



## Trabajo Fin de Máster

### **Amitraz frente a *Varroa destructor*: Eficacia y detección de resistencia.**

Autor:

**Marta Bolois Arantegui**

Director:

M<sup>a</sup> Jesús Gracia Salinas

Facultad de Veterinaria

7 de Septiembre 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

A M<sup>a</sup> Jesús Gracia Salinas, tutora del trabajo, por su gran apoyo en este estudio, su paciencia y su optimismo en todo momento.

A Alfredo Sanz Villalba por su colaboración y por su persistencia para conseguir muestras para mi estudio.

A Chelo Ferreira González por su ayuda incondicional con la estadística.

A la Oficina Comarcal Agraria de Cariñena y en especial a Ángel Ortillés Aliaga por conseguirme contactos de apicultores.

A todos los apicultores que me han acompañado a sus colmenares y me han prestado sus colmenas desinteresadamente.

A los profesores y compañeros de la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias por su amabilidad, su ayuda y permitirme utilizar sus instalaciones, ayuda.

A Javier Bolois Arnal, mi padre, por su gran apoyo y por permitir que utilizara sus colmenas para el estudio.

A Antonio e Íñigo por acompañarme desinteresadamente a los colmenares y amenizarme las mañanas.

## RESUMEN

En la actualidad una de las enfermedades principales que afectan a la abeja es la Varroosis. Una enfermedad parasitaria de gran importancia en la apicultura por sus repercusiones económicas ya que si no se controla, puede ocasionar serias pérdidas de producción debido a un debilitamiento general de las colmenas e incluso la muerte de las colonias.

El tratamiento de esta enfermedad parasitaria es obligado por ley y queda establecido en el Real Decreto 608 / 2006 de 19 de mayo, por el que se establece y regula un Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel. Hasta ahora se está combatiendo con una gama muy reducida de productos. La aparición de ácaros resistentes a estos tratamientos hace necesario conocer la situación actual en España ya que las poblaciones de *V. destructor* pueden verse incrementadas y extenderse llevando graves consecuencias

En los últimos años el producto más utilizado en la Comunidad Autónoma de Aragón es el Apivar® cuyo principio activo es el amitraz. Es preciso conocer la situación actual de este producto, cual es la eficacia y si han aparecido resistencias.

En este trabajo se ha estudiado la población y parasitación de *Apis mellifera* por *Varroa destructor* en relación al colmenar, la estación del año y al estado fisiológico de las abejas en colmenares localizados en la Comunidad Autónoma de Aragón.

Además, ante las quejas de los apicultores sobre la falta de eficacia del amitraz, se llevó a cabo un ensayo de campo con el fin de conocer su eficacia en función del colmenar, estado fisiológico y estación del año. Los resultados obtenidos señalan una baja eficacia y reflejan una alta variabilidad en función de todos los parámetros estudiados.

Asimismo, con el fin de confirmar una posible resistencia, se realizaron ensayos in vitro para obtener la DL50 a partir de una cepa sensible de *V. destructor*. Esta cepa de referencia nos permite hacer comparaciones con poblaciones sospechosas. La DL50 fue 0,78 µg/ml y la DL95 de 6,38 µg/ml.

Por último, con los datos obtenidos en la cepa sensible se hicieron comparaciones con poblaciones sospechosas de haber desarrollado resistencias al amitraz. No se detectaron resistencias aunque es imprescindible continuar el estudio en una población más amplia.

# ÍNDICE

1. Introducción.....	4
1.1. Hospedador: <i>Apis mellifera</i> .....	4
1.2. Parásito: <i>Varroa destructor</i> .....	8
1.2.1. Etiología.....	8
1.2.2. Morfología.....	9
1.2.3. Ciclo biológico .....	11
1.2.4. Transmisión.....	15
1.2.5. Patología.....	15
1.2.6. Diagnóstico.....	17
1.2.7. Control.....	19
1.3. Resistencia de <i>Varroa. destructor</i> a los acaricidas.....	23
1.3.1. Evolución de las resistencias.....	24
1.3.2. Estrategias para evitar la aparición de Resistencias.....	26
2. Objetivos.....	29
3. Material y Métodos.....	30
3.1. Estado de la población y parasitación de <i>Apis mellifera</i> por <i>V. destructor</i> .....	30
3.2. Eficacia del amitraz (Apivar®) en condiciones de campo.....	32
3.3. Obtención de la DL <sub>50</sub> del amitraz en una cepa sensible de <i>Varroa destructor</i> ....	33
3.4. Resistencia al amitraz en la Comunidad Autónoma Aragonesa.....	35
3.5. Análisis estadístico.....	35
4. Resultados y discusión.....	37
4.1. Estado de la población y parasitación de <i>Apis mellifera</i> por <i>V. destructor</i> .....	37
4.2. Eficacia del amitraz (Apivar®) en condiciones de campo.....	39
4.3. Obtención de la DL <sub>50</sub> del amitraz en una cepa sensible de <i>Varroa. destructor</i> ....	41
4.4. Resistencia al amitraz en la Comunidad Autónoma Aragonesa.....	42
5. Conclusiones.....	44
6. Bibliografía.....	45

# 1. Introducción

## 1.1. Hospedador: *Apis mellifera*

La abeja doméstica o abeja melífera (*Apis mellifera*) es una especie perteneciente a los himenópteros, de la familia *Apidae*. Es la especie de abeja con mayor distribución en el mundo. Originaria de Europa, África y parte de Asia, vive en una forma social perfeccionada, y se caracteriza por la división y especialización del trabajo.

Según la revisión realizada por Prost (2001) y Biri y Alemani (1983) en un enjambre, que así se llama a una familia de abejas, hallamos tres tipos de individuos:

Un solo miembro, la reina (Figura 1), es la única hembra fértil y deposita los huevos de los cuales nacerán todas las demás abejas. La abeja reina no abandona la colmena, salvo durante el vuelo de fecundación, o cuando se produce un enjambre para dar lugar a una nueva colonia. Las reinas son criadas en celdas especiales de mayor tamaño y en posición vertical. A estas celdas se les denominan “realeras”. La alimentación en el periodo de cría se basa en jalea real; esta celda y alimentación especial, hace que una hembra se desarrolle como reina y no como obrera. La reina no posee aguijón, ya que éste es en realidad un ovopositor modificado.



Figura 1 .Abeja reina (Musseli 2009)

Los machos, también llamados zánganos, tienen por única función la de fecundar a la nueva reina. Los huevos que luego producirán zánganos no han sido previamente fecundados, por lo tanto tienen la mitad de la dotación genética de la especie. Éstos copulan con la reina en pleno vuelo. Tras finalizar la cópula, el zángano muere. La abeja reina copula con varios zánganos (más de 15) en el vuelo nupcial de fecundación (Figura 2).



*Figura 2. Zángano copulando con la reina (Quesada 2012).*

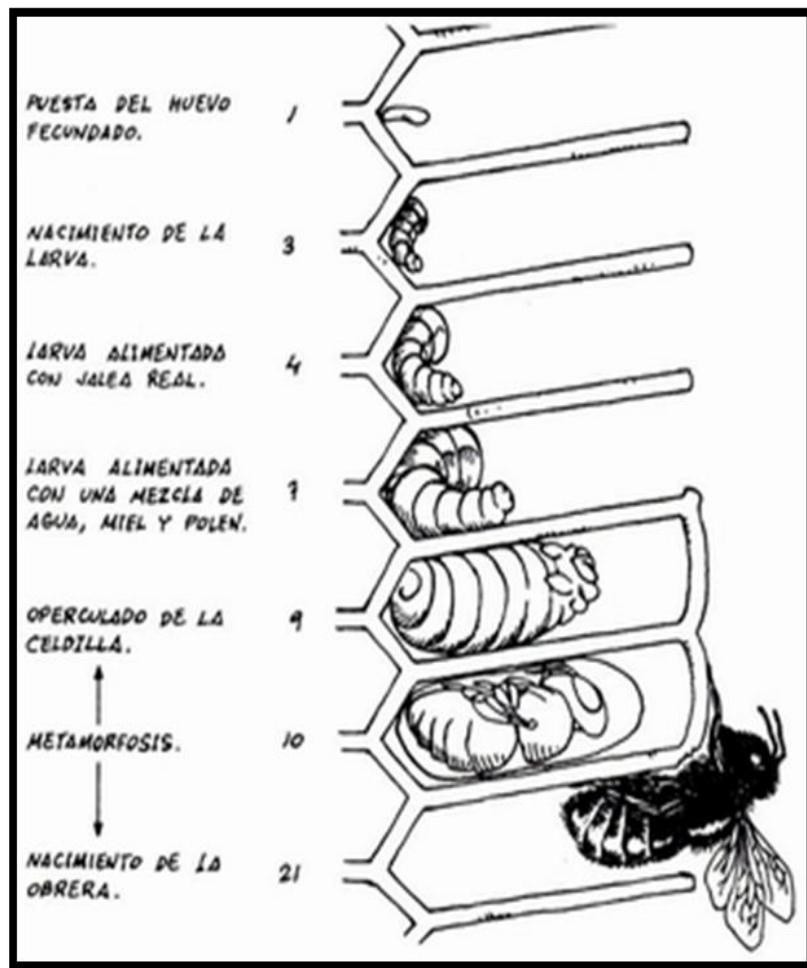
Las obreras (Figura 3), que componen en gran número dicho enjambre, tienen los cometidos más diversos: acopio de alimento (néctar y polen), transformación del néctar en miel, organización de la cámara de cría, cuidado de las larvas, defensa ante los saqueadores o insectos perturbadores, ventilación de la colmena y secreción de cera utilizada para construir los panales y para el mantenimiento.



*Figura 3. Abeja obrera con polen (Urkola 2011).*

La vida de la abeja melífera, es pues, de tipo comunitario.

La reina deposita sus huevos, en panales de cera que las obreras construyen con celdas hexagonales (Figura 4). La abeja presenta un desarrollo complejo holometábolo, su duración varía en función del tipo de individuo, siendo el de la reina de 16 días, las obreras 21 días y los zánganos 23 días. El huevo después del tercer día se transforma en una pequeña larva que es alimentada por las abejas nodrizas (abejas obreras jóvenes). Después de una semana, aproximadamente, dependiendo de la especie, la larva es sellada en su celda por las abejas nodrizas, produciéndose el estado de ninfa o pupa. En aproximadamente otra semana la ninfa emerge como una abeja adulta.



**Figura 4. Desarrollo de la abeja (Monteserín Real 2012).**

Una colmena, semi caliente en verano, tibia en invierno, relativamente húmeda, en la que los individuos evolucionan unos al lado de otros, es un lugar idóneo para el desarrollo de microorganismos y otros enemigos de la abeja.

Diferentes procesos pueden afectar a las abejas, entre ellos, los procesos víricos como el virus Sacbrood, el virus de las celdas reales negras y el de la parálisis viral. En cuanto a los procesos bacterianos podemos destacar la Loque americana (*Paenibacillus larva*), la Loque europea (*Melissococcus pluton*, *Bacillus alvei*, *Streptococcus apis*, *Bacillus orpheus* y otros) y la Hafniosis (*Hafnia alvei*). También se dan procesos producidos por hongos como por ejemplo la cría escayolada (*Ascospaera Apis*).

En cuanto a las patologías producidas por parásitos podemos encontrar varios agentes patógenos como los protozoos (*Nosema Apis* y *Malpighamoeba mellificae*), dípteros (*Braula coeca* y *Senotainia tricuspi*) y ácaros (*Acarapis woodi*, *Tropilaelaps clareae*, *Euvarroa sinhai*) y de mención especial la Varroasis (*Varroa destructor*) debido a su impacto en el sector apícola (Prost, 2001).

