. Escoger panales que contengan crías próximas a ser operculadas.
2. Marcar todas las celdas operculadas en una lámina transparente puesta sobre el panal.
3. Reemplazar el panal en la colonia por dos horas para que las obreras se encarguen de las celdas operculadas.
4. Llevar el panal al laboratorio después de esas dos horas.
5. Disolver el componente a evaluar en el solvente adecuado. La dosis usada para los bioensayos es normalmente la más activa de los ensayos en laboratorio.
6. Los grupos de celdas de obreras recientemente operculados (sin marcar) serán tratados con 1 μ l de la solución con 10 μ l con una jeringa de Hamilton bajo el opérculo. No insertar la jeringa muy profundamente en la celda para evitar dañar a la larva. Tener cuidado que el solvente podría disolver la cera de las paredes de la celdas
7. Tratar un número similar de celdas con 1 μ l del solvente como grupo control.
8. Escoger grupo control y tratado en ambos lados del panal separados por al menos una celda, la que es intocable para evitar contaminación.

9. Marcar la posición de las celdas control y tratadas en la lámina transparente puesta sobre el panal.
10. Regresar el panal a la colonia antes de 3 horas.
11. Llevar el panal al laboratorio 11 días después, cuando las abejas están próximas a emerger.
12. Identificar celdas control y tratadas usando la lámina transparente.
13. Contar las celdas desoperculadas e inspeccionar las celdas intactas.
14. Notar la condición de la pupa infestada.
15. Colectar la Varroa madre y sus descendientes.
16. Montar la muestra en portaobjetos para el microscopio e identificar los estados de desarrollo como se describen en la sección 4.6.3. “Cómo medir el éxito reproductivo” en particular, son considerados el número de descendencia y el número de hijas fecundadas (por ej. el número de hijas adultas en las celdas conteniendo un macho adulto).

El efecto del solvente en la reproducción de *V. destructor* es estudiado comparando la reproducción del ácaro en celdas inyectadas con 1 μ l del solvente y en celdas tratadas de forma simulada (la jeringa fue introducida pero, ningún solvente fue inyectado). La proporción de ácaros reproductivos del total de ácaros en las celdas es comparada utilizando un G-Test (con la corrección de Williams). El número de descendientes y de hijas fecundadas por cada Varroa madre entre los grupos tratados y control puede realizarse utilizando una prueba de dos-muestras al azar. La distribución de aleatorización debiera ser repetida y adaptada al número de veces (por ej. 10^6 veces).

4.8.4. Evaluación de Varroocidas en el campo

La Agencia Médica de Europa ha realizado recomendaciones para el desarrollo de tratamientos anti Varroa. Esta guía ha sido construida con el conocimiento acumulado por la Acción Concertada 3686 (Comisión de la Comunidad Europea), la cual es llamada comúnmente “Métodos alternativos de control de Varroa” basada en el uso de ácidos orgánicos y aceites esenciales. El objetivo de esta guía es evaluar y demostrar la eficacia y seguridad de nuevos acaricidas con el propósito de facilitar la homologación. El documento original (EMA/CVMP/EWP/459883/2008) debiera ser consultado para revisar aspectos legales y estudiar la aplicabilidad de los tratamientos en varias regiones

climáticas. Nosotros aquí resumimos y adaptamos el diseño experimental con propósitos de investigación en una escala local. Los acaricidas son considerados eficientes si la proporción de los ácaros muertos es al menos del 95% para compuestos sintéticos y de al menos el 90% para sustancias no sintéticas.

4.8.4.1. Ensayos preliminares

Para facilitar y optimizar las pruebas de eficacia, es recomendado no realizar los ensayos de dosis y tolerancia en abejas enjauladas bajo condiciones controladas en laboratorio (consulte 3.6.3. “Bioensayos para cuantificar la susceptibilidad del ácaro Varroa a los acaricidas”). La concentración más alta/cantidad tolerable por las abejas puede ser utilizada como un indicador para la concentración o cantidades que pueden ser utilizadas en subsecuentes estudios dosis-titulación y dosis-confirmación o estudios de campo. Estudios de dosis-titulación debieran tener como objetivo identificar los niveles de tolerabilidad máximos y mínimos de las sustancias activas para abejas y parásitos y esto ayuda a establecer la dosis y el intervalo de dosificación del producto. La implementación de estudios de hallazgo de dosis, llevados a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio es preferido, por ej., usando 10 obreras por caja, 3 cajas por concentración, 3 controles sin tratamiento y una réplica, realizando este estudio dos veces (consulte Medrzykci *et al.*, 2013).

Estudios pilotos en el campo para confirmar la dosis, eficacia y tolerancia debieran ser considerados antes de desarrollar estudios a gran escala. Esto permite validar los resultados obtenidos en el laboratorio en una situación más cercana a la del campo, pero con una alta reproducibilidad ya que las variables pueden ser mejor controladas en estas unidades pequeñas comparadas con colonias completas. Esto también permite la resolución de problemas antes de que se realice la inversión en las pruebas de escala completa. Un mínimo de 5 colonias de prueba sin tratar y tratadas debiera ser utilizado. Para asegurar la reproductibilidad en el ensayo piloto, las colonias debieran ser comparables con respecto al ambiente, tipo y tamaño de la colmena, nivel de infestación de Varroa, historia de tratamientos, edad de la reina, parentesco de las reinas (reinas hermanas pueden ser utilizadas para reducir la variabilidad entre réplicas, en contraste, reinas sin parentesco pueden ser utilizadas para considerar un margen amplio de genotipos), presencia de cría, y distribución etaria de las obreras.

4.8.4.2. Pruebas de eficacia

4.8.4.2.1. Análisis estadístico

Objetivos primarios y secundarios, hipótesis y métodos estadísticos debieran ser especificados y justificados en el protocolo antes de comenzar los experimentos. El tamaño de la muestra, en términos de colmenas por área para áreas climatológicamente distintas (cuando es relevante), debiera ser suficientemente grande para proporcionar una validez estadística. Cuando sea posible, los resultados del análisis debieran ser acompañados por intervalos de confianza (Pirk *et al.*, 2013; Guía CVMP de principios estadísticos para ensayos clínicos veterinarios: EMEA/CVMP/816/00).

4.8.4.2.2. Colmenas

1. El tipo de colmenas debe ser homogenizado.
2. Pisos sanitarios para Varroas protegidos contra hormigas deben ser instalados en el fondo de cada colmena para el conteo de ácaros (consulte sección 4.4. “Caída Natural de ácaros en revisión de pisos técnicos”).
3. La temperatura y la humedad relativa dentro de las colmenas así como la exposición a radiación solar pueden ser registrados, si estos pudieran influir en el desempeño del producto.

4.8.4.2.3. Colonias

Los siguientes parámetros deben ser tenidos en cuenta:

1. No deben incluirse colonias débiles o afectadas por enfermedades distintas a Varroa en el estudio.
2. Ecualizar u aleatorizar la raza de las abejas dependiendo de los objetivos del ensayo en cuanto a la diversidad genética.
3. Seleccionar reinas hermanas o reinas no relacionadas de la misma edad.
4. Medir y ecualizar la fortaleza de las colonias (Delaplane *et al.*, 2013).
5. Medir y ecualizar la cantidad de cría (Delaplane *et al.*, 2013). La presencia y tipo de cría es determinado por el modo de acción del producto. Por lo que las pruebas deben ser desarrolladas en ausencia de cría operculada, a

menos que el producto intente ser efectivo sobre los ácaros de las celdas operculadas.

