



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2015**

**ESTADO SANITARIO DE LAS COLONIAS DE *APIS MELLIFERA*
(HYMENOPTERA: APIDAE) DE LAS ISLAS BALEARES: IMPACTO
DEL PARÁSITO *VARROA DESTRUCTOR* (ACARI: VARROIDAE) Y
EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS AÉREOS CON *BACILLUS*
THURINGIENSIS SUBSP. *KURSTAKI***

Maria del Mar Leza Salord



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2015**

Programa de Doctorado en Biología de las Plantas

**ESTADO SANITARIO DE LAS COLONIAS DE *APIS MELLIFERA*
(HYMENOPTERA: APIDAE) DE LAS ISLAS BALEARES: IMPACTO
DEL PARÁSITO *VARROA DESTRUCTOR* (ACARI: VARROIDAE) Y
EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS AÉREOS CON *BACILLUS*
THURINGIENSIS SUBSP. *KURSTAKI***

INCLUYE 4 ANEXOS (I-IV)

Maria del Mar Leza Salord

Director/a: Miguel Ángel Miranda Chueca

Doctor/a por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

Dr. Miguel Ángel Miranda Chueca, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título: *Estado sanitario de las colonias de Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) de las Islas Baleares: impacto del parásito Varroa destructor (Acari: Varroidae) y efecto de los tratamientos aéreos con Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*, presentada por Maria del Mar Leza Salord para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma

Palma de Mallorca, 16 de abril de 2015.

Als meus pares
A sa meva germana
A n'en Dani

The bee's life is like a magic well: the more you draw from it, the more it fills with water.

Karl R. von Frisch

Agradecimientos

Me gustaría empezar agradeciendo los momentos geniales que he podido disfrutar al realizar esta tesis. He podido conocer a gente maravillosa, hacer buenos amigos y me ha permitido recorrer nuestras fantásticas islas, así como viajar a lugares desconocidos hasta el momento para mí. Recuerdo con especial cariño los tres meses vividos en la intrépida Londres y mis viajes a Wallingford, en el valle del Támesis. Además, sin duda, he de agradecer poder hacer lo que más me gusta. Que se lo digan a mis padres, que ya desde pequeña me veían pasando parte de las vacaciones de verano haciendo fichas de animales (¡aún las guardo!) y sin dudarlo respondía que de mayor quería ser bióloga.

Y la vida y mis ganas me llevaron a estudiar Biología y a colaborar desde hacer más de diez años (¡que se dice pronto!), casi desde que empecé a estudiar, en el Laboratorio de Zoología, en donde empezó la historia de mi tesis de mano mi director, Miguel Ángel Miranda. A él tengo que agradecerle no sólo su confianza depositada en mí y su dedicación, sino también su contribución en mi crecimiento personal y profesional, y por supuesto los buenos ratos de charla y té.

Y al mencionar el té me viene directamente a la cabeza Luis Gállego, al que quiero agradecer sus palabras de ánimo, sus consejos y nuestras interminables conversaciones sobre la vida. Mis inicios están unidos a Ana Alemany, a la que tengo tantas cosas que agradecer. Con ella descubrí el gusanillo de la investigación y a mis “queridas Ceratitis”. *I no puc recordar a ses ceratitis sense que me vengui a n'es cap sa meva meravellosa companya d'aquells temps i amiga Antònia Romero, amb sa que vaig passar tantes hores que se feien nits i tantes rialles i tants cafès i tant de tot que perdura fins ara. I sa meva companya d'aquells temps i amiga Cris Tur, per tots els nostres moments de locura.*

Después de las “Ceratitis” vinieron las “Lymantrias” y la procesionaria, hasta que finalmente desembarqué en el fascinante mundo de las abejas. *I aquesta història no hagués estat igual si no hagués arribat a conèixer a n'es meu gran mestre Gori Lladó,*

qui me va iniciar i me va ensenyar generosament tot el que sé d'apicultura. Gràcies per inculcar-me sa passió per aquestes meravelloses criatures i obrir-me els braços a una gran amistat i al grup dels Apinostrum.

Y entre experimentos, papeles, flores y miel, otros tantos téis y cafés me he tomado con Guillem y Claudia, a los que agradezco las risas, confesiones, “divertidas y acaloradas discusiones” y un largo etcétera que hacen que mis días de trabajo sean más felices. A mis compañeros de laboratorio por las fiestas de disfraces (maravillosa la medusa de Carlos! Yo quiero una :P), las míticas barbacoas en Ca's Valencià, las risas y por aguantar que les tirase por encima algún que otro café en momentos de nerviosismo, y a mis adorables compañeros de adopción bioquímicos con los que he pasado tan buenos ratos!