El sector apícola en España representa en términos cuantitativos entorno al 0,44% sobre la Producción Final Ganadera y el 0,17% de la Producción Final Agraria. Más allá de su importancia como actividad económica, la apicultura representa un papel fundamental en el sostenimiento del equilibrio ecológico y en el desarrollo rural. (Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente, 2007).

España se sitúa como primer país de la Unión Europea en número de colmenas, con 2.320.949, y produce entre 29.000 y 31.000 toneladas anuales de miel. Dos países europeos, Francia y Alemania, se reparten el 60% de las exportaciones de miel española. El mercado galo copa el 45% de las ventas al exterior, mientras que el enclave germano representa un 15% de las mismas (ICEX, España Exportación e Inversiones).

## **1.2. Parásito: *Varroa destructor***

### **1.2.1. Etiología**

La varroosis es una enfermedad causada por un ácaro parásito *Varroa destructor* perteneciente al Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, Clase Arachnida, Subclase Acarida, Orden Gamasida, Familia Varroidae

Afecta a las abejas en todos sus estadios de desarrollo alimentándose de su hemolinfa. Actualmente representa un grave problema en la apicultura mundial, en la que provoca masivas pérdidas, ya sea por mermas en los rendimientos individuales, o por mortalidad de colmenas (Rosenkranz et al, 2009).

*V. destructor* es de origen asiático y parasita dos especies de abejas: *Apis cerana* y *Apis mellifera*. Sobre *A. cerana* el ácaro no causa daños graves, fundamentalmente debido a que sólo se reproduce en celdas de cría de zángano y a un comportamiento de defensa que poseen las abejas obreras.

Por el contrario, la interacción entre *V. destructor* y *A. mellifera* no se encuentra en equilibrio. En esta especie el ácaro tiene la capacidad de reproducirse tanto en celdas de zángano como de obreras. La reproducción es mucho mayor y por lo que puede llegar a causar la muerte de las colmenas.

El ácaro procedente del sudeste asiático se extendió en pocos años por una amplia extensión geográfica. La aparición de *V. destructor* en Europa, a finales de la década de los años setenta (denominada en aquel momento como *Varroa jacobsoni*), causó en la mayoría de los países importantes pérdidas en la cabaña apícola. Su presencia fue comunicada en Grecia en 1975, en Alemania en 1977, en Italia en 1980, en Francia en 1982, en Holanda 1983 y en España el 5 de noviembre de 1985 en Puigcerdá, localidad

de Gerona localizada en el Pirineo (declarada oficialmente el 28 de febrero de 1986). En Aragón se detecta por primera vez en el mes de Octubre de 1987 en Noguera (Teruel) y rápidamente en toda comunidad autónoma (Gomez Pajuelo 2001). Actualmente el parásito tiene una distribución mundial.

Ningún otro patógeno ha tenido un impacto comparable en la investigación de la apicultura durante su larga historia.

### 1.2.2. Morfología

*V. destructor* muestra dimorfismo sexual (Infantidis, 1983) con varias adaptaciones morfológicas a su hospedador.

El macho adulto se caracteriza por ser translúcido, piriforme con un tamaño de 750-900 µm x 700-900 µm (Figura 5). Está muy poco esclerotizado y se localiza solamente en el interior de las celdas de cría, no se alimenta y vive solo unos pocos días. Sus quelíceros no tienen forma de cuchillo como en las hembras, sino que son en forma de tubo y están adaptados para transferir los espermatozoides dentro de las hembras.

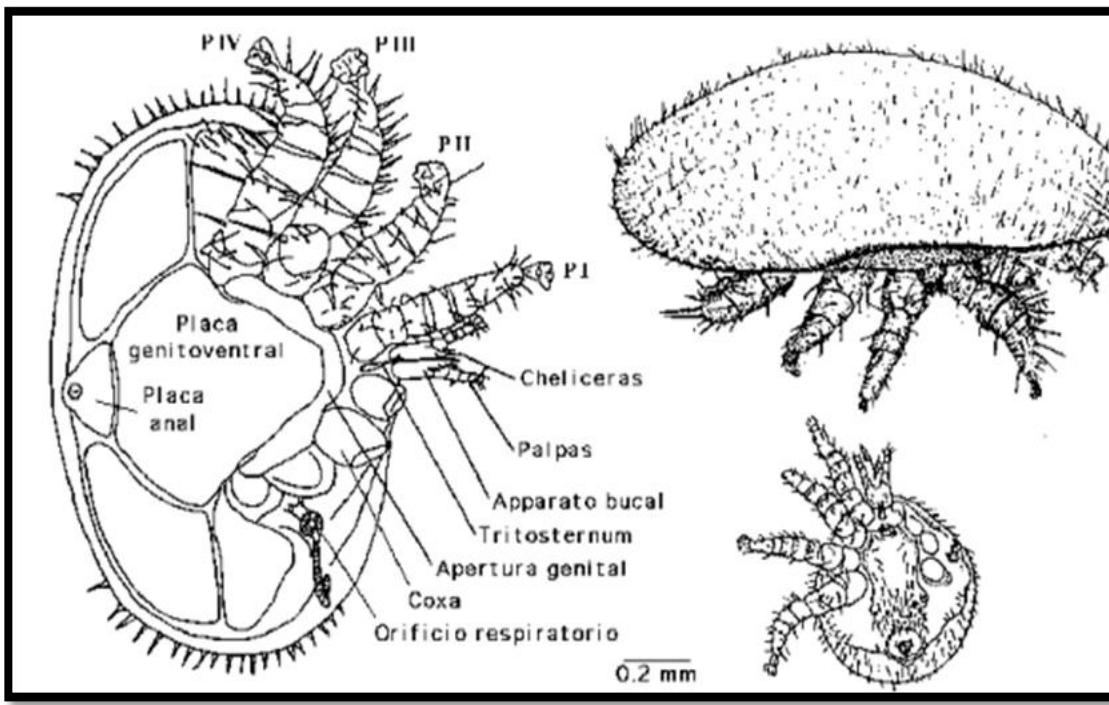


Figura 5. Macho adulto de *V. destructor* (Martín 2010).

La hembra adulta es más grande que el macho. La forma del cuerpo es elipsoidal. Es más ancho que largo, con un tamaño aproximado de 1100 µm x 1600 µm (Figura 6). La adulta posee una coloración marrón rojiza (Figura 6) mientras que los estados juveniles tienen una coloración menos acentuada. La superficie dorsal está muy bien esclerotizada y densamente cubierta de sedas de longitud uniforme. Los márgenes laterales presentan sedas de mayor tamaño y en forma de espinas. Los quelíceros tienen forma de cuchillo y conforman una estructura particularmente adaptada para atravesar la cutícula de las abejas. Las patas terminan en ambulacros bien desarrollados, membranosos, con fuertes escleritos basales y sin uñas, perfectamente adaptados para adherirse a las abejas (Figura 7).



**Figura 6. Hembra adulta *V. destructor* (San Martín 2010)**



**Figura 7.** Hembra *V. destructor* adulta en vista ventral (a la izquierda) y anterior (a la derecha); macho adulto en vista ventral (abajo) (Vandame et al 1996).

### 1.2.3. Ciclo biológico

El individuo clave del ciclo de desarrollo de *V. destructor* es la hembra adulta. Su vida alterna entre la fase reproductora y la fase forética.

La hembra adulta se reproduce exclusivamente en una celda de cría, generalmente después de un periodo forético (Kuenen and Calderone, 1997). La entrada en la cría debe ocurrir a una edad de cría precisa, y constituye un punto crítico en la vida de *V. destructor*. Entrar demasiado temprano significa un riesgo importante de ser detectada y retirada por las abejas antes la operculación de la cría. Entrar tarde no le es posible, ya que la cría es operculada; es decir, herméticamente cerrada a toda entrada o salida.

Las hembras infestan la cría de obreras cuando las larvas pesan más de 100 mg; es decir, durante las 15 horas anteriores a la operculación. Infestan la cría de zángano cuando las larvas pesan más de 200 mg; es decir, durante las 45 horas anteriores a la operculación.

Inmediatamente después de la operculación de la celda y durante 36 horas, la larva de abeja se alimenta. La primera alimentación de la ésta larva constituye una señal para la hembra, quien sale de la fase inmóvil, sube sobre la larva y se alimenta por primera vez. Durante la fase de pupa, la hembra se desplaza rápidamente sobre la larva, para

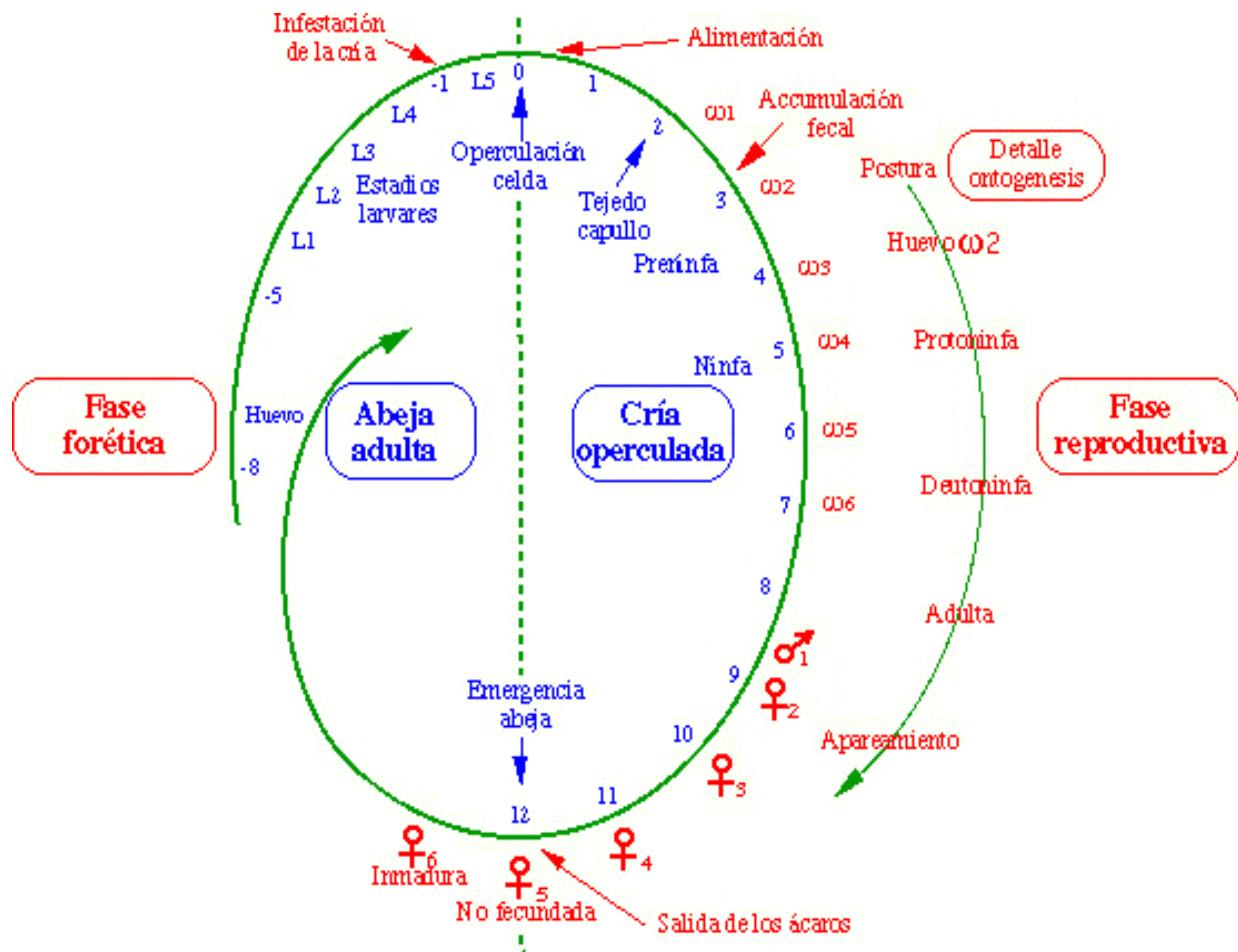
evitar ser aplastada contra la pared de la celda, mientras empieza a alimentarse y a defecar.