6. El nivel de infestación inicial de Varroa debe ser suficientemente alto (> 300 ácaros por colonia) para ser capaces de medir la caída del ácaro. Sin embargo, debe ser menor al umbral de daño (por ej. Para Europa Central: < 3.000 ácaros por colonia, consulte también la Tabla 5 y la sección 4.7. "Estimación de umbrales de daño") y ser comparable entre colonias incluidas dentro del estudio.
7. El historial de los tratamientos debe ser similar para todas las colonias para ecualizar el efecto de los tratamientos pasados en los resultados (por ej. Tipo y cantidad de residuos de acaricidas presentes en la cera); cuando sea posible, utilizar cera libre de residuos.

4.8.4.2.4. Ubicación

1. Apiarios estudiados deben estar suficientemente distantes de apiarios vecinos para evitar perturbación y reducir el riesgo de re-infestación. El tipo y disponibilidad del tipo de fuentes de alimento debería ser registrado.
2. Como principio general, si los estudios son llevados a cabo en distintos apiarios, el hábitat debería ser comparable (por ej. acceso a forraje similar y exposición a condiciones climáticas similares). Si estas condiciones no son factibles el tamaño muestral debe ser adaptado (el número de apiarios aumenta) para tomar en cuenta estas diferencias.
3. Dependiendo del modo de dispersión del producto, apiarios control y de prueba deberían estar suficientemente separados para prevenir la contaminación del grupo control por el producto estudiado gracias a la deriva de forrajeras y zánganos o pillaje.

Acaricidas sintéticos han mostrado contaminar las colmenas control cuando son instaladas en el mismo apiario (Allsopp, 2006).

4.8.4.2.5. Tratamiento

Los siguientes parámetros deben ser definidos y determinados en los ensayos preliminares:

1. Período de tratamiento (El tratamiento debe ser preferentemente realizado a temperaturas externas > 5°C).

2. Número de tratamientos (en caso de realizarse más de uno).
3. Intervalo entre los tratamientos (en caso de realizarse más de uno).
4. Incluir un grupo control sin tratamiento en el estudio para establecer el efecto del manejo y la variación natural en los niveles de infestación y así confirmar que la reducción del crecimiento poblacional del ácaro observado es de hecho debido al producto bajo investigación.

4.8.4.2.6. Observaciones y parámetros

Los estudios deberían abarcar un período pre-tratamiento, un tratamiento y un post-tratamiento. El monitoreo comienza con el pre-tratamiento 14 días antes de llevar a cabo el primer tratamiento. El período post-tratamiento debiera extenderse por > 14 días luego del último tratamiento aplicado. Este período abarca el tiempo de desarrollo de las pupas y permite tomar en cuenta los ácaros que están encerrados en las celdas. El período post-tratamiento podría necesitar ser prolongado, dependiendo del modo de acción y persistencia del producto evaluado.

4.8.4.2.7. Evaluación de la eficacia

1. Contar los ácaros muertos en el piso de la colmena a intervalos regulares antes, durante y después del tratamiento. La variable primaria es mortalidad del ácaro. Durante el período del tratamiento el conteo de ácaros muertos debería ser cada 1-2 días dada la alta mortalidad esperada. El conteo pre- y post-tratamiento debería ser realizado entre 1-2 veces por semana dependiendo de la cantidad de ácaros cayendo, vea la sección 4.4. "Caída Natural de ácaros en revisión de pisos técnicos". Esto permite verificar la eficacia del producto ya que la caída del ácaro debería tener incrementos de caída durante el período de tratamiento.
2. Determinar la cantidad de ácaros supervivientes al tratamiento con el producto bajo investigación utilizando una siguiente aplicación con un producto químico que tenga un mecanismo de acción diferente y con una eficacia documentada con > 95%.

El siguiente tratamiento debería ser llevado a cabo tanto en los grupos control como el tratado al mismo tiempo. Este tratamiento debería ser realizado al breve tiempo después del tratamiento evaluado, para conservar el nivel de infestación bajo (y por eso el sesgo en los resultados) cuando los apiarios estudiados y los

grupos no son aislados por distancia suficiente de apiarios vecinos o colmenas. Sin embargo, es necesario esperar hasta que la caída de los ácaros regrese a los niveles del período del pre-tratamiento en orden de medir el efecto completo del tratamiento y la disipación de la mortalidad tardía del ácaro. Este período es de al menos 14 días si el producto mata a los ácaros dentro de las celdas o no. Es sólo cuando la abeja adulta emerge cuando estos ácaros serán liberados de las celdas y caerán hacia el piso sanitario o que ellos entrarán en contacto con el producto si este último no penetra dentro de la celda.

3. Contar los ácaros muertos cada 1-2 días en la semana después de la aplicación del tratamiento de seguimiento y 1-2 veces por semana hasta que la caída de ácaros regrese a los valores pre-tratamiento.
4. Calcular la eficacia de los tratamientos como sigue: % de reducción del ácaro= $(\text{número de ácaros en el grupo tratado muertos por el tratamiento} \times 100) / (\text{número de ácaros en el grupo tratado muertos por el tratamiento} + \text{número de ácaros muertos en el grupo tratado causado por el tratamiento de seguimiento})$.

No utilizar datos de colonias con anormalmente altas mortalidades de abejas en la evaluación de eficacia.

5. Comparar la caída de los ácaros después del tratamiento con el grupo control sin tratamiento para verificar que la caída medida no fue un fenómeno natural.

4.8.4.2.8. Evaluación de la seguridad del producto para las abejas

1. Registrar la mortalidad de las abejas dentro y en las zonas adyacentes a la colmena de forma diaria o al menos tres veces por semana a través de toda la extensión del experimento. El uso de trampas para abejas muertas es recomendado (consulte sección 4.4. *"Estimating the number of dead honey bees expelled from a honey bee colony with a trap"* en Human *et al.*, 2013).
2. Monitorear la morbilidad, mortalidad, así como también el tamaño y el desarrollo de las colonias supervivientes al tiempo del primer vuelo de primavera y después de eso (consulte Delaplane *et al.*, 2013) si es aplicable (uso terapéutico previsto para el otoño o invierno).
3. Medir la actividad de vuelo de las abejas durante el ensayo (Human *et al.*, 2013). Esto verifica si el producto influye sobre la actividad de forrajeo de las colonias tratadas.

4. Medir la producción de miel. Esto verifica si el producto influye en la productividad de las colonias tratadas.
5. Cuantificar el área de la cría de las colonias tratadas durante las tres fases y compararlas con el grupo control (consulte Delaplane *et al.*, 2013).

En casos en los cuales está pensado en ser utilizado en colonias con cría, la demostración de seguridad de todos los estados de la cría debería ser evaluado (consulte Medrzycki *et al.*, 2013). Un método adicional para determinar el efecto del producto evaluado en la cría es para determinar qué ha ocurrido de las incompetencias de alimentación de las abejas obreras y efecto adverso diverso sobre los huevos y larvas. Por esto:

1. Dejar marcos con huevos y larvas para desarrollar dentro de la colmena hasta el estado elegido de la larva después de aplicar la dosis terapéutica del producto evaluado.
2. Monitorear el comportamiento de alimentación de estas larvas mediante la medición de la cantidad de alimento encontrado en sus celdas.

Por la comparación del desarrollo de la cría y la cantidad de alimento de la cría y considerando que la relación entre la cantidad de la cría y número de obreras entre el grupo control y el testeado, es posible diferenciar entre el efecto de incompetencia de alimentar de las abejas obreras y efectos adversos directo en los huevos y larvas después de la aplicación del producto.