Tuve la suerte de poder realizar una estancia en el Centro Apícola Regional de Marchamalo, bajo la dirección del Dr. Mariano Higes y la Dra. Raquel Martín-Hernández, a los que agradezco enormemente su atención y ayuda prestadas, al igual que a todo el personal del centro.

Además disfruté de una estancia de trabajo en el centro de investigación *Centre for Ecology & Hydrology* en Reino Unido, bajo la supervisión de la Dra. Bethan Purse. *I should like to express my warm thanks to Dr. Bethan Purse for her support and attention and for our close and fruitful cooperation over these past months.*

Gràcies a totes les institucions que han col·laborat en algun aspecte d'aquesta tesis: a la Universitat de les Illes Balears i a la Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori, pel finançament; i als serveis administratius, científicotècnics, al servei de SIG de la UIB (especialment a n'en Pep per ajudar-me amb els mapes) i als Agents de Medi Ambient de l'IBANAT d'Eivissa, als tècnics i veterinaris col·laboradors, per donar-me sempre un cop de mà en el que he necessitat. Així mateix he d'agrair a l'Associació d'Apicultors de Balears i a l'Associació d'Apicultors d'Eivissa i Formentera, especialment sincer és el meu agraïment als apicultors participants: Pepe Juan, Toni Bibiloni, Eugenio Domínguez, Juan Ferrer, Miguel Gamundí, Antoni M^a Llinàs, Llorenç Ramis, Tomeu Vich i Miguel Lladó, per obrir-me les portes de casa seva i per poder treure profit dels seus savis coneixements.

Què seria de la vida sense els amics, gràcies als uibers, a sa peña del moco, a ses meves caipirinhas, per fer-me gaudir de sa vida i per trobar en tots ells paraules d'admiració i ànims. Gràcies a na Jero, per suposar un gran pilar en els moments de defalliment, per escoltant-me i donant-me consells ben valuosos, i per donar-me els millors breaks amb ses nostres berenetes, converses i rialles.

I ni què dir de sa família! Gràcies a sa meva família, als meus predins, a n'es meu àngel de la guarda i al grup de locomía (a sa nostra loqueta Elena, Mariquina, José, Juani y Ángel), a n'en Carlos i als predins d'en Dani, considerant-los ja a tots ells com a meus. Que m'animen i admiren fins el punt de considerar-nos un matrimoni Curie!

El més gran de tots els agraiments és als meus pares. Gràcies per fer-me qui som, per fer-me créixer, per confiar en mi, per ajudar-me, per animar-me, per fer-me riure, per poder guardar grans records en forma de viatges o de diumenges o de dinars i sopars tots plegats, en definitiva per haver-me donat sa millor de totes ses vides possibles. Gràcies a sa meva manita Aina, sa meva gran companya i amiga de vida per totes les vivències juntes, però sobretot per ballar, cantar i riure amb mi.

*Y como dice la canción *Quand il me prend dans ses bras, Il me parle tout bas Je vois la vie en rose*, gracias Dani por demostrarme que la vida puede ser de color de rosa. Gracias por todo, por apoyarme como el que más, por creer en mí, por quererme y dejarte querer, por aguantar el estrés de la vida junto a mí, por aconsejarme, por dejarme aprender de ti, por nuestras escapadas, por bailar, cantar como si no hubiera un mañana y por hacerme reír a carcajadas como no lo hace nadie más en el mundo, pero sobre todo por hacer de mi vida un cuento de hadas.*

Acrónimos y abreviaturas

AEAT	Agencia Estatal de Administración Tributaria
%CNAC	Porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos
%F	Porcentaje de focalidad
%I	Porcentaje de infestación
%MI	Porcentaje de infestación máxima
%P	Porcentaje de prevalencia
%R	Porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos
A	Abundancia de abejas
AG	Apiguard
AIC	<i>Akaike information criterion</i> . Criterio de Información Akaike
ANOVA	Análisis de la varianza con un factor
at	Semana anterior al tratamiento
AV	Apivar
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Btk</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
BV	BeeVital
C	Control
CC	<i>Commission to the Council</i> . Comisión del Consejo
CCD	<i>Colony Collapse Disorder</i> . Transtorno del colapso de las colonias
DWV	<i>Deformed Wing Virus</i> . Virus de las alas deformadas
EE	Error estándar
EEUU	Estados Unidos
EP	<i>European Parliament</i> . Parlamento Europeo
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> . Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
ft	Semana posterior a la finalización del tratamiento
GB	<i>Great Britain</i> . Gran Bretaña
GLMM	<i>Generalized Linear Mixed Models</i> . Modelo Lineal Generalizado Mixto