Después de haberse alimentado sobre la abeja, la hembra realiza su primera puesta, 70 horas después de la operculación (Infantidis et al, 1983; Steiner et al., 1994). A lo máximo, la hembra pondrá 6 huevos de esta manera, con un intervalo medio de 30 horas (Garrido and Rosekranz, 2003; Martin, 1994).

Algunas horas después de la puesta, se produce el desarrollo de la larva. Esta larva se transforma sucesivamente en protoninfa, deutoninfa, y finalmente en adulto. El desarrollo completo tarda alrededor de 130 horas para una hembra, 150 horas para un macho. Este desarrollo está muy afectado por una mortalidad juvenil muy elevada, particularmente de las deutoninfas. En promedio, sólo 1.45 hembras llegarán al edad adulta en una celda de abeja obrera, contra 2.2 en una celda de zángano (Infantidis, 1983).

El apareamiento sólo puede ocurrir entre el macho y sus hermanas, y es entonces consanguíneo. El macho se aparea con la primera hembra tan pronto como llega a la fase adulta. El apareamiento puede ser repetido hasta 9 veces. Cuando la segunda hija llega a ser madura, el macho abandona la primera hija para aparearse con ella. Si una tercera hija llega a ser adulta, se repite el mismo escenario.

En el momento en que emerge la abeja, una gran parte de la descendencia de *V. destructor* se queda en la celda. Las hembras fecundadas, tan pronto como salen de la celda, tratan de subir sobre las abejas, y así se vuelven foréticas. Los estados inmaduros y el macho, privados de un aparato bucal que les permita alimentarse de las abejas, sobrevivirán poco tiempo (Donzé et al., 1996).



**Figura 8. Sincronización de los ciclos de desarrollo de la abeja y de *V. destructor*. En azul: desarrollo de la abeja (los números indican el número de días separando de la operculación). En rojo: desarrollo del ácaro (Vandame et al 1996).**

*V. destructor* tiene una preferencia muy alta por las abejas nodrizas (Figura 9), más susceptibles de acercarse a la cría, lo que ofrece más oportunidades a los ácaros para entrar en las celdas.



**Figura 9. Ácaro sobre abeja nodriza (Anderson and Trueman 2000).**

El número de ciclos reproductivos realizados por cada hembra todavía no se conoce bien. En condiciones artificiales, se demostró que una hembra puede realizar hasta 7 ciclos, así produciendo un potencial de 35 descendientes. Este número, sin embargo, es menor en condiciones naturales, ya que sólo el 30% de las hembras realizan un primer ciclo reproductivo, 21% un segundo ciclo y 14% un tercer ciclo.

Las hembras viven aproximadamente 30-40 días durante períodos reproductivos y hasta varios meses en ausencia de cría de abejas. En presencia de cría, los ácaros sufren más desgaste debido a la reproducción y su vida es más corta. Cuando la abeja que ha sido parasitada nace, la que inició la infestación muere en la celda o poco después si ha llegado a su edad máxima. También mueren pronto los estados inmaduros poco pigmentadas y los machos. Por eso, cuando hay cría, se recogen en los dispositivos del fondo de la colmena tanto hembras oscuras (viejas), como hembras claras y de coloración media (inmaduras jóvenes). Podemos considerar que cada día muere del 1 al 3% de la población de *V. destructor* de la colonia de abejas en presencia de cría. Cuando hay ausencia de cría en la colonia de abejas, el ácaro permanece adherido a las abejas y, como tiene menos desgaste vital que cuando se reproduce, puede sobrevivir durante varios meses. Se asume que cada día muere del 0,3 al 0,5 % de la población del ácaro cuando no hay cría en la colonia (Calatayud Tortosa, Fernando, 2004).

## **1.2.4. Transmisión**

El paso de unas colmenas a otras está mediado por una serie de mecanismos complejos. La única capaz de contaminar una colmena de forma natural y comenzar a reproducirse es la hembra adulta, ya que es la única que parasita a las abejas adultas, y las únicas que abandonan la colmena. Las hembras foréticas de abejas cosechadoras, constituyen el factor principal de la diseminación de la especie, ya que aprovechan la deriva de las cosechadoras y del pillaje para invadir nuevas colmenas. De esta manera, durante un día de gran actividad, hasta 70 ácaros por día pueden llegar a una nueva colmena.

La diseminación se produce por la deriva y el pillaje a través de las obreras.

Deriva: las abejas al regresar a su colmena pueden confundirse y penetrar en otra diferente, y si son portadoras de alimentos se le permite la entrada, de este modo, el ácaros que pueden transportar se introduce en la nueva colmena.

Pillaje: cuando una colmena está muy débil y no puede defenderse, las colmenas vecinas entrar a robar las provisiones. Se ha demostrado que los ácaros abandonan a las abejas que son atacadas y se fijan en las atacantes (Sakofski, 1989).

Los zánganos, en condiciones climáticas favorables, son admitidos en cualquier colmena aunque no sea la de su nacimiento, por tanto son un elemento importante en la diseminación.

## **1.2.5. Patología**

La abeja se ve afectada de distintos modos, siendo los estados de larva y pupa los más sensibles.

La pérdida de hemolinfa durante el desarrollo ontogénico en la celdilla provoca gran pérdida de peso de la larva. Ésta pérdida depende del número de ácaros que haya en el interior de la celdilla. Pero incluso un solo ácaro puede provocar de media una pérdida del 7% del peso de la larva (De Jong et al., 1982; Schatton-Gadelmayer and Engels, 1988). Se ha demostrado en zánganos parasitados que dependiendo de su tasa de infestación, presenta una pérdida entre el 11-19% de su peso (Duay et al., 2003), lo que conduce a la disminución del rendimiento de vuelo (Duay et al., 2002). Las obreras que fueron parasitadas durante su desarrollo, comienzan antes a pecorear y se reduce significativamente el periodo de vida (Adam et al., 2004; De Jong et al., 1982; Schneider and Drescher, 1987). Las abejas pecoreadoras parasitadas ven disminuida su capacidad de aprendizaje no asociativo, las ausencias en la colonia se prolongan y

disminuye la tasa de regreso a la colonia (Kralj and Fuchs, 2006; Kralj et al., 2007) lo que puede ser debido a una reducción de la capacidad de conducción orientación.

La capacidad reproductiva se ve mermada de dos modos: los zánganos que han sido parasitados durante su desarrollo tiene menos oportunidades para aparearse (Duay et al., 2002) y las colonias infectadas producen menos enjambres (Fries et al., 2003; Villa et al, 2008).

Cuando hay bajas tasas de infestación los síntomas no son visibles y la infestación pasa desapercibida. Cuando se dan infestaciones moderadas el crecimiento de la población puede verse afectado, y por consiguiente la producción de miel.

La muerte de la colmena está asociada al “síndrome de la varroa” caracterizado por cría dispersa, abejas inválidas (abdomen acortado y alas deformes), pérdida eventual del comportamiento social como el comportamiento de higiene y la atención a la reina, y una rápida pérdida de población en la colmena.

*V. destructor* es un vector de varios virus que afecta a la abeja melífera. De 18 virus que han sido aislados de la abeja (Chen and Siede, 2007) muchos de ellos pueden ser vectorizados por el ácaro. Esto ha sido demostrado en el virus Kashmir (KVB), el virus de Sacbrood (SBV), parálisis aguda de la abeja (ABPV) y el virus de las alas deformes (DWV) (Figura 10) (Boecking and Gennersch, 2008). Antes de la aparición de *V. destructor*, los virus de las abejas estaban considerados como un problema de poca importancia para la salud de la abeja (Allen et al., 1986; Bailey and Ball, 1991; Bowen-Walker et al., 1999; Yue and Gennersch, 2005). Además, el ácaro, provoca inmunodepresión en las pupas parasitadas, provocando la activación de los virus patentes (Yang and Cox-Foster, 2007).

Se da por sentado que en la fase crítica final de una colonia de abejas parasitada por *V. destructor* con los típicos síntomas es un efecto de la infección por virus en vez de la acción directa por la parasitación del ácaro.



**Figura 10. Virus de las alas deformes (DWV)(Roserkranz et al 2010)**

La parasitación por *V. destructor* tiene efectos sinérgicos sobre otros patógenos, en especial con *Nosema ceranae* y los efectos adversos de los pesticidas. Una interacción destacable es el llamado Síndrome de despoblamiento de la colmena (Colony Collapse Disorder) (Oldroyd, 2007). La causa exacta no ha sido averiguada, pero parece que sea por causa multifactorial (parasitación, pesticidas, mal manejo, clima, etc.). Desafortunadamente, los efectos sinérgicos son muy difíciles de analizar experimentalmente. Por lo que hay muy pocos estudios disponibles que incluyan el efecto de “Varroa + X”.

### **1.2.6. Diagnóstico**

#### **Diagnóstico clínico:**

La infestación por *V.destructor* da lugar a manifestaciones clínicas evidentes, lo cual permite en muchos casos la realización de un diagnóstico clínico. Sin embargo, en ocasiones los síntomas tardan cierto tiempo en aparecer, y normalmente tras su aparición la muerte de la colmena es más o menos inminente. Por este motivo es importante realizar el diagnóstico parasitológico antes de la aparición de síntomas evidentes.

### **Diagnóstico parasitológico:**

Examen de abejas adultas: consiste en la observación minuciosa de las obreras que se encuentren sobre los cuadros, aunque esto es muy difícil.

Para facilitar la búsqueda, se toman muestras de 200-500 abejas y se introducen en una disolución de agua y alcohol. Esto se hace pasar por un tamiz para separar los ácaros de las abejas. De esta forma pueden contarse los ácaros y las abejas para hallar el porcentaje de infestación.

Examen de la cría operculada: se toma muestra de panal con cría operculada. Se quita el opérculo de cada una de las celdillas y se extrae la larva de abeja. Sobre el cuerpo claro de la larva destaca claramente el ácaro (Figura 11). Contando el número de ácaros y dividiéndolo por el número de larvas puede calcularse el porcentaje de infestación.



**Figura 11. *V. destructor* sobre cría de abeja (San Martín 2010)**

Debe hacerse el diagnóstico en el mayor número de colmenas posible de cada colmenar ya que, si bien la presencia del ácaro en una colmena implica el riesgo para todas las próximas, el porcentaje de infestación puede ser muy diferente en cada una de ellas (Accorti et al., 1989).