3. Verificar la presencia de una reina viva al término del experimento.

Una diferencia significativa en la supervivencia de las reinas entre el grupo control y tratado indica un efecto del tratamiento.

4.8.4.3. Patrón de resistencia

La posibilidad de que surja resistencia después de varios tratamientos debe ser monitoreada. La aplicación del producto debería cubrir varios ciclos reproductivos del parásito para mostrar el desarrollo de resistencia y la tasa de su desarrollo. Esos estudios pueden ser realizados bajo condiciones de laboratorio (consulte sección 3.6.3. "Bioensayos para cuantificar la susceptibilidad de la Varroa a los acaricidas") y/o condiciones de campo. No sólo los ácaros, pero también las abejas pueden desarrollar resistencia contra el acaricida después de su uso regular para varias generaciones. Esto se traduce en un cambio en la relación dosis-letalidad del producto o de la sustancia activa

y por eso afecta la seguridad del producto para abejas el cual aumenta (consulte Medrzycki *et al.*, 2013) para evaluar la toxicidad de los acaricidas en las abejas.

4.9 Cría de ácaros en las colonias

Un problema común en la investigación de Varroa es obtener una cantidad de ácaros suficientes para los experimentos. Es deseable obtener ácaros temprano en la temporada cuando su número en las colonias es aún bajo y en grandes cantidades por el mayor tiempo posible a partir de entonces. El método descrito aquí permite, en un corto tiempo, la cosecha regular de una gran cantidad de ácaros foréticos temprano en y durante la temporada. El método está basado en el panal que se utilizó para atraer ácaros originalmente diseñados para controlar el ácaro (Fries & Hansen, 1993; Maul *et al.*, 1998). Este consiste en enjaular a la reina desde la colonia infestada, dejando que toda la cría emerja. Una vez que la colonia está sin cría y todos los ácaros están en su fase forética, un panal con cría abierta es introducido. Justo después que esa cría es operculada, la mayoría de los ácaros foréticos buscarán oportunidad de reproducción entrando a las celdas provistas. Una vez que la cría es operculada, el panal es removido y puesto en una incubadora hasta que las abejas emergan. Las nuevas abejas que emergen son no voladoras y estarán altamente infestadas con Varroa, haciendo la cosecha del ácaro fácil y rápida. El panal infestado también se puede recuperar en cualquier momento para obtener ácaros en un estado de desarrollo particular. Este método se desarrolla aún más para optimizar los aspectos logísticos acorde al siguiente protocolo:

1. Preparar varias colmenas como colonias de crianza durante la temporada precediendo los experimentos.
2. Ajustar los tratamientos de Varroa durante la temporada que precede a los experimentos para asegurar la supervivencia de las colonias, pero también permite la supervivencia de un número relativamente alto de ácaros durante el invierno.
3. Contar la caída natural semanal del ácaro durante un ciclo de la cría (3 semanas) en el siguiente año, cuando las colonias están bien desarrolladas.
4. Realizar un *ranking* de las colonias acorde a su carga de ácaros y fortaleza.

Las colonias más infestadas deberían ser utilizadas primero ya que ellas serán más susceptibles de colapsar antes de las colonias menos infestadas. La población de parásitos puede ser dejada para que crezca en la colonia menos infestada hasta que ellas sean utilizadas para la colecta de ácaros.

Entre varias colmenas con el mismo rango de infestación, aquellas cercanas al estado de enjambrar pueden ser usadas primero. Esto hace posible prevenir el enjambrazón y la pérdida de ácaros.

El ciclo de crianza puede comenzar:

5. Día 1: Enjaular la reina en las colonias seleccionadas para criar ácaros.

Al día 22, toda la cría presente al día 1 habrá emergido.

6. Día 12: Preparar el panal que atraerá Varroas:

- 6.1. Seleccionar una colonia fuerte (proveedora de crías) con una reina con alta tasa de postura.

- 6.2. Enjaular la reina dentro de un panal oscuro y vacío (que las reinas prefieren para poner huevos) y póngalo en el nido de cría de su colonia.

7. Día 13:

- 7.1. Después de 24 h, remueva la reina de la jaula, pero deje el panal en la jaula para prevenir más posturas de las reinas.

Estos panales contienen crías de edades similares en los cuales el ácaro Varroa será más tarde atrapado. Para aumentar las posibilidades de obtener suficiente cría para atraparlo, las reinas de varias colonias pueden ser enjauladas y el panal con más cría es usado.

8. Día 19:

- 8.1. Transferir el panal que atrapa Varroas que ahora contiene crías de 7 días de edad para la colonia de crianza de Varroas, de los cuales la cría ha emergido.

- 8.2. Liberar la reina de la colonia de crianza para que pueda reanudar su postura.

9. Día 22: las celdas de crías del panal capturador de ácaros ha sido operculado.

- 9.1. Remover el panal de la colonia de crianza.

- 9.2. Transportar al laboratorio.

- 9.3. Colocar en una caja para abejas bien ventilada.

- 9.4. Mantener en una incubadora a 34,5°C con 60-70% de humedad relativa hasta que las obreras emerjan. El panal debería contener suficiente polen y

miel para que las abejas que recién emergen se alimenten. El trabajo en el apiario de crianza debería terminar con la colección del panal capturador de Varroas para que no permanezca mucho tiempo fuera de la colonia antes de ser puesto en la incubadora. Para evitar el daño a la cría, el transporte debería ser realizado en un contenedor termorregulado y húmedo.

10. Día 33: Comenzar a colectar ácaros desde las obreras infestadas que emergen este día y el siguiente.

10.1. Para la colecta de ácaros, las abejas pueden ser sostenidas con pinzas y los ácaros capturados con el pincel n°00 o un aspirador bucal.

Durante el ciclo de crianza, la colonia experimenta 2 a 3 semanas sin cría. Después de dos ciclos consecutivos, la colonia ha ganado fortaleza y la población de Varroa habrá aumentado otra vez. Dado eso, la caída natural de Varroa indica una cantidad suficiente de Varroa, la misma colonia puede ser utilizada otra vez para cosechar ácaros. Es más, dependiendo de la cantidad de ácaros necesitada, varias colonias pueden ser utilizadas al mismo tiempo para aumentar la cosecha. Ciclos de crianza en nuevas colonias pueden comenzar cada semana. Así, después de 5 semanas, lotes de ácaros pueden ser cosechados semanalmente. El eje de tiempo adicional mostrado en el fondo de la Fig. 19 ilustra cómo la mayoría de los días de trabajo pueden ser combinados para las colonias o los grupos de colonias a diferentes etapas en el ciclo. Al comenzar un jueves, por ejemplo, no hay trabajos necesarios para los días miércoles, viernes o fines de semana y la recolección de los ácaros ocurrirá los martes.