HM	Humedad media
HR	Humedad relativa
ID	<i>Identification.</i> Identificación
Lag	Rezago
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MS	<i>Member State.</i> Estado Miembro
N.D.	No hay datos
NAC	Valor promedio del número de ácaros caídos
NAP	<i>National apiculture programmes.</i> Programas nacionales de apicultura
OIE	<i>Office International des Epizooties.</i> Oficina Internacional de Epizootías
RD	Real Decreto
Rec_Imp	Recursos improductivos
Rec_Nat	Recursos naturales
r_p	Coficiente de correlación de Pearson
TMA	Temperatura mínima absoluta
Trat	Tratamiento
U.A.	Unidades arbitrarias
UE	Unión Europea
UTM	<i>Universal Transverse Mercator</i>
V	Abundancia de <i>Varroa</i>
ZAF	Zona de acumulación fecal

Publicaciones

La publicación derivada de la presente tesis es la siguiente:

- Leza, M. M., Llado, G., Petro, A. B. y Alemany, A., 2014. First field assessment of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial application on the colony performance of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Spanish Journal of Agricultural Research*, **12**, 405-408.

Asimismo los siguientes artículos están en vías de publicación:

- Comparison of the efficacy of Apiguard (thymol) and Apivar (amitraz) in the control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in the Balearic Islands (Western Mediterranean).
- Patterns of *Varroa destructor* infestation depend on bee host abundance, availability of natural resources for bees and climate across apiaries on a Mediterranean Island.

Índice

Lista de figuras.....	1
Lista de tablas.....	7
Resumen.....	11
Resum.....	13
Abstract.....	15
Capítulo 1: Introducción y objetivos.....	17
1.1.- Importancia socio-económica y ambiental de las abejas.....	19
1.2.- Sanidad apícola.....	24
1.2.1.- Parásitos y patógenos.....	27
1.2.2.- Estado nutricional.....	28
1.2.3.- Pesticidas.....	28
1.3.- El parásito <i>Varroa destructor</i>	30
1.3.1.- Taxonomía, distribución geográfica e historia natural.....	30
1.3.2.- Morfología.....	33
1.3.3.- Ciclo biológico.....	38
1.3.4.- Dinámica poblacional e influencia de los factores ambientales.....	42
1.3.5.- Patología.....	46
1.3.6.- Control.....	48
Objetivos.....	52
Capítulo 2: Material y métodos.....	53
2.1.- Caracterización orográfica y climática de las Islas Baleares.....	55
2.2.- Dinámica poblacional de <i>V. destructor</i> y los factores que la modulan.....	57
2.2.1.- Localización y zona de estudio.....	57

2.2.2.- Muestreo en campo y procesamiento de las muestras	61
2.2.3.- Análisis de datos y análisis estadístico	63
2.3.- Estudio epidemiológico de la varroosis en las colonias de abejas en las Islas Baleares.....	66
2.3.1.- Localización y zona de estudio	66
2.3.2.- Muestreo en campo y procesamiento de las muestras	68
2.3.3.- Análisis de datos y análisis estadístico	70
2.4.- Evaluación de la eficacia de acaricidas en el control de <i>V. destructor</i>	70
2.4.1.- Localización y zona de estudio	70
2.4.2.- Muestreo en campo y procesamiento de las muestras	72
2.4.3.- Análisis de datos y análisis estadístico	74
2.5.- Efecto de la aplicación aérea en campo de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (<i>Btk</i>) sobre las colonias de abejas.....	77
2.5.1.- Localización y zona de estudio	77
2.5.2.- Muestreo en campo y procesamiento de las muestras	78
2.5.3.- Análisis de datos y análisis estadístico	81
Capítulo 3: Resultados y discusión	83
3.1.- Dinámica poblacional de <i>V. destructor</i> y los factores que la modulan.....	85
3.1.1.- Curva poblacional de <i>V. destructor</i>	85
3.1.2.- Efectos ambientales sobre la abundancia de <i>Varroa</i>	95
3.2.- Estudio epidemiológico de la varroosis en las colonias de abejas en las Islas Baleares.....	105
3.2.1.- Encuesta sobre la caracterización de la apicultura balear.....	105
3.2.2.- Prevalencia y nivel de infestación	118
3.3.- Evaluación de la eficacia de acaricidas en el control de <i>V. destructor</i> ...	135
3.3.1.- Primer ensayo: primavera 2010	135

3.3.2.- Segundo ensayo: otoño 2011	138
3.3.3.- Tercer ensayo: primavera-verano 2013	141
3.4.- Efecto de la aplicación aérea en campo de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (<i>Btk</i>) sobre las