### **Diagnóstico químico:**

Consiste en la introducción de un acaricida en la colmena y recogida de los ácaros muertos en el fondo de la misma (Barbattini, 1986). Debe introducirse bajo los cuadros un papel de color blanco e impregnante para que los ácaros destaquen por su color y queden adheridos. Una vez colocado el papel, se introduce el acaricida y se espera el tiempo correcto según el producto empleado para no infravalorar la infestación. Si el

tiempo de espera es de más de 24 horas es necesario proteger el papel con una rejilla para que las abejas limpiadoras no extraigan los ácaros. El inconveniente de este método la introducción innecesaria de un acaricida, en cambio la ventaja es que si el diagnóstico es positivo el procedimiento sirve como tratamiento (Robaux, 1986).

#### **Mortalidad Natural:**

Este método se basa en la recogida y observación de los ácaros muertos por envejecimiento (Accorti et al., 1989).

Se usa el mismo dispositivo que le utilizado para el diagnóstico químico. Es imprescindible poner rejilla, ya que el papel debe permanecer mucho tiempo en la colmena.

#### **Diagnóstico diferencial:**

La *V. destructor* puede confundirse únicamente con otro parásito de las abejas, de carácter inofensivo, *Braula coeca*. Es un díptero muy modificado. Puede aparecer en el fondo de la colmena en un diagnóstico químico, o en el diagnóstico de las abejas adultas. Nunca aparecería en las celdas de cría ya que se reproduce en el interior de las celdas de la miel. Posse un cuerpo más largo que ancho y más abultado que el de la varroa, además posee tres pares de extremidades muy robustas (Robaux, 1986).

### **1.2.7. Control**

La primera detección oficial de *V. destructor* en un país es seguido por una intensa actividad de científicos del campo de la apicultura, autoridades veterinarias con el fin de controlar la extensión de ácaro y prevenir la muerte de las colmenas. Durante la primera fase, el daño y la pérdida de colonias es común debido al desconocimiento de métodos de control. Los apicultores deben incluir el tratamiento del parásito en su práctica apícola, los que no lo hagan, perderán sus colonias. Tras varios años la actividad se va normalizando. Sin embargo, periódicamente hay pérdidas de un 30% o más de colmenas y esto parece ser inevitable (Genersch 2008).

Sin ninguna duda, la mayoría de las colonias de *A. mellifera* en climas templado se verán dañadas o incluso morirán si no son controladas o si no se llevan a cabo métodos apropiados de control. Actualmente, los apicultores utilizan un reducido abanico de sustancias químicas, con sus métodos de aplicación y técnicas para mantener al ácaro bajo control.

## Acaricidas sintéticos

En los últimos 15 años, los acaricidas más utilizados contra *V. destructor* pertenecen a tres grandes grupos: piretroides (fluvalinato y flumatrin), formamidinas (amitraz) y organofoforados (coumafós) (Milani and Barbattini, 1988; Milani and Lob 1998, Ritter, 1988).

Aunque el fluvalinato fue el primero en su utilización en la C.A.A, la aparición de resistencias ante este producto hizo que se recurriera al amitraz.

El amitraz es una molécula orgánica que fue sintetizada en Gran Bretaña en 1970. Pertenece a la familia de las formamidinas que se caracterizan por poseer interesantes propiedades acaricidas.

Nombre químico: *N*-metil bis (2,4-xililimino metil) amina.

Estructura química (Figura 12):

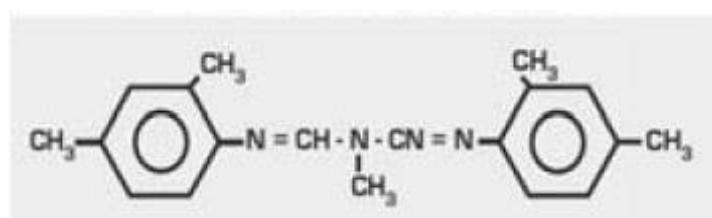


Figura 12. Estructura química del amitraz.

Su mecanismo de acción se basa en que este componente se comporta como un antagonista octopaminérgico. La octopamina es una amina adrenérgica semejante a noradrenalina y que en los invertebrados actúa como un neurotransmisor o modulador de la actividad neuromuscular. La acción letal del amitraz es el resultado de una estimulación continua al ocupar receptores octopaminérgicos, provocando trastornos locomotores y la muerte del parásito. Por otro lado, posee un mecanismo parecido a los piretroides, el amitraz retarda la despolarización axónica por acción directa sobre los canales de sodio (Burgat-Sacaze y col., 1988; Giordani y col.. 1986).

Aunque es muy tóxico para los ácaros, lo es poco para numerosos grupos de insectos como el de las abejas. Estas propiedades convierten al amitraz en interesante candidato para luchar contra la varroasis.

Los primeros ensayos contra *V. destructor* desarrollaron en Túnez en 1980. posteriores estudios se realizaron en Francia con el fin de precisar las dosis, el modo de administración y la posible asociación con otras sustancias (Bussieras et al 1981).

En España ha sido usado desde 1983, como acaricida en productos como el "Taktic" (desaparecido), "Acadrex 20", "Coyote", "Ectaz" disuelto en grasas (vaselina o aceite).

Frente a *V. destructor* se ha comercializado como vaporizaciones con "Furetto" y "Antivarroa Shering" y en la actualidad la forma comercializada del amitraz es el "Apivar®" (Figura 13), registrado para abejas en 1995 en Europa, y en 1999 en España (Gomez. Pajuelo, 2011).



### **Figura 13. Forma comercializada del Amitraz.**

Hasta la fecha se han señalado resistencias a este producto en Croacia, Francia y Estados Unidos (Dujin et al 1991, Milani 1999; Elzen et al. 1999; Rodriguez-Dehaibes et al. 2005).

Como sustancias lipofílicas que son, se absorben por la cera de las abejas (Bogdanov et al., 1998; Wallner, 1999,2000), lo que supone que la miel está fuera de peligro de contaminación. Sin embargo, estos acaricidas también presentan algunas desventajas:

- Pueden dañar a las abejas si son expuestas simultáneamente a múltiples componentes almacenados en la cera de abejas (Chauze et al., 2009; Johnson et al., 2009 Wallner, 2005).
  - Pueden contaminar levemente la miel y otros productos apícolas (Lodesani et al., 2008; Martel et al., 2007; Nasr and Wallner, 2003; Schroeder et al., 2004). En el caso del coumafós, se encontraron residuos, que excedían el Límite Máximo Residual (LMR) establecido en la EU. La contaminación de la cera puede persistir tras el reciclaje comercial.
  - Se van acumulando en cera tras repetidos tratamientos. Debido a esto se han señalado algunos efectos sobre los ácaros en las celdas operculadas (Fries et al., 1998). Un aspecto importante en el que el uso indiscriminado Es posible

que provoquen resistencias de los ácaros frente a los tratamientos provocando grandes daños en el control de la varroosis.

### **Acaricidas naturales: Ácidos orgánicos y aceites esenciales**

Los ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido oxálico, ácido láctico) y aceites esenciales (timol), representan el conjunto de componentes naturales que se utilizan para el control de *V. destructor*.

Las ventajas de estos componentes naturales son:

- Suficiente eficacia frente a *V.destructor*, con el acido fórmico como el único capaz de matar los ácaros alojados en celdas operculadas (Fries, 1991).
- Bajo riesgo de acumulación de residuos en los productos apícolas (Bogdanov, 2006, Bogdanov et al., 1998, 2002; Floris et al., 2004).
- Baja probabilidad obtener resistencias tras repetidos tratamientos.

Sin embargo, hay algunas desventajas de estos componentes naturales. El ácido láctico y el ácido oxálico deben aplicarse en condiciones en que la colmena está sin cría (Emsen and Dodologlu, 2009; Higes et al., 1999) y por lo tanto, no es conveniente su aplicación en regiones que no haya parada de puesta de cría durante el invierno, como es el caso de España. La eficacia de algunos componentes depende de la presión de evaporación dentro de la colmena. Por lo que el clima, las condiciones dentro de la colmena y el modo de aplicación tiene que ser cuidadosamente correcta para conseguir un efecto óptimo. Esto es crucial para el “índice terapéutico”, el rango entre eficacia contra el parásito y toxicidad para el hospedador es muy amplio. Esto debe tenerse en cuenta para el desarrollo de tratamientos que contengan estos componentes. En general esto significa que los efectos de los ácidos orgánicos y aceites esenciales son mas variables comparado con lo anteriores acaricidas descritos.

### **Métodos biológicos y biotécnicos**

Los métodos biológicos incluyen peculiaridades de la biología del hospedador y el parásito. Estos métodos son la aproximación más sostenible al tratamiento del ácaro. Sin embargo, no existen métodos biológicos de tratamiento que sean completamente efectivos en la actualidad.

Entre los métodos biológicos podemos señalar El “método de la colmena trampa” que consiste en retirar a los ácaros de las celdillas de cría operculada. De esta manera se concentra en la cría de zángano que puede ser eliminado sin causar problemas a la colonia. La retirada de 3-4 celdas operculadas de cría de zángano al principio de la temporada de cría reduce la población de varroa en un 50-70%.

Otros métodos bioténicos que se han descrito son la utilización de cera estampada con celdas de menor tamaño al convencional.

Otro método como la colocación de una red de alambre en el fondo de la colmena, su eficacia no está probada pero este método es muy útil para estimar la población del ácaro y para controlar la eficacia de los tratamientos. Es un método fácil, barato y rápido. Dependiendo de la época y de la cantidad de cría que haya, la aparición de 1-10 ácaros señala la necesidad de tratamiento en esa colmena (Esta cifra se corresponde a una población de 2000-3000 ácaros).

Por último, otro método prometedor es el uso de organismos antagonistas (parasitarios o patogénicos). Es decir, provocar una infestación natural a modo de control. Se ha utilizado con organismos como hongos entomo-patogénicos del género *Metarhizium*, *Beauveria* y *Verticillium*, que afectan a los ácaros.

### **1.3. Resistencia de *V. destructor* a los acaricidas.**

La resistencia a insecticidas o acaricidas es definida por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) como “el desarrollo de la habilidad de una cepa de un determinado organismo a tolerar dosis de un tóxico que deberían ser letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie” (Gevrey, 1988).

Puede sospecharse la existencia de un fenómeno de resistencia cuando animales que han sido tratados de la misma forma durante varios años están más infestados de lo que cabría esperar. Sin embargo, antes hay que descartar otras posibles causas que podrían haber dado lugar a un aumento de la población de ácaros como un manejo incorrecto, condiciones ambientales especialmente favorables para el desarrollo del artrópodo, aplicaciones incorrectas del producto (errores en la preparación, fallos mecánicos en la aplicación...) ó reinfecciones a partir de zonas no tratadas.

Los ácaros tienden rápidamente a desarrollar resistencias frente a los acaricidas (Mabus and Connor 1988). En particular, la resistencia frente a piretroides, especialmente al fluvalinato que ha tenido un serio impacto económico en la apicultura a nivel mundial (Goodwin et al. 2005).

Este fenómeno es debido a un cambio en la composición genética de una población como consecuencia directa de los efectos selectivos del tóxico y se transmite a la descendencia por los individuos que son portadores de la misma. Así pues, no se trata de un proceso de acostumbramiento a un medicamento sino de la preexistencia de un gen en el patrimonio genético de un individuo. Cuando una dosis suficientemente elevada de acaricida se aplica a una población de ácaros que comprende un cierto número de individuos resistentes, sólo sobrevivirán y se reproducirán los portadores del gen que les confiere la inmunidad hacia la sustancia tóxica (Bassand, D., 1993). Los genotipos tolerantes aparecen en un pequeño número

de ácaros debido a mutaciones puntuales y raras en su material genético, responsables de la producción o liberación de más enzimas detoxicantes principalmente.