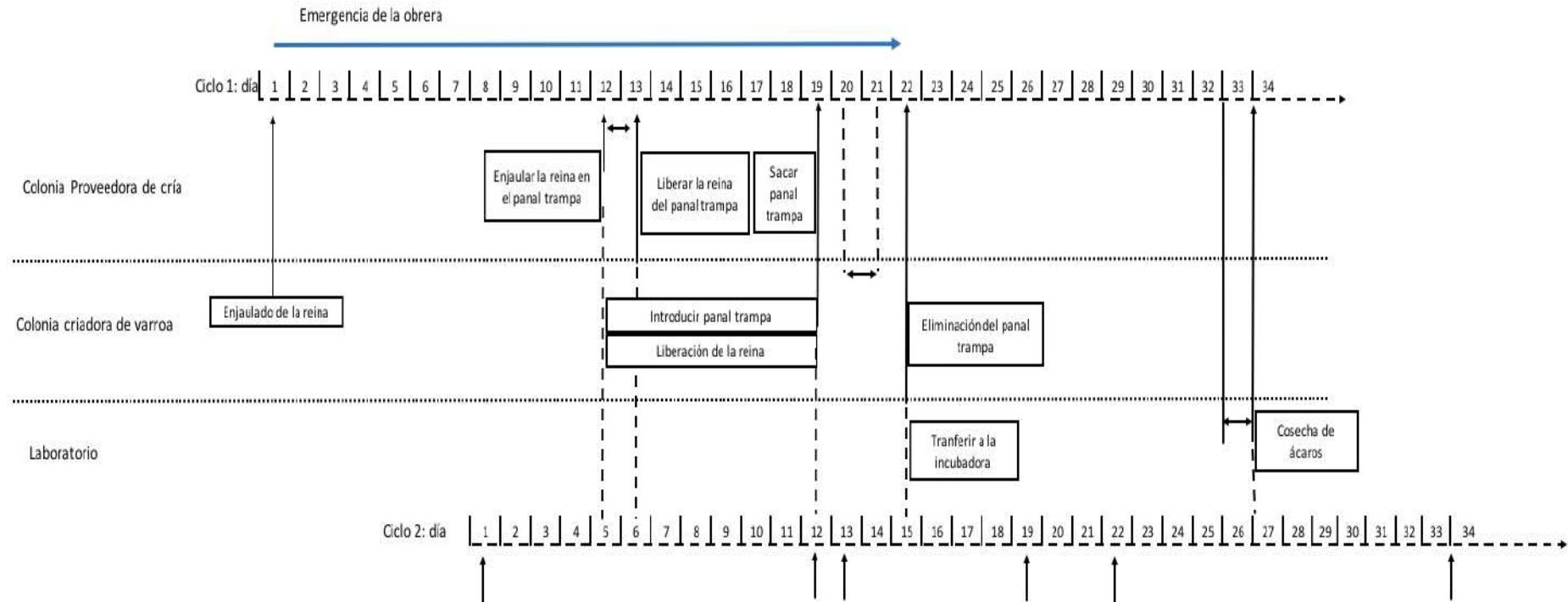


Figura. 19. Línea de tiempo del ciclo de crianza. Un ciclo adicional es representado debajo de la línea del tiempo principal para ilustrar cómo las diferentes tareas (simbolizadas con fechas) pueden ser combinadas entre diferentes ciclos de crianza para optimizar el proceso.

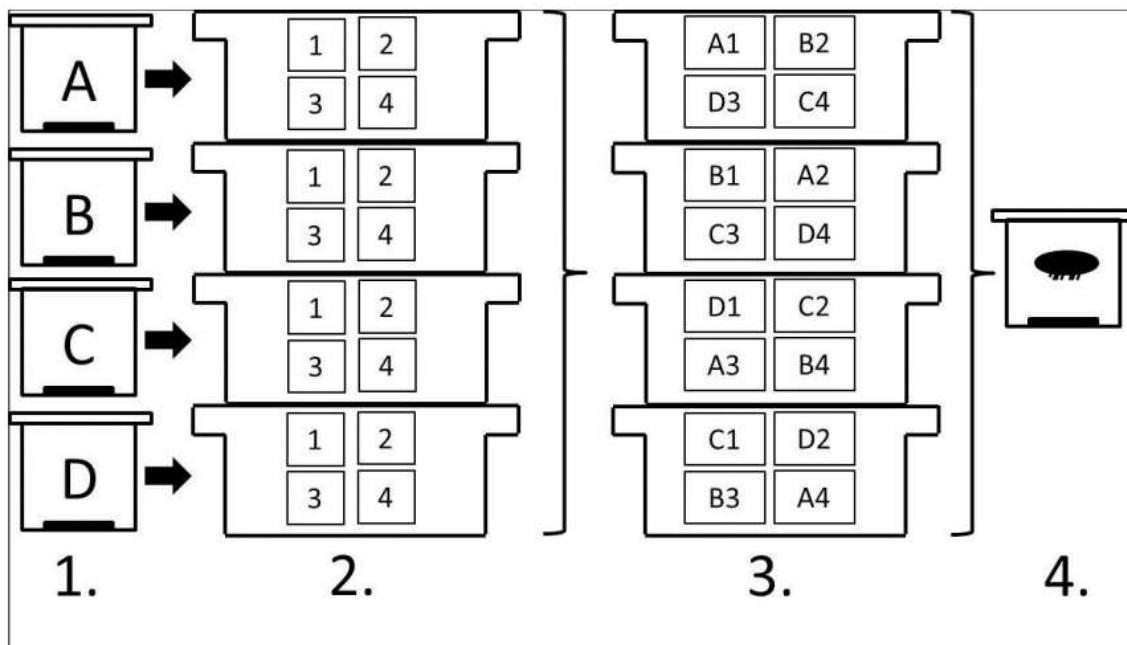


Figura 20. Un esquema del método utilizado para evaluar la atracción de Varroa para criarse desde diferentes líneas de reinas

Ventajas: el método permite la recolección de los ácaros en condiciones bajo techo en vez del apiario, prevenir el peligro de pillaje por colonias vecinas ya que las colonias no permanecen abiertas para el muestreo de los ácaros, necesitando pocas visitas al apiario de crianza, permitiendo la recolección de ácaros en un día particular, facilitando tanto el muestreo como la alta densidad de ácaros por abejas emergidas.

Desventajas: logística intensiva; si los ácaros son colectados desde obreras viejas las madres viejas e hijas jóvenes no son separados.

4.10. Atracción de la cría

Los ácaros de Varroa prefieren las crías de zánganos por sobre de las obreras (Fuchs, 1990; Rosenkranz, 1993; Boot *et al.*, 1995). Linajes de abejas melíferas también varían en la capacidad de atracción de su cría para los ácaros (Büchler, 1990; De Guzman *et al.*, 1995; Guzman-Novoa *et al.*, 1996). Nosotros aquí presentamos bioensayos destinados a comparar la capacidad de atracción de la cría en condiciones comparables, por ej., en la misma colonia. Este método está adaptado de aquellos de Ellis y Delaplane (2001) y Aumeier *et al.* (2002).

4.10.1. Procedimientos para evaluar el atractivo de la cría

1. Colonias con reinas de cuatro líneas diferentes estudiadas (Fig. 20, paso 1) son puestas individualmente al azar, con panales vacíos contenidos en una cámara de cría con malla excluidora de reina.
2. Permitir que las reinas ovipongan por 24 h.
3. Veinticuatro horas después, retirar las reinas del panal, pero dejar el panal en las cajas. Esto limita futuras posturas de las reinas en cada panal objetivo.
4. Dejar cada panal con huevos en su respectiva colonia por 6 o 7 días (para crías de obreras/ zánganos respectivamente).
5. Después de esto, corte un cuadrado en el panal o un círculo conteniendo larvas L4 (consulte sección 2.5 “*Obtaining brood and adults of known age*” en Human *et al.*, 2013) usando un cuchillo filoso o una espátula de metal (Fig. 20, paso 2).
6. Tomar una sección de las larvas desde cada línea genética para ser estudiada y combinar las secciones al azar de diferentes líneas en el centro de un panal completamente dibujado en los cuales el cuadrado o el círculo sean removidos.

Cada marco ahora contiene una sección con crías de cada una de las cuatro líneas genéticas de las colonias (Fig. 20, paso 3).