Al aplicar el tratamiento los ácaros resistentes son seleccionados, al mismo tiempo que los sensibles se ven desfavorecidos. Al aplicar el acaricida se mueren los individuos susceptibles por lo que una gran población de ácaros en pocas generaciones puede desarrollar resistencias si además están expuestos repetidamente a un acaricida (Eischen, 1995). Por lo tanto, cuantas más generaciones de ácaros sometidos a la presencia de un solo acaricida, más alta será la proporción de población resistente. En el caso de aumentar la dosis y la frecuencia de aplicación no sólo no se eliminan los individuos que sobreviven sino que además se producirá una mayor presión y una mayor selección de individuos resistentes, aumentando éstos (Kunz y Kemp, 1994).

También existen distintos factores operativos, resultado de una actividad humana, que favorecen la aparición de resistencias como son la utilización de un solo producto de forma continuada para el control de la enfermedad, la persistencia de un compuesto en la colmena durante un espacio largo de tiempo, agravado por el hecho de que muchos apicultores no retiran el soporte al terminar el tratamiento. Así mismo, la reutilización abusiva de tiras con acaricida, puede determinar la aplicación de unas dosis bajas de producto activo que facilite la aparición de individuos resistentes (Higes *et al*, 1998).

La administración del principio activo de forma artesanal, puede facilitar la aparición de ácaros resistentes porque la dilución de los productos de uso agrícola se realiza de forma subjetiva sin atender a una posología estandarizada (Watkins, 1996). En la mayoría de los casos, se utilizan diferentes tipos de maderas y distintos tamaños para fabricar las tablillas, lo que va a dar lugar a diferencias de absorción y por tanto a distintas cantidades de materia activa retenidas.

Así mismo va a influir en la aparición de resistencias el método de conservación de las tablillas hasta su utilización, el número de tablillas colocadas en la colmena, el tiempo de permanencia de las mismas en su interior y los períodos estacionales en los que se aplican los tratamientos, que suelen alejarse de lo que sería “recomendable”.

### **1.3.1 Evolución de las resistencias**

Durante la década pasada, químicos como los piretroides (fluvalinato, flumetrina, acrinatrina), formamidina (amitraz), organofosforados (coumafós), han sido usados por los apicultores para el control del ácaro, con los que se consiguió mantener la parasitosis controlada de una manera simple y eficaz.

Desafortunadamente el uso indiscriminado de estos productos, junto con la utilización de forma masiva de productos artesanales, mucho más rentables, elaborados por los propios apicultores a partir de los mismos principios activos que los comercializados, ha llevado por una parte a un elevado nivel de residuos en los productos de las colmenas (Lodesani et al. 1995; Wallner 1995 ;Bogdanov et al., 1998) y al desarrollo de poblaciones de *V. destructor* resistentes a prácticamente todos los grupos químicos utilizados (Colin et al., 1997; Trouiller 1998; Milani, 1999; Elzen et al., 2000; Thompson et al.,2002).

La primera alarma a cerca de la aparición de resistencias surgió en Lombardía (Loglio et al. 1992; Lodesani et al., 1995), una región del norte de Italia en 1992, al relatar los apicultores que muchas colmenas estaban muriendo a pesar de estar siendo tratadas con fluvalinato. Los ensayos de campo demostraron que la eficacia del fluvalinato se situaba ya en algunos colmenares por debajo del 40 %, es decir, muy por debajo del 95% que se consideraba como normal al empezar a utilizar este producto. Los resultados indicaban también la existencia de diferentes niveles de resistencia en los distintos colmenares ya que la eficacia del tratamiento osciló entre el 40 y el 89 %.

El primer ensayo llevado a cabo en laboratorio con el fin de confirmar la resistencia, fue desarrollado por un autor italiano, el Dr. Norberto Milani (Milani N.,1995) en el laboratorio apícola de Udine. En este ensayo se analiza la susceptibilidad de ácaros de diferente origen frente al fluvalinato y a otros dos piretroides, flumetrín y acrinatrina. El método empleado es la determinación de la DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> utilizando el análisis de Probit. Los resultados de este trabajo son interesantes no solo porque demuestran la existencia de poblaciones resistentes de *V. destructor* sino porque analiza en profundidad el método empleado.

Los ácaros procedentes de Udine y de algunas poblaciones de Austria muestran una susceptibilidad normal al fluvalinato, mientras que los ácaros procedentes de Lombardía ven incrementada la DL<sub>50</sub> hasta 24 y 50 veces, más llamativo aún es el incremento de la DL<sub>90</sub> que llega a alcanzar las 440 y 1100 veces por encima de lo normal.

Otro dato preocupante es el hecho de que las poblaciones resistentes al fluvalinato ven incrementada también su DL<sub>50</sub> frente a otros piretroides como el flumetrín y la acrinatrina , fenómeno conocido como resistencia cruzada, (Milani 2001).

En España se han llevado a cabo pocos estudios de resistencia, los ensayos de laboratorio (Higes et al., 1998) desarrollados en 1996 no detectaron nada, pero los ensayos de campo realizados en 1997 encuentran una alta variabilidad en la eficacia del producto, entre el 40 % y el 99% lo que parece indicar la posible presencia de poblaciones resistentes pero no se llegó a confirmar mediante pruebas de laboratorio. Estudios más recientes realizados en Granada, Jaén y Málaga muestran una gran

variabilidad en las tasas de mortalidad con las diferentes concentraciones ensayadas de fluvalinato, situación que implica una fase inicial del desarrollo de resistencia al producto, en donde conviven poblaciones resistentes con otras susceptibles (Luzón Ortega y García Fernández, Congreso de parasitología, Portugal 2001). En 2005, se detectaron las primeras resistencias al fluvalinato desarrollando los ensayos laboratoriales de Milani (1995) (Gracia-Salinas y col. 2005).

Curiosamente el fluvalinato y el amitraz no están relacionados, pero las enzimas encargadas de detoxificarlos pueden hacerse inefectivas. Según Elzen et al. (2001) la resistencia a fluvalinato puede ir de la mano con la resistencia al amitraz. El uso de amitraz parece empeorar la resistencia a fluvalinato en la población de *V. destructor*. Aunque otros autores dicen que el problema de la resistencia al fluvalinato en Francia progresó gracias a el abandono de esta sustancia y el uso de amitraz como producto de elección para el tratamiento (Mathieu and Faucon 2000). En Francia se observó un detrimiento significativo de la eficacia del amitraz entre 1995 y 1998 como resultado del incremento del tiempo que tardan en morir los ácaros de  $24,9 \pm 1,9$  minutos a  $57,6 \pm 3,5$  minutos (Mathieu and Faucon 2000).

En U.S.A se llevaron a cabo estudios que demostraron la aparición de resistencias ante el amitraz (Elzen et al, 2000) así como en Argentina (Maggi et al 2010)

En 1995/1996, se realizaron pruebas de campo en el norte de Italia que indicaron que la eficacia de coumafós estaba en detrimento (Lodesani 1996). En USA aparecieron poblaciones de *V.destructor* resistentes al amitraz (Elzen et al. 1999<sup>a</sup>, 2000), fluvalinato (Elzen et al 1999b) y coumafós (Pettis 2004).

Actualmente, el incremento de la resistencia de *V.destructor* a los acaricidas sintéticos se han registrado en muchos países (Trouiller 1998, Elzen et al. 1998).

A pesar de la amplia utilización del amitraz en la C.A.A para combatir contra *V.destructor* no existe información de la situación que hay en cuanto a la aparición de cepas resistentes de ácaros ante este.

### **1.3.2 Estrategias para evitar la aparición de Resistencias.**

Entre las medidas para evitar la aparición de resistencias están la “estrategia de moderación” que consiste en aplicar un acaricida de tal manera que una proporción suficiente de individuos sensibles sobreviva. En la práctica resulta difícil de llevar a cabo ya que mantiene una elevada población de ácaros indeseables.

La “estrategia de saturación” que se realiza mediante la aplicación del acaricida de tal forma que sea letal para la población seleccionada resistente, es decir, con dosis elevadas, aunque esto puede ser tóxico para el hospedador.

La exposición a un acaricida durante mucho tiempo (Vandame et al. 1995), especialmente a muy altas o muy bajas dosis puede promover el desarrollo de resistencias debido a la acumulación de residuos en la colmena (Fries, 1993, Wallner 1999, Maver and Poklukar 2003).

El empleo de sinergizantes, consistente en emplear un agente que sea capaz de antagonizar el efecto de las enzimas destoxicantes o de aumentar la penetración del acaricida. No se puede descartar el riesgo de intoxicación para el hospedador por interferencia con su propia metabolización del tóxico (Nolan y Schnitzerling, 1986)

El empleo alterno de distintos productos se basa en que los individuos resistentes están menos adaptados al medio, al menos al inicio del periodo de selección, por lo que su reproducción es limitada y de esta forma la población disminuye significativamente en los intervalos entre dos aplicaciones, periodo que puede aprovecharse para utilizar otro producto.

Eischen (1995) considera que la mejor solución es cambiar (rotar) el producto que está perdiendo la eficacia por otro con diferente modo de acción, antes de que la población del ácaro sea totalmente resistente al primero. Además se reduce la presión de selección genética (Milani 1999).

La utilización de forma correcta de un producto activo, retrasará la aparición de resistencias. En caso contrario dejará de ser efectivo representando un gran problema, ya que el número de productos activos efficaces frente a este ácaro es limitado por lo que el poder cambiar de compuesto resulta complicado (Milani N., 1999).

De cualquier modo, la aparición de resistencias se produce de forma más rápida que el desarrollo de nuevos compuestos. Por lo que, para salvaguardar la utilidad de los productos químicos actualmente en el mercado, se deben realizar métodos de control racionales para manejar la resistencia y diseñar estrategias para prolongar la vida útil de los productos y, por otra parte, reducir el impacto ambiental. Para ello se deberán basar en las técnicas integradas, es decir, en buscar métodos de control que no recaigan exclusivamente en el control químico (Kunz y Kemp, 1994).

En la C.A.A el amitraz lleva utilizándose desde hace mucho tiempo, inicialmente en su forma artesanal y posteriormente en su forma comercializada (Apivar®) y aunque ha sido un producto eficaz, las recientes quejas de los apicultores sobre la falta de eficacia de los tratamientos hacen sospechar que el ácaro haya podido desarrollar resistencia a este producto. No hay estudios sobre este tema en España y se desconoce la situación actual en la que se encuentra nuestra Comunidad Autónoma.

Así mismo, existe desconocimiento sobre variabilidad de las poblaciones de abejas y parásito en los distintos aspectos como son el colmenar, la estación del año o el estado

fisiológico de la abeja. Por último, no hay metodologías estandarizadas para la detección de resistencias y datos sobre cepas sensibles de referencia que nos permitan poder comparar con una población sospechosa de haber desarrollado resistencias. La posibilidad de obtener una cepa sensible que sirva de referencia sería una herramienta útil para poder hacer comparación con aquellas poblaciones que sean sospechosas de haber generado resistencia. De este modo, podremos analizar la sensibilidad de *V.destructor* al amitraz en nuestra comunidad

## **2. Objetivos**

Los objetivos que se pretenden alcanzar con el presente trabajo son los siguientes:

1. Estudiar la población y parasitación de *A.mellifera* por *V. destructor* en relación al colmenar, la estación del año y al estado fisiológico de las abejas.
2. Valorar la eficacia del amitraz (Apivar®) en condiciones de campo.
3. Obtención de la DL<sub>50</sub> del amitraz en una cepa sensible de *V. destructor*.
4. Estudiar la resistencia al amitraz en la Comunidad Autónoma Aragonesa.