7. Preparar una colonia receptora (Fig. 20, paso 4) por la remoción de la cría abierta en la colonia para reducir la cría objetivo (el marco recién creado teniendo las distintas líneas de las reinas representado en un panal) competirán con las crías de la propia colonia por las Varroas presentes en la colonia.

Alternativamente, la reina en la colonia receptora puede ser enjaulada 22 o 25 días más temprano para dejar a todas las crías de obreras y de zánganos que emergen, respectivamente.

8. Introducir cada panal reconstruido sosteniendo huevos de cada línea genética hacia una colonia receptora infestada con Varroas (Fig. 20, paso 4).

La colonia puede recibir más de cuatro marcos generados mediante este procedimiento si la población de Varroas es suficientemente alta. Los ácaros invaden celdas de obreras desde 15- 50 h previos a que las celdas sean operculadas (dependiendo del sexo de la larva).

9. Quince horas después al operculado de las celdas, remueva la sección de pupas operculadas de la colonia.
10. Si es necesario dejarlas en un congelador.
11. Evaluar las tasas de infestación de Varroa (consulte secciones 4.1.1. "Tasa de infestación en cría de abejas" y 4.1.2. "Tasa de infestación en abejas adultas").

Ventajas: la atractividad de la cría es evaluada de condiciones comparables, ej., en la misma colonia proveedora de ácaros.

5. Referencias

- ADELT, B; KIMMICH, K H (1986) Die Wirkung der Ameisensäure in die verdeckte Brut. Allgemeine Deutsche Imkerzeitung 20: 382-385.
- AKRATANAKUL, P; BURGETT, M (1975) *Varroa jacobsoni*: a prospective pest of honey bees in many parts of the world. Bee World 56: 119-121.
- ALLSOPP, M (2006) Analysis of *Varroa destructor* infestation of Southern African honey bee populations. Dissertation, University of Pretoria. 285 pp.
- ANDERSON, D L (2000) Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 31: 281-292. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000122>
- ANDERSON, D L; FUCHS, S (1998) Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research 37: 69-78.
- ANDERSON, D L; TRUEMAN, J W H (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Experimental and Applied Acarology 24: 165-189. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006456720416>
- AUMEIER, P; ROSENKRANZ, P; FRANCKE, W (2002) Cuticular volatiles, attraction activity of worker larvae and invasion of brood cells by Varroa mites: a comparison of Africanized and European honey bees. Chemoecology 12: 65-75. <http://dx.doi.org/10.1007/s00049-002-8328-y>
- AVISE, J C (2004) Molecular markers, natural history and evolution (Second Edition). Sanauer; Sunderland, MA, USA. 684 pp. BAKER, T C; CARDÉ, R T (1984) Techniques for behavioural bioassays. In H Hummel; T A Miller (Eds). Techniques in Pheromone Research. Springer-Verlag; New York, USA. pp. 45-73.
- BEETSMA, J; ZONNEVELD, K (1992) Observation on the initiation and stimulation of oviposition by the Varroa mite. Experimental and Applied Acarology 16: 303- 312.
- BEETSMA, J; BOOT, W J; CALIS, J N M (1994) Special techniques to make detailed observations of Varroa mites staying on bees and invading honey bee brood cells. In L J Connor et al. (Eds). Asian apiculture. Wicwas Press; Cheshire, USA. pp. 510-520.
- BOGDANOV, S; KILCHENMAN, V; IMDORF, A (1998) Acaricide residues in some bee products. Journal of Apicultural Research 37: 57-67. BOOT, W J; CA

LIS, J N M; BEETSMA, J (1992) Differential periods of Varroa mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental and Applied Acarology* 16: 295-301.

BOOT, W J; SCHOENMAKER, J; CALIS, J N M; BEETSMA, J (1995) Invasion of *Varroa jacobsoni* into drone brood cells of the honey bee. *Apidologie* 26: 1 09–118. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19950204>

BRANCO, M R; KIDD, N A C; PICKARD, R S (2006) A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population estimation. *Apidologie* 37: 452-461. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2006010>

BRODSCHNEIDER, R; MOOSBECKOFER, R; CRAILSHEIM, K (2010) Survey as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 23-30. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.04>

BRUCE, W A; CHIESA, F; MARCHETTI, S; GRIFFITHS, D A (1988) Laboratory feeding of *Varroa jacobsoni* Oudemans on natural and artificial diets (Acari: Varroidae). *Apidologie* 19: 209-218.

BRUCE, W A; HENEGAR, R B; HACKETT, K J (1991) An artificial membrane for in vitro feeding of *Varroa jacobsoni* and *Acarapis woodi*, mite parasites of honey bees. *Apidologie* 22: 503-507. BÜCHLER, R (1990) Possibilities for selecting increased Varroa tolerance in central European honey bees of different origins. *Apidologie* 21:365–367.

CALDERONE, N W; LIN, S (2001) Arrestment activity of extracts of honey bee worker and drone larvae, cocoons and brood food on female *Varroa destructor*. *Physiological Entomology* 26: 341–350.

CALIS, J N M; BOOT, W J; BEETSMA, J; VAN DEN EIJNDE, J H P M; DE RUIJTER, A; VAN DER STEEN, J J M (1998) Control of Varroa by combining trapping in honey bee worker brood with formic acid treatment of the capped brood outside the colony: putting knowledge on brood cell invasion into practice. *Journal of Apicultural Research* 37: 205-215.

CAMPBELL, E M; BUDGE, G E; BOWMAN, A S (2010) Gene-knockdown in the honey bee mite *Varroa destructor* by a non-invasive approach: studies on a glutathione S-transferase. *Parasites and Vectors* 3: 73. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-73>

CHAUZAT, M-P; CARPENTIER, P; MADEC, F; BOUGEARD, S; COUGOULE, N; DRAJUNEL, P; CLEMENT, M-C; AUBERT, M; FAUCON, J-P (2010) The rol

e of infectious agents and parasites in the health of honey bee colonies in France. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 31-39. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.05>

CHIESA, F; MILANI, N; D'AGARO, M (1989) Observations of the reproductive behaviour of *Varroa jacobsoni* Oud.: techniques and preliminary results. In R Cavalloro (Ed.). *Proceedings of the Meeting of the EC Experts' Group*, Udine 1988. CEC; Luxembourg. pp. 213–222.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES [2002] Concerted Action 3686: "Coordination in Europe of research on integrated control of Varroa mites in honey bee colonies". Technical guidelines for the evaluation of treatments for control of Varroa mites in honey bee colonies, Recommendations from the CA 3686. Document prepared during discussions within the CA3686 working group: "Evaluation of treatment for control of Varroa mites in honey bee colonies".

CORNMAN, R S; SCHATZ, M C; JOHNSTON, J S; CHEN, Y-P; PETTIS, J; HUNT, G; BOURGEOIS, L; ELSIK, C; ANDERSON, D; CROZINGER, C M; EVANS, J D (2010) Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BMC Genomics* 11: 602. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-602>

CURRIE, R W; GATIEN, P (2006) Timing acaricide treatments to prevent *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *Canadian Entomologist* 138: 238-252. <http://dx.doi.org/10.4039/n05-024>

CVMP [2001] CVMP guidelines on 'Statistical principles for veterinary clinical trials' (EMEA/CVMP/816/00).