### **3. Material y Métodos**

El estudio se llevó a cabo desde el otoño de 2011 hasta julio de 2012 en colmenares localizados en la Comunidad Autónoma Aragonesa, ocupados por *Apis mellifera* y parasitados de forma natural por *Varroa destructor*.

#### **3.1. Estado de la población y parasitación de *A. mellifera* por *V. destructor***

El estudio se realizó en 8 colmenares. De cada uno de los colmenares se seleccionaron 10 colmenas (tipo perfección) y se estudiaron aspectos relacionados con la población de abejas y la parasitación por *V. destructor*. En cada colmenar se ha repetido el mismo ensayo con idéntico protocolo de trabajo. Cuatro colmenares se estudiaron en primavera y cuatro en otoño.

Con el fin de valorar el vigor o fortaleza de la colmena, se cuantificó, en cada colmena, el número de cuadros ocupados por cría o por población adulta.

Con el fin de conocer aspectos relacionados con la parasitación de *V. destructor* se estudió el % de infestación tanto en la población adulta como en la cría.

Para calcular el % de infestación de la población adulta, de cada colmena se tomó una muestra de unas 300 abejas adultas que se introdujeron en un frasco con alcohol al 25% con ayuda de un cepillo y un embudo (Figura 14).



**Figura 14. Recolección de abejas.**

En el laboratorio se hizo pasar el contenido a través de dos tamices, el primero de 3mm de luz, que retenía las abejas dejando pasar los ácaros, el segundo de 0,1mm de luz que retenía a los ácaros. Se añadía agua a presión para facilitar el desprendimiento de los ácaros y por último las abejas se extendían en papel de filtro para dejarlas secar ya que al secarse desprenden los ácaros restantes (Gomez Pajuelo, 1987). Se contaron los ácaros y las abejas y con ello se calculó el porcentaje de infestación (%Infestación= (nº de ácaros/ nº de abejas) X 100).

Con el fin de valorar el % de infestación en la cría operculada, se tomó una muestra de cada colmena cortando un trozo panal de unos 10x10 cm con un cuchillo, procurando que haya cría operculada en ambas caras (la cría obtenida de cada colmena se situaba en torno a unas 100). Con ayuda de unas pinzas finas y de una cucharilla se procedía a desopercular cada celdilla y extraer las larvas y los ácaros presentes (Figura 15). En el recuento se han incluido tanto las formas adultas como las inmaduras. Contando los ácaros y las larvas de abeja se calculó el porcentaje de infestación (%Infestación= (nº de ácaros/ nº de larvas) X 100) (Accorti y col., 1986).



**Figura 15.Extracción de larva.**

### **3.2. Eficacia del amitraz (Apivar®) en condiciones de campo.**

El estudio se realizó en 8 colmenares. El tratamiento utilizado fue Apivar® (Laboratorios Calier). Los tratamientos se realizaron en primavera (4 colmenares) y otoño (4 colmenares). En cada colmenar, las colmenas se distribuyeron en dos grupos: 5 colmenas tratadas con Apivar® vs. 5 colmenas no tratadas (control).

Las colmenas tratadas recibieron dos tiras de polietileno con un contenido de 0.5gr de amitraz (Apivar®) que se colocaron entre dos cuadros de la cámara de cría y se mantuvieron en la colmena durante un periodo de 6 semanas (Figura 16). Las colmenas del grupo control se dejaron sin tratar.



**Figura 15. Colocación de las tiras de Apivar.**

Para cada colmena se valoró la infestación por *Varroa destructor* en la población adulta y en la cría en el día 0 (infestación inicial), justo antes de aplicar el tratamiento, y en el día 42 (infestación final), una vez retirado el tratamiento. La metodología utilizada es la que se señala en el apartado anterior (3.1).

Una vez obtenida la infestación inicial y la infestación final de cada colmena, tanto en la cría como en la adulta, se calculó la eficacia del tratamiento en cada colmena mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia} = \frac{[(\text{infestación inicial} - \text{infestación final})]}{\text{infestación inicial}} \times 100 \quad (\text{Llorente-Martínez y col. 1989}).$$

### **3.3. Obtención de la DL<sub>50</sub> del amitraz en una cepa sensible de *V. destructor*.**

Para alcanzar este tercer objetivo se recogieron ácaros procedentes de colmenas ecológicas que habían sido tratadas exclusivamente con productos naturales (Ej. ácido oxálico, timol). Con el fin de obtener el mayor número de ácaros, se escogieron aquellos cuadros con cría de zángano, ya que *V. destructor* muestra preferencia por ésta y es más fácil encontrarla. Se sacuden las abejas adultas presentes en el cuadro y se lleva a laboratorio.

Una vez en el laboratorio y en el mismo día, las hembras se recogían de las celdillas abriendo e inspeccionando cada celda operculada. Con el fin de conservar la integridad del ácaro y de las larvas, la cría es desoperculada cuidadosamente una a una con unas pinzas finas y un ganchillo. Los parásitos se separan de las larvas con un pincel húmedo para evitar dañar al ácaro.

Los ácaros recogidos se depositaron inicialmente y en una placa de Petri que contenía unas 2-3 larvas de abejas que sirven como nutriente de los ácaros (Figura 17).



**Figura 17.Ácaros y cría en la placa de Petri.**

Los ensayos se realizaron con amitraz (Ehrenstorfer, 97% pureza) y utilizando la técnica descrita por Maggi Matías et al (2010). Para obtener la  $DL_{50}$  del amitraz en la población sensible se utilizaron 10 concentraciones (40, 20, 10, 5, 6.6, 3.3, 2.5, 1.25, 0.63, 0.42ppm) preparadas a partir de una solución madre. El ingrediente activo se disuelve en hexano. En los controles se utilizó sólo hexano. Con 1ml de la dosis correspondiente se impregnaban las placas de Petri de 55mm Ø y una vez evaporado el contenido se introducían de 4-5 ácaros en cada placa acompañadas de 2 larvas de abeja. Se utilizaron de 2-10 réplicas por dosis. Las placas se sujetaban con una cinta adhesiva para que los ácaros no se escaparan y se introducían en una estufa a 29°C y con una humedad relativa del 70%. A las 24h se valoró la mortalidad mediante una lupa

binocular. Aquellos ácaros que no mostraban signos de vitalidad a pesar de ser estimulados con un pincel se consideraban muertos.

### **3. 4. Resistencia al amitraz en la Comunidad Autónoma Aragonesa.**

Para la valoración de la presencia de *V. destructor* resistente al amitraz, se seleccionaron cuatro colmenares que a la fecha del estudio estuvieran parasitados por *V. destructor*. Estas colmenas habían sido tratadas con Apivar® en anteriores campañas, condición imprescindible para que se pueda producirán fenómeno de resistencia. De cada colmenar se seleccionaron dos colmenares (en total 8 colmenares) de los que se tomaron muestras de cría operculada de zángano.

Los ácaros se trajeron cuidadosamente del mismo modo que en el apartado 3.3. Se introdujeron 4-5 ácaros junto a dos larvas en placas de Petri impregnadas con la DL<sub>95</sub> de amitraz obtenida a partir de la cepa sensible (3.3), (Dosis discriminativa). Se hicieron dos réplicas y un control de cada muestra de cada colmenar.

Al igual que en el apartado 3.3 las placas se sujetaban con una cinta adhesiva y se introducían en una estufa a 29°C y con una humedad relativa del 70%. A las 24h se valoró la mortalidad mediante una lupa binocular del mismo modo que el anterior apartado.

### **3.5. Análisis estadístico.**

Para el estudio de la parasitación de *A. mellifera* por *V. destructor* en relación a la estación del año, colmenar, estado fisiológico y vigor de la colmena se utilizó el programa estadístico informático IBM SPSS Statistics 19.

Se formula la hipótesis nula ( $H_0$ ) que es la que vamos a aceptar o rechazar asumiendo un 5% de nivel de riesgo ( $\alpha$ ) o con un nivel de significación del 95% (1 - $\alpha$ ). Posteriormente, se elige el estadístico de contraste, es decir, se hace la elección del test que se va a utilizar para el estudio. Y a partir de éste se obtiene el p-valor, que es la probabilidad de obtener el resultado observado bajo la hipótesis nula cierta. Cuando p-valor es menor a 0,05, rechazo la hipótesis nula, cuando es mayor a 0,05 acepto la hipótesis nula.

En este estudio se utilizan test paramétricos que sólo se podrán aplicar bajo hipótesis de normalidad, es decir, es necesario que la muestra tenga una distribución normal. Para comprobar la normalidad en el programa estadístico SPSS es necesario recurrir al Test no paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov* que estudia la distribución de la muestra (hipótesis nula del tipo  $H_0$ : la población sigue una distribución normal).

El test paramétrico usado en este estudio es la *Prueba t para muestras emparejadas*. En este caso se formula una hipótesis nula del tipo  $H_0: \mu_1 = \mu_2$

Sobre la igualdad de medias de una misma población evaluada dos veces. La prueba determina si las observaciones realizadas antes y después de un tratamiento proceden probablemente de distribuciones con medias de población iguales.

En el caso de que la población no siga una distribución normal hay que utilizar la prueba de *Mann-Whitney* (alternativa a la prueba t cuando no tenemos normalidad).

Para el estudio de la homogeneidad de los resultados de las distintas variables en cada colmenar, se realiza un *Análisis de Homogeneidad de Varianzas*.

Por último, con el objetivo de obtener el valor de la  $DL_{50}$  y la  $DL_{95}$ , los datos obtenidos fueron analizados usando la transformación probit (Finney, 1971) del mismo modo que Milani (1995) en una hoja de cálculo de excel 4.0.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Estado de la población y parasitación de *A. mellifera* por *V. destructor*

Hay diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,001$ ), en relación a la población de *A. mellifera* entre los distintos colmenares estudiados. Existiendo factores genéticos, de manejo y ambientales, que hacen que la población sea distinta. Esto nos sugiere que este tipo de estudios hay que hacerlos con varios colmenares, ya que con un único colmenar no se obtendrían datos representativos.

En relación a la evolución de la población de *A. mellifera* según la estación podemos observar que no hay diferencias significativas entre la población de abeja adulta en primavera y otoño ( $p= 0,592$ ). Es decir la estación no parece afectar a la población adulta y ésta se mantiene similar independientemente de si es primavera u otoño. Según Sanz Villalba, 2012 en el ciclo normal de la abeja, a partir de otoño, la población de abeja adulta va disminuyendo debido a la escasez de alimento en la colonia (Figura 18). El hecho de que no se produzca una disminución de la población adulta en otoño, puede ser debido a que los apicultores alimentan a las colmenas de manera artificial en esta época o bien a que el otoño ha sido cálido y con lluvias, permitiendo la presencia de provisiones en el campo.