CZEKÓNSKA, K (2009) The effect of different concentrations of carbon dioxide (CO₂) in a mixture with air or nitrogen upon the survival of the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 48: 67-71. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.48.1.13>

DAINAT, B; KUHN, R; CHERIX, D; NEUMANN, P (2011) A scientific note on the ant pitfall for quantitative diagnosis of *Varroa destructor*. *Apidologie* 42: 740-742. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-011-0071-3>

DAHLE, B (2010) The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 124-125. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.26>

DE GRAAF, D C; ALIPPI, A M; ANTÚNEZ, K; ARONSTEIN, K A; BUDGE, G; DE KOKER, D; DE SMET, L; DINGMAN, D W; EVANS, J D; FOSTER, L J; FÜNFHAUS, A; GARCIA-GONZALEZ, E; GREGORC, A; HUMAN, H; MURRAY, K D; NGUYEN, B K; POPPINGA, L; SPIVAK, M; VANENGELSDORP, D; WILKINS, S; GENERSCH, E (2013) Standard methods for American foulbrood research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK*, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.5.2.1.11>

DELFINADO-BAKER, M D; BAKER, E W (1974) Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina). *Journal of the Washington Academy of Sciences* 64: 4-10.

EVANS, J D (2000) Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology* 9: 1436-1438. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00998-3.x>

EVANS, J D; CHEN, Y P; CORNMAN, R S; DE LA RUA, P; FORET, S; FOSTER, L; GENERSCH, E; GISDER, S; JAROSCH, A; KUCHARSKI, R; LOPEZ, D; LUN, C M; MORITZ, R F A; MALESZKA, R; MUÑOZ, I; PINTO, M A; SCHWARZ, R S (2013) Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK*, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11> FERNANDEZ, N; COINEAU, Y (2007) *Varroa, the serial bee killer mite*. Atlantica; Biarritz, France. 264 pp.

FINNEY, D J (1949) The estimation of the parameters of tolerance distributions. *Biometrika* 36: 139-256.

FINNEY, D J (1971) *Probit Analysis* (3rd Ed.). Cambridge University Press; Cambridge, USA. 333 p. FORSGREN, E; BUDGE, G E; CHARRIÈRE, J-D; HORNITZKY, M A Z (2013) Standard methods for European foulbrood research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK*: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.5.2.1.12>

FREY, E; SCHNELL, H; ROSENKRANZ, P (2011) Invasion of Varroa destrukt or mites into mite-free honey bee colonies under the controlled conditions of a military training area. *Journal of Apicultural Research* 50(2): 138-144. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.50.2.05> FRIES, I (1991) Treatment of sealed honey bee brood with formic acid for control of Varroa jacobsoni. *American Bee Journal* 131: 313-314.

FRIES, I; HANSEN, H (1993) Biotechnical control of Varroa mites in cold climates. *American Bee Journal* 133: 435-438.

FRIES, I; CAMAZINE, S; SNEYD, J (1994) Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World* 75: 5-28.

FRIES, I; AARHUS, A; HANSEN, H; KORPELA, S (1991a) Comparisons of diagnostic methods for detection of *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies at low infestation levels. *Experimental and Applied Acarology* 10: 279-287.

FRIES, I; AARHUS, A; HANSEN, H; KORPELA, S (1991b) Development of early infestations of *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in cold climates. *Experimental and Applied Acarology* 11: 205-214.

FUCHS, S (1990) Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud. in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* 21: 93-99.

GARRIDO, C; ROSENKRANZ, P (2003) The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*. *Experimental and Applied Acarology* 31: 269-273 <http://dx.doi.org/10.1023/B:APPA.0000010386.10686.9f>

GARRIDO, C; ROSENKRANZ, P (2004) Volatiles of the honey bee larva initiate oogenesis in the parasitic mite *Varroa destructor*. *Chemoecology* 14: 193-197. <http://dx.doi.org/10.1007/s00049-004-0278-0>

GARRIDO, C; ROSENKRANZ, P; STÜRMER, M; RÜBSAM, R; BÜNING, J (2000) Toluidine blue staining as a rapid measure for initiation of oocyte growth and fertility in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 31: 559-566. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000146> GATIEN, P;

CURRIE, R W (2003) Timing of acaricide treatments for control of low-level populations of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and implications for colony performance of honey bees. *The Canadian Entomologist* 135: 749-763. <http://dx.doi.org/10.4039/n02-086>

GENERSCH, E; GISDER, S; HEDTKE, K; HUNTER, W B; MÖCKEL, N; MÜLLER, U (2013) Standard methods for cell cultures in *Apis mellifera* research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.02>

GENERSCH, E; VON DER OHE, V; KAATZ, H-H; SCHROEDER, A; OTTEN, C; BÜCHLER, R; BERG, S; RITTER, W; MÜHLEN, W; GISDER, S; MEIXNER, M; LIEBIG, G; ROSENKRANZ, P (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. Apidologie 41: 332-352. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010014>

GREATTI, M; MILANI, N; NAZZI, F (1992) Reinfestation of an acaricide-treated apiary by *Varroa jacobsoni* Oud. Experimental and Applied Acarology 16: 279-286. GUZMÁN-NOVOA, E; SANCHEZ, A; PAGE, J R R; GARCÍA, T (1996) Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L) and their hybrids to *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 27: 93-103. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19960204>

GUZMÁN-NOVOA, E; ECCLES, L; CALVETE, Y; MCGOWAN, J; KELLY P G; CORREA-BENÍTEZ, A (2010) *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. Apidologie 41: 443-450. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2009076>

HARBO, J R (1993) Worker-bee crowding affects brood production, honey production, and longevity of honey bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology 86: 1672-1678. HARRIS, J W (2001) A technique for marking individual Varroa mites. Journal of Apicultural Research 40: 35-37.

HARRIS, J W; HARBO, J R (1999) Low sperm counts and reduced fecundity of mites in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) resistant to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). Journal of Economic Entomology 92: 83-90.

HERRMANN, M; KANBAR, G; ENGELS, W (2005) Survival of honey bee (*Apis mellifera*) after with trypan blue staining of wounds caused by *Varroa destructor* mites or artificial perforation. Apidologie 36: 107-111. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004074>

HOOPINGARNER, R (2001) Biotechnical control of Varroa mites. In T C Webs ter; K S Delaplane (Eds). *Mites of the honey bee*. Dadant; Hamilton, USA. pp. 197–204.

HOPPE, H; RITTER, W (1988) The influence of Nasonov pheromone on the re cognition of house bees and foragers by *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 19: 165 –172.

HUMAN, H; BRODSCHNEIDER, R; DIETEMANN, V; DIVELY, G; ELLIS, J; FO RSGREN, E; FRIES, I; HATJINA, F; HU, F-L; JAFFÉ, R; KÖHLER, A; PIRK, C W W; ROSE, R; STRAUSS, U; TANNER, G; TARPY, D R; VAN DER STEEN, J J M; VEJSNÆS, F; WILLIAMS, G R; ZHENG, H-Q (2013) Miscellaneous stan dard methods for *Apis mellifera* research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neum ann (Eds) The COLOSS BEEBOOK , Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research . *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>

IMDORF, A; BOGDANOV, S; KILCHENMANN, V (2004) Wachsumstellung im Rahmen der Bioimkerei. *Schweizerische Bienen - Zeitung* 127: 15-18.