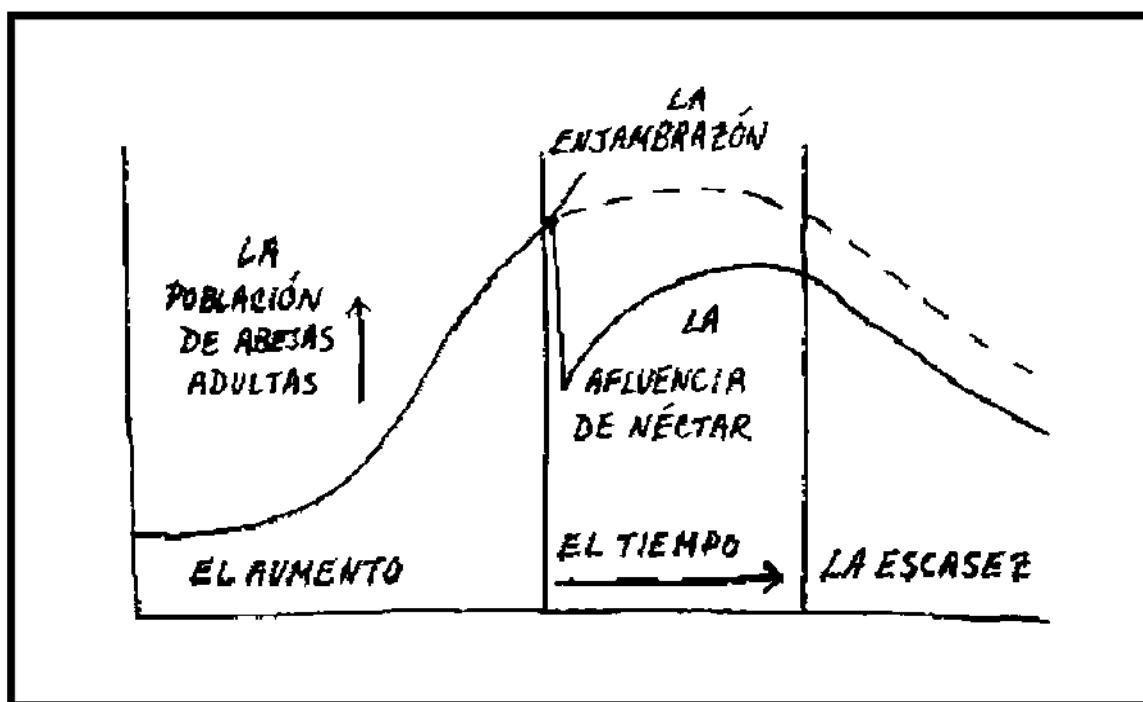
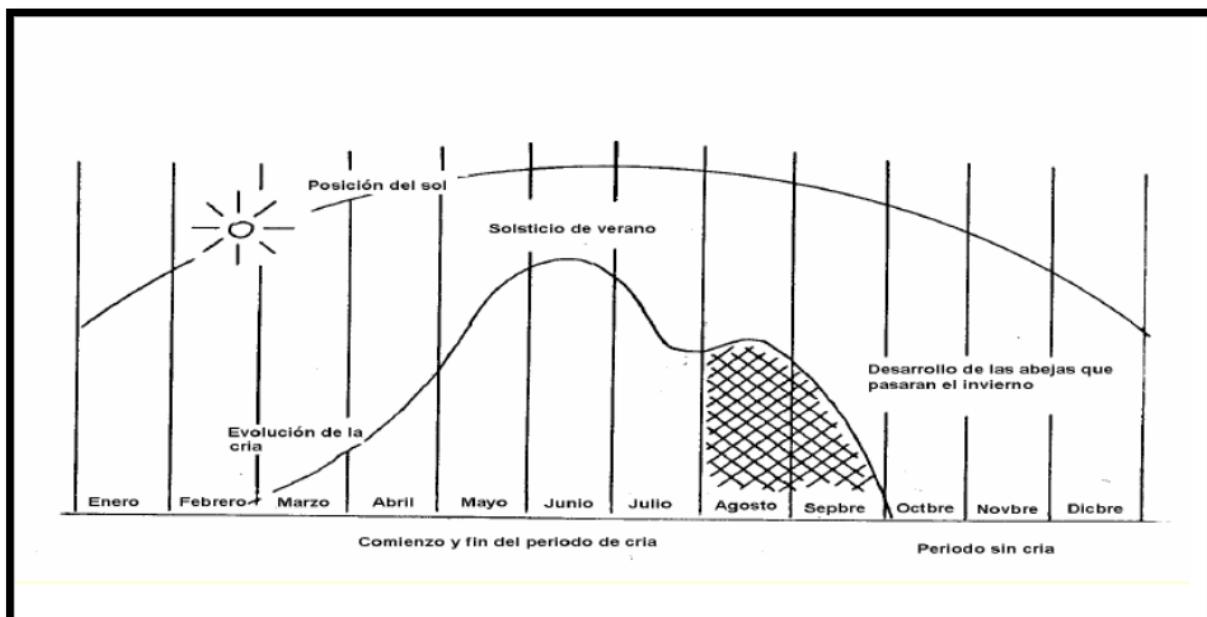


Figura 18. Evolución de la población de abeja adulta durante el año. Sanz Villalba, (2012)

En cuanto a la población de cría, sí que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,002$ ), observamos que hay más cría en primavera, que en otoño. Esta situación es probable que sea debida a que en esta época la reina está más estimulada para la puesta, y la población en desarrollo aumenta.

Según Sanz Villalba, 2012 a comienzos de la primavera, hay un aumento progresivo de la presencia de cría, alcanzando su máximo en Junio. Posteriormente hay un descenso en el mes de Julio; en Agosto hay un pequeño repunte y a partir de Septiembre hay un descenso.



**Figura 19. Evolución de la puesta de la reina. Sanz Villalba (2012)**

Según la prueba de homogeneidad de varianzas la parasitación de *V. destructor* en los distintos colmenares estudiados ha sido diferente, se comportan como poblaciones independientes ( $p= 0,002$ ) posiblemente debido a diferencias como el manejo y el medio ambiente.

En cuanto a la parasitación de una población en distintas épocas del año (primavera y otoño) se han observado diferencias significativas ( $p= 0,004$ ). Hay mayor infestación en primavera que en otoño. Probablemente esto es debido a que en primavera hay un mayor estímulo a la reproducción del ácaro coincidiendo con lo estudiado por Calatayud Tortosa (2004).

Con respecto a la parasitación de *V. destructor* en las dos poblaciones susceptibles de ser afectadas por el ácaro: adulta y cría, en el presente estudio no se observaron

diferencias significativas entre la parasitación de ambos estados fisiológicos ( $p= 0,851$ ), es decir, el ácaro está presente tanto en adulta como en la cría en una proporción similar. Según Calatayud Tortosa y Zaragoza en 2007 los porcentajes de infestación máximos de la cría operculada se sitúan en el 50-60%, aunque en los últimos años la tendencia es a ir aumentando. En este sentido existen estudios (Calatayud Tortosa y Simó Zaragoza, 2007) que señalan una disminución de la fase forética como consecuencia de un intento de adaptación del ácaro para protegerse de los efectos de un posible tratamiento.

#### **4.2. Eficacia del amitraz (Apivar®) en condiciones de campo.**

Los resultados del ensayo de eficacia del Apivar® en condiciones de campo señalan una eficacia global de sólo el 61,91% (Tabla nº 1). Estos datos son muy inferiores a los obtenidos en otros estudios (Floris et al 2001) en los que la eficacia se sitúa entre el 83.8 %y el 74.9 %. Sin embargo observamos que la respuesta a los tratamientos no ha sido igual en todos los colmenares y aunque hay colmenares en donde la eficacia es muy baja (colmenares 2, 3, 6, 7 y 8) otros presentan eficacias elevadas (colmenares 1, 4 y 5).

Colmenar	Eficacia (%)
<b>1</b>	94,00
<b>2</b>	39,06
<b>3</b>	60,68
<b>4</b>	100,00
<b>5</b>	92,52
<b>6</b>	69,35
<b>7</b>	0,00
<b>8</b>	39,69
<b>Eficacia Global (%)</b>	
<b>61,91</b>	

**Tabla 1. Resultados de la eficacia.**

Como se puede observar los resultados reflejan una gran variabilidad de la eficacia entre los colmenares, no hay homogeneidad ( $p= 0,002$ ). Esto señala que cada colmenar se comporta como una población independiente, lo que justifica la importancia de analizar más de un colmenar, ya que el análisis de únicamente de uno no reflejarían datos representativos de la población.

La variabilidad de la eficacia también se observó en estudios llevados a cabo en Italia cuando se inicia la resistencia al fluvalinato (Milani, 1995).

Hay colmenares con una eficacia muy baja, en especial es llamativo el colmenar nº 7 en donde no sólo no disminuyó la parasitación sino que aumentó.

Sin embargo, salvo esta excepción podemos suponer que en todos los colmenares la disminución de la parasitación es debido al producto aplicado y no a otro factor ajeno al medicamento. Esto se puede observar si se analiza la evolución de la parasitación en las colmenas control (Tabla nº 2), en donde a excepción del colmenar nº 5 en todos los casos se produce una aumento de la misma.

Colmenar control	Infestación Inicial (%)	Infestación Final (%)
1	10,04	17,83
2	10,88	21,57
3	6,47	7,73
4	21,11	31,02
5	19,34	5
6	5,22	9,46
7	2,63	5,64
8	11,52	12,02

**Tabla 2. Evolución de la parasitación en los controles.**

Esta baja eficacia puede ser un indicio de la aparición de cepas resistentes al amitraz, aunque también estos datos pueden deberse a una mala aplicación del producto. Sin embargo se siguieron en todo momento las recomendaciones del fabricante. Por ello es necesario confirmar estos resultados en laboratorio.

Con respecto a la eficacia del tratamiento en función de la estación del año podemos observar que hay diferencias significativas en la eficacia del producto ( $p=0,018$ ). El medicamento es más efectivo en otoño. Esto es debido a que en esta época hay menos cría operculada, por lo que la mayoría de los ácaros están fuera de las celdillas, lugar donde el ácaro se ve más expuesto al medicamento.

También se observan diferencias significativas entre la eficacia del medicamento en los dos estados fisiológicos de la abeja ( $p=0,013$ ). El medicamento es más eficaz contra los ácaros de la abeja adulta que los que se localizan en la cría. Esto es debido probablemente a que el ácaro que afecta a la adulta está más expuesto a los efectos del tratamiento, sin embargo la cría se encuentra dentro de las celdillas operculadas, lugar donde el medicamento tiene más dificultades para penetrar. La cría operculada siempre ha sido un refugio para *V. destructor*, allí está a salvo de los acaricidas. A través de los poros de del opérculo de cera apenas pasan las moléculas de dióxido de carbono y oxígeno. En este sentido se ha observado un mecanismo protector del ácaro con el

fin de evitar los efectos del tratamiento; se ha observado una disminución del tiempo que transcurre el ácaro en la fase forética y por ello ha constatado que se acentúa progresivamente el efecto protector de la cría operculada sobre el ácaro (Calatayud Tortosa y Simó Zaragoza, 2007)

Con respecto al posible efecto del tratamiento sobre las abejas, no se reflejan diferencias significativas entre la población antes y después de aplicar el tratamiento ( $p= 0,402$ ) por lo que se puede afirmar que el producto no afecta a las abejas, no tiene efectos adversos y se puede utilizar con total seguridad siempre que se sigan las recomendaciones de aplicación del fabricante.

#### **4.3. Obtención de la DL<sub>50</sub> del amitraz en una cepa sensible de *Varroa destructor*.**

La DL<sub>50</sub> obtenida a partir de una cepa sensible fue de 0.777 µg/ml (1.128 µg/ml - 0.434 µg/ml). La DL<sub>95</sub> fue de 6.38 µg/ml (4.12 µg/ml - 13.54 µg/ml).

Con respecto a otros estudios realizados en los que se ha usado métodos similares al utilizado en el presente hemos observado que en nuestro caso los valores son inferiores. Por ejemplo el estudio realizado en Argentina por Maggi et al (2010) la DL<sub>50</sub> obtenida del amitraz fue de 3.5 µg/ml; es decir 4,5 veces superior. Incluso en el estudio realizado en U.S.A por Elzen et al (2000) se reflejaron cifras todavía más elevadas (16,39 µg/ml).