JENSEN, A B; ARONSTEIN, K; FLORES, J M; VOJVODIC, S; PALACIO, M A; SPIVAK, M (2013) Standard methods for fungal brood disease research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK : Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research . *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.13>

KANBAR, G; ENGELS, W (2003) Ultrastructure and bacterial infection of woun ds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by Varroa mites. *Parasitology Research* 90: 349– 354. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-003-0827-4>

KANBAR, G; ENGELS, W (2004) Visualisation by vital staining with trypan blue of wounds punctured by *Varroa destructor* mites in pupae of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 35: 25-29. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2003057>

KIRRANE, M J; DE GUZMAN, L I; RINDERER, T E; FRAKE, A M; WAGNITZ, J; WHELAN, P M (2012) A method for rapidly marking adult Varroa mites for us e in brood inoculation experiments. *Journal of Apicultural Research* 51(2): 212- 213. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.2.10>

KOENIGER, N; FUCHS, S; RAFIROIU, R (1987) Ameisensäure zur Behandlu ng von verdeckelter Brut. *Biene* 123: 286-289.

KOENIGER, G; KOENIGER; N; ANDERSON, D L; LEKPRAYOON, C; TINGEK , S (2002) Mites from debris and sealed brood cells of *Apis dorsata* colonies in Sabah (Borneo) Malaysia, including a new haplotype of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 33 (2002) 15–24. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2001005>

KRAUS, B (1990) Effect of honey-bee alarm pheromone compounds on the behaviour of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 21: 127-134. KRAUS, B (1993) Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees *Apis mellifera* L. of different ages. *Journal of Apicultural Research* 32: 57-64.

KRAUS, B (1994) Screening of substances for their effect on *Varroa jacobsoni* : attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of ethereal oils. *Journal of Apicultural Research* 33: 34-43.

KRAUS, B; HUNT, G (1995) Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud. populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Apidologie* 26: 283-290. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19950402>

KUENEN, L P S; CALDERÓNE, N W (2002) Positive anemotaxis by Varroa mites: responses to bee odour plumes and single clean-air puffs. *Physiological Entomology* 23: 255–264.

LE CONTE, Y; ARNOLD, G; TROUILLER, J; MASSON, C; CHAPPE, B; OURISSON, G (1989) Attraction of the parasitic mite Varroa to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science* 245: 638–639.

LEE, K; MOON, R D; BURKNES, E C; HUTCHINSON, W D; SPIVAK, M (2010 a) Practical sampling plans for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies and apiaries. *Journal of Economic Entomology* 103: 1039-1050. <http://dx.doi.org/10.1603/EC10037>

LEE, K; REUTER, G S; SPIVAK, M (2010b) Sampling colonies for *Varroa destructor*. Poster #168 www.extension.umn.edu/honeybees

LINDQUIST, E E; KRANTZ, G W; WALTER, D E (2009) Order Mesostigmata. In G W Krantz; D E Walter (Eds). *A manual of acarology*. Lubbock; Texas, USA .

LO, N; GLOAG, R S; ANDERSON, D L; OLDROYD, B P (2010) Amolecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the giant honey bee of the Philippines, *A. breviligula* Maa, and the plains honey bee of southern India, *A. indica* Fabricius, are valid species. *Systematic Entomology* 35: 226-233. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.00504.x>

LOBB, N; MARTIN, S J (1997) Mortality of the mite *Varroa jacobsoni* during or soon after the emergence of worker or drone honey bees. *Apidologie* 28: 367-374. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19970604>

LUCKMANN, W H; METCALF, R L (1982) The pest-management concept. In R L Metcalf; W H Luckmann (Eds). *Introduction to insect pest management* (2nd Ed.). John Wiley and Sons; New York, USA. pp. 1-31.

MACEDO, P A; WU, J; ELLIS, M D (2002) Using inert dusts to detect and assess Varroa infestations in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* 41: 3-7.

MANLY, B F J (1997) *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. Chapman and Hall; London, UK. 480 pp. MARTIN, S J (1994) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honey bee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology* 18: 87-100. <http://dx.doi.org/10.1007/BF000550033>

MARTIN, S J (1995a) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in the drone brood of the honey bee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology* 19(4): 199-210. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00130823> MARTIN, S J (1995b) Reproduction of *Varroa jacobsoni* in cells of *Apis mellifera* containing one or more mother mites and the distribution of these cells. *Journal of Apicultural Research* 34: 187-196.

MARTIN, S J (1998) A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecological Modelling* 109: 267-281. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3800\(98\)00059-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3800(98)00059-3)

MARTIN, S J; COOK, C (1996) Effect of host brood type on the number of offspring laid by the honey bee parasite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology* 20: 387-390. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00130551>

MARTIN, S J; KRYGER, P (2002) Reproduction of *Varroa destructor* in South African honey bees: does cell space influence Varroa male survivorship? *Apidologie* 33: 51-61. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2001007>

MARTIN, S J; MEDINA, L M M (2004) Africanized honey bees possess unique tolerance to Varroa mites. *Trends in Parasitology* 20: 112-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2004.01.001>

MARTIN, S J; HIGHFIELD, A C; BRETELL, L; VILLALOBOS, E M; BUDGE, G C; POWELL, M; NIKAIDO, S; SCHROEDER, D C (2012) Global honey bee v

iral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336: 1304-1306. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1220941>

MAUL, V; KLEPSCH, A; ASSMANN-WERTHMÜLLER, U (1988) Das Bannwab enverfahren als Element Imkerlicher Betriebweise bei starkem Befall mit *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 19: 139–154.

MEDINA, L M M; MARTIN, S J (1999) A comparative study of *Varroa jacobsoni* reproduction in worker cells of honey bees (*Apis mellifera*) in England and Africanized bees in Yucatan, Mexico. *Experimental and Applied Acarology* 23: 659-667. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006275525463>

MEDRZYCKI, P; GIFFARD, H; AUPINEL, P; BELZUNCES, L P; CHAUZAT, M-P; CLÄSEN, C; COLIN, M E; DUPONT, T; GIROLAMI, V; JOHNSON, R; LECO NTE, Y; LÜCKMANN, J; MARZARO, M; PISTORIUS, J; PORRINI, C; SCHUR, A; SGOLAstra, F; SIMON DELSO, N; STEEN VAN DER, J; WALLNER, K; A LAUX, C; BIRON, D G; BLOT, N; BOGO, G; BRUNET, J-L; DELBAC, F; DIOG ON, M; EL ALAOUI, H; TOSI, S; VIDAU, C (2013) Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK*, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.14>

MILANI, N (1995) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids - a laboratory assay. *Apidologie* 26: 415–429. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19950507>

MILANI, N (1999) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30: 229-234. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19990211> MILANI, N (2001) Activity of oxalic and citric acids on the mite *Varroa destructor* in laboratory assays. *Apidologie* 32: 127–138. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2001118> MILANI, N (2002) Chemical communication in the honey bee - Varroa relationship. In R Jones (Ed.). *Proceedings of the sixth European Bee Conference “Bees without frontiers, Cardiff, UK, 1 - 5 July 2002.* pp 74–85.

MILANI, N; CHIESA, F (1990) Some stimuli inducing oviposition in *Varroa jacobsoni* Oud. In *Proceedings of the International Symposium on recent research on bee pathology, Gent, Belgium.* pp. 34-36.

MILANI, N; DELLA VEDOVA, G (1996) Determination of the LC50 in the mite *Varroa jacobsoni* of the active substances in Perizin and Cekafix. *Apidologie* 27: 175–184. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19960306>

MILANI, N; DELLA VEDOVA, G (2002) Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids. *Apidologie* 33: 417–422. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2002028>

MILANI, N; DELLA VEDOVA, G; NAZZI, F (2004) (Z)-8-Heptadecene reduces the reproduction of *Varroa destructor* in brood cells. *Apidologie* 35: 265-273. NAVAJAS, M; ANDERSON, D L; DE GUZMAN, L I; HUANG, Z Y; CLEMENT, J; ZHOU, T; LE CONTE, Y (2010) New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie* 41: 181-193. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2009068>

NAZZI, F; MILANI, N (1994) A technique for reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. under laboratory conditions. *Apidologie* 25: 579-584

NAZZI, F; MILANI, N; DELLA VEDOVA, G; NIMIS, M (2001) Semiochemicals from larval food affect the locomotory behaviour of *Varroa destructor*. *Apidologie* 32: 149–155. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2001120>

NAZZI, F; MILANI, N; DELLA VEDOVA, G (2004) A semiochemical from larval food influences the entrance of *Varroa destructor* into brood cells. *Apidologie* 35: 403–410. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004023>

NAZZI, F; BORTOLOMEEZZI, R; DELLA VEDOVA, G; DEL PICCOLO, F; ANNOSCIA, D; MILANI, N (2009) Octanoic acid confers to royal jelly Varroa-repellent properties. *Naturwissenschaften* 96: 309314. <http://dx.doi.org/10.1007/s0014-008-0470-0>

NAZZI, F; BROWN, S P; ANNOSCIA, D; DEL PICCOLO, F; DI PRISCO, G; VARRICCHIO, P; DELLA VEDOVA, G; CATTONARO, F; CAPRIO, E; PENNACCHIO, F (2012) Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honey bee colonies. *PLoS Pathogens* 8(6): e1002735. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002735>

OIE (2008) Chapter 2.2.7. Varroosis of honey bees. In OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), vol. 1, OIE, (Sixth Edition). Paris, France. pp 424-430.

OLDROYD, B P (1999) Co-evolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honey bees. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 312-315. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01613-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01613-4)

OLDROYD, B P; WONGSIRI, S (2006) Asian honey bees: biology, conservation and human interactions. Harvard University Press.

OSTIGUY, N; SAMMATARO, D (2000) A simplified technique for counting *Varroa jacobsoni* Oud. on sticky boards. *Apidologie* 31: 707-716. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000155>

OUDEMANS, A C (1904) Note VIII. On a new genus and species of parasitic A cari. *Notes Leyden Museum* 24: 216-222.

PIRK, C W W; DE MIRANDA, J R; FRIES, I; KRAMER, M; PAXTON, R; MURRAY, T; NAZZI, F; SHUTLER, D; VAN DER STEEN, J J M; VAN DOOREMALE, N, C (2013) Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOS S BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.13>

RAMSEY, S; OCHOA, R; BAUCHAN, G; GULBRONSON, C; MOWERY J., et al. (2019) *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *PNAS* January 29 (116): 1792-1801. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>.

RICKLI, M; DIEHL, P A; GUÉRIN, P M (1994) Cuticle alkanes of honey bee larvae mediate arrestment of bee parasite *Varroa jacobsoni*. *Journal of Chemical Ecology* 20: 2437-2453.

RICKLI, M; GUÉRIN, P M; DIEHL, P A (1992) Palmitic acid released from honey bee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosophere. *Naturwissenschaften* 79: 320-322.

RITTER, W (1981) Varroa disease of the honey bee *Apis mellifera*. *Bee World* 62: 141-153. ROCHE LEXICON MEDIZIN (1999) Trypanblau, engl. trypan blue, zur Vitalprüfung (4th Ed.). Urban & Fischer Verlag; München, Germany.

ROSENKRANZ, P (1993) A bioassay for the test of the host finding behaviour of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 24: 486-488.

ROSENKRANZ, P; AUMEIER, P; ZIEGELMANN, B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S96-S119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

ROSENKRANZ, P; BARTALSKY, H (1996) Reproduction of Varroa females after long broodless periods of the honey bee colony during summer. *Apidologie* 27: 288-289.

SAMMATARO, D; DE GUZMAN, L; GEORGE, S; OCHOA, R (2013) Standard methods for tracheal mites research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK : Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.5.2.4.20>

SCHULZ, A E (1984) Reproduction and population dynamics of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. and its dependence on the brood cycle of its host *Apis mellifera* L. [in German]. *Apidologie* 15: 401-420. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19840404>.

SCHÄFER, M O; RITTER, W; PETTIS, J S; NEUMANN, P (2010) Winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*): The role of infestations with *Aethina tumida* and *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology* 103: 10-15. <http://dx.doi.org/10.1603/EC09233>

SHIMANUKI, H; CALDERONE, N W; KNOX, D A (1994) Parasitic mite syndrome: the symptoms. *American Bee Journal* 134: 827-828.

SOKAL, R R; ROHLF, F J (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research* (3rd Ed.). Freeman and Co; New York, USA. 887 pp.

SOLIGNAC, M; CORNUET, J-M; VAUTRIN, D; LE CONTE, Y; ANDERSON, D; EVANS, J; CROS-ARTEIL, S; NAVAJAS, M (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the western honey bee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceeding of the Royal Society B* 272: 411-419. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2004.2853>

STEINER, J; DITTMANN, F; ROSENKRANZ, P; ENGELS, W (1994) The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Invertebrate Reproduction and Development*. 25: 175-183.

STRANGE, J P; SHEPPARD, W S (2001) Optimum timing of miticide applications for control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis*

mellifera (Hymenoptera: Apidae) in Washington state, USA. Journal of Economic Entomology 94: 1324- 1331.

TOPOLSKA, G; GAJDA, A; POHORECKA, K; BOBER, A; KASPRZAK, S; SKU BIDA, M; SEMKIW, P (2010) Winter colony losses in Poland. Journal of Apicultural Research 49: 126-128. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.27>

TROUILLER, J; MILANI, N (1999) Stimulation of *Varroa jacobsoni* Oud. oviposition with semiochemicals from honey bee brood. Apidologie 30: 3-12.

VANENGELSDORP, D; HAYES JR, J; UNDERWOOD, R M; CARON, D; PETT IS, J (2011) A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. Journal of Apicultural Research 50: 1-10. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.01>

VANENGELSDORP, D; EVANS, J D; SAEGERMAN, C; MULLIN, C; HAUBRUE, E; NGUYEN, B K; FRAZIER, M; FRAZIER, J; COXFOSTER, D; CHEN, Y; UNDERWOOD, R; TARPY, D R; PETTIS, J S (2009) Colony Collapse Disorder: A descriptive study. PLoS ONE 4(8): e6481. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>

WARRIT, N; LEKPRAYOON, C (2011) Asian honey bee mites. In R Hepburn; S Radloff (Eds). Honey bees of Asia. Springer; Heidelberg, Germany. pp 347-368

WARRIT, N; SMITH, D R; LEKPRAYOON, C (2006) Genetic subpopulations of Varroa mites and their *Apis cerana* hosts in Thailand. Apidologie 37: 19-30. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2005051>.

WILKINSON, D; THOMPSON, H M; SMITH, G C (2001) Modelling biological approaches to controlling Varroa populations. American Bee Journal 141: 511-516.

WILLIAMS, G R; ALAUX, C; COSTA, C; CSÁKI, T; DOUBLET, V; EISENHARDT, D; FRIES, I; KUHN, R; MCMAHON, D P; MEDRZYCKI, P; MURRAY, T E; NATSOPOULOU, M E; NEUMANN, P; OLIVER, R; PAXTON, R J; PERNAL, S F; SHUTLER, D; TANNER, G; VAN DER STEEN, J J M; BRODSCHNEIDER, R (2013) Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>

ZIEGELMANN, B; LINDENMAYER, A; STEIDLE, J; ROSENKRANZ, P (2012).
The mating behaviour of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. Part 1: Preference behaviour of male mites in a laboratory bioassay. *Apidologie*.
. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-012-0182-5>