Estas diferencias pueden ser debidas a que las poblaciones de ácaros pueden exhibir diferentes grados de susceptibilidad o bien a que la metodología utilizada sea distinta.

Es probable que las distintas poblaciones de ácaros hayan dado diferente susceptibilidad dependiendo de las zonas geográficas (Watkins1997; Schaub et al 2002). También puede ocurrir que en estos estudios se hayan obtenido muestras de ácaros que ya han desarrollado cierta tolerancia al medicamento (Maggi et al 2010).

En cuanto a la metodología usada, nosotros seguimos la descrita por Maggi et al (1995). Por lo que las diferencias con estos autores pueden ser debidas más a las poblaciones de ácaros. En nuestro caso es probable que se trataran de poblaciones que podrían contener menos individuos que hubieran desarrollado resistencia al amitraz a diferencia de lo observado por Maggi et al (1995) o diferente sensibilidad según zona geográfica (Watkins1997; Schaub et al 2002).

Cabe destacar la falta de una metodología aceptada para estos estudios de sensibilidad y la importancia de establecer un método estandarizado para el cálculo de la DL<sub>50</sub> y la DL<sub>95</sub> de un producto frente a *V.destructor*, y así evitar variabilidad de resultados.

Podemos considerar que los datos obtenidos en la cepa sensible pueden permitirnos usarla como referencia para valorar una posible presentación de un fenómeno de resistencias y confirmar o no nuestras sospechas.

#### **4.4. Resistencia al amitraz en la Comunidad Autónoma Aragonesa.**

En los últimos cinco años el producto más utilizado por los apicultores de la CAA ha sido el Apivar®, pero esta última campaña de tratamiento contra *V. destructor*, el producto de elección ha sido el Checkmite®, medicamento cuyo principio activo es el coumafós. Este cambio de producto fue recomendado por la Asociación de Defensa Sanitaria con el objetivo de seguir una rotación de acaricidas para evitar la aparición de resistencias.

En esta fase del estudio lo ideal hubiera sido realizar los ensayos en aquellas colmenas que presentaron bajas eficacias en el ensayo de campo y de alguna manera poder confirmar la existencia de cepas resistentes. Sin embargo, esto no fue posible ya que el apicultor decidió tratar antes de poder llegar a esta fase del estudio.

En esta campaña el tratamiento con coumafós ha sido muy eficaz, y ha sido muy difícil encontrar colmenas parasitadas y que previamente se hubieran tratado con amitraz.

Sin embargo, finalmente el estudio se pudo realizar en cuatro colmenares que no se habían tratado en la presente campaña pero que tenían un historial de tratamiento previo con amitraz. De las 8 colmenas estudiadas, ningún ácaro sobrevivió a la DL<sub>95</sub>. Es decir la dosis discriminativa mata los ácaros por lo que podemos deducir que la población estudiada no es resistente.

Se puede afirmar que la rotación de medicamentos para la lucha contra la aparición de resistencias en *V. destructor* ha sido eficaz. En los últimos años los apicultores señalaban problemas con el ácaro a pesar del tratamiento, sin embargo en esta campaña hay muy poca parasitación y es probable que el nuevo tratamiento haya eliminado las posibles cepas resistentes.

También se puede cuestionar la necesidad de tratar contra el parásito dos veces por año (primavera y otoño), ya que en este estudio, tras el tratamiento de primavera, en verano las colmenas siguen estando sanas. Para un uso responsable de estos acaricidas, sería interesante diagnosticar el colmenar antes de aplicar el medicamento de este modo se evitaría el uso abusivo de estos acaricidas que conlleva acumulación de residuos en la cera y aparición de resistencias (Chauze et al., 2009; Johnson et al., 2009 Wallner, 2005).

Es necesario continuar con estos estudios con el fin de conocer la situación real de resistencias al amitraz en la CAA. Llevando a cabo el estudio en más colmenares y

realizando estudios de laboratorio en aquellas poblaciones en las que el tratamiento rutinario presente poca eficacia. El hecho de poder contar con una población sensible de referencia constituye una herramienta muy útil para poder detectar una posible aparición de resistencias.

## 5. CONCLUSIONES

Del estudio realizado en los colmenares de la CAA se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La población de abejas y la parasitación por *V. destructor* varía en función del colmenar, la colmena, la estación de año y el estado fisiológico.
2. La eficacia global del amitraz en el estudio de campo fue solo del 61,9 %.
3. Las eficacias del amitraz varían en función de los distintos colmenares, estación del año y estado fisiológico.
4. La DL50 obtenida a partir de una población sensible es de 0,78 µg/ml mientras que la DL95 es de 6,38 µg/ml.
5. Los resultados obtenidos en los colmenares estudiados al compararlos con los obtenidos en la población sensible de referencia no señalan la presencia de cepas resistentes al amitraz.

## 6. Bibliografía

- Abed T., Ducos de Lahitte J. (1993) Détermination de la DL 50 de l'amitraz et du coumaphos sur *Varroa jacobsoni* Oud au moyen des acaricides Anti-varroa (Shering) et Piperizin (Bayer). Apidologie 24, 121-128.
- Accorti M., Barbattini R., Marchetti S. (1986) Le diagnosi ed il controllo di *Varroa jacobsoni* Oud. In campo: proposta di unificazione nelle prove sperimental, Apicoltura, 2, 165-185.
- Anderson and Trueman (2000) Honey bee mite, V. destructor. Experimental and Applied Acarology 24.
- Barbattini, R. (1986). Criteri di intervento diagnostico e terapeutico su *V.jacobsoni* Oudemans. L' apicoltura in Sardegna, 22.
- Bogdanov, S., (2006). Contaminants of bee products. Apidologie 37 1, (1-18)
- Boot WJ, Beetsma J & Calis JNM (1994) Behaviour of Varroa mites invading honey bee brood cells. Experimental and Applied Acarology 18: 371-379.
- Bussieras J., Kilani M., Popa A., et Sakli A., (1981). Essai préliminaire de traitement de la varroase de l'abeille domestique par l'amitraz. Apidologie, 12, 31-36.
- Calatayud Tortosa, Fernando (2004), Ciclo Biológico de Varroa destructor. Vida Apícola nº 127.
- Calatayud Tortosa, Fernando y Simó Zaragoza, Enrique (2007) La persistencia de la varroosis y sus secuelas. Vida Apícola nº 146.
- Casado Bravo. D, Rivera Díaz, García Martín, Lorenzo Rodriguez García Varela (2002) Eficacia de tres tratamientos antivarroa en distintas zonas de Galicia. Vida Apícola nº 111.
- Donzé G & Guérin PM (1994) Behavioral attributes and parental care of Varroa mites parasitizing honey bee brood. Behaviorial Ecology and Sociobiology 34: 305-319.
- Duay, P., de Jong, D., Engels, W., 2002. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bees slightly infested by Varroa destructor mites during pupal development. Genetics and Molecular Research. 1, 227-232.
- Floris I., Satta A., Garau V.L., Melis M., Cabras P., Aloul N. (2001) Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strip in the apiary control of *Varroa destructor*.Apidologie 32, 577-585.
- Elke Genersch, Werner von der Ohe, Hannes Kaatz, Annette Schroeder, Christoph Otten, Ralph Büchler, Stefan Berg, Wolfgang Ritter, Werner Mühlen, Sebastian Gisder, Marina Meixner, Gerhard Liebig and Peter Rosenkranz (2008) Apidologie. Volume 41, Number 3, May-June 2010.
- Fires, I., Hansen, H., Imdorf, A., Rosekranz, P., 2003. Swarming in honey bee colonies and V. destructor population development in Sweeden. Apidologie 37, 389-398.

- Gracia-Salinas M.J., Ferrer-Dufol M., Latorre- Castro E., Moreno-Manera C., Castillo Hernandez J.A., Lucientes- Curd J., Peribañez-Lopez M.A. (2005) Detection of fluvalinate resistance in Varroa destructor in Spanish apiaries. *Journal of Apicultural Research* 45 (3): 101-105.
- Infantidis, M.D., 1983. Ontogenesis of the mite Varroa Jacobsoni in worker and drone honey bee brood cells. *J. Apiculture. Research.* 22, 200-206.
- Kuenen, L.P.S, Calderone, N.W., 1997. Transfers of Varroa mites from newly emerged bees: preferences for age- and function- specific adult bees. *Journal of Insects Behavior.* 10, 213-228.
- Lipinski Z., Szubstarski J., (2007) Resistance of Varroa destructor to most commonly used synthetic acaricides. *Polish Journal Veterinary Sciences* Vol. 10, Nº 4, 289-294.
- Llorente-Martinez J., Robles Portela E., Salvachua Gallego C. (1989) Ensayo sobre la eficacia del acaricida fluvalinato (Apistán) contra la varroasis de la abeja melífera en presencia de cría, *Cuadernos de Apicultura*, 6, 14-16.
- Maggi Matías D., Ruffinengo Sergio R., Negri Pedro, Egualas Martín J. (2010) Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite Varroa destructor of Argentina. *Parasitology Research* 107: 1189-1192
- Maggi Matías D., Ruffinengo Sergio R., Mendoza Yamandú, Ojeda Pilar, Ramallo Gustavo, Floris Iganzio, Egualas Martín Javier. (2010) Susceptibility of Varroa destructor (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: Varroa mite's potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research* 108: 815-821
- Melchor Biri. J.M Alemany Albert . 1983. Cría moderna de las abejas.19-41.
- Milani, N., y Barbattini, R. (1988). Effectiveness of Apistan (fluvalinate) in the control of Varroa jacobsoni Oudemans and its tolerance by A.mellifica Linneaus. *Apicultura*, 4, 39-58.
- Milani, N., y Barbattini, R. (1989). Treatment of varroatosis with Bayvarol strips (flumethrin) in Northern Italy. *Apicultura*, 5, 173-192.
- Milani N (1995). The resistance of Varroa jacobsoni Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* 26: 62-72.
- Milani N (1999). The resistance to Varroa jacobsoni Oud to acaricides. *Apidologie* 30: 229-234.
- Pierre Jean Prost 2001 Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena. 41-85.
- Rémy Vandame, Marc Colin y Gabriel Otero Colina (1996) Abejas europeas y abejas africanizadas en México: la tolerancia a Varroa jacobsoni. Apiservices. Nº2
- Robaux, P. (1986). Varroa et varoatose. Ed. O.P.ID.A. 238.
- Rosenkranz,P., et al. (2009)Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Sakofski, F., Koeniger, N., Fuchs, S., 1990. Seasonality of honey bee colony invasion by Varroa jacobsoni Oud. *Apidologie* 21, 130-134.

- Schatton-Gadelmayer K., Engels, W., 1988. Blood proteins and body weight of newly-merged worker honey bees with different levels of parasitization of brood mites. *Entomology*. 14, 93-101.
  - Steiner,J. Dittman, F., Rosekranz, P., Engels. W., 1994. The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee.*Invertebr. Rep. Develop.* 25, 175-183.
- Universidad de Córdoba. Departamento de Zoología.  
[http://www.ucm.es/dptos/zoologia/Apicultura/pato\\_adut.htm](http://www.ucm.es/dptos/zoologia/Apicultura/pato_adut.htm).
- Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, alimentación y medio ambiente. <http://www.magrama.gob.es/es/>.
- ICEX, España Exportación e Inversiones. <http://www.icex.es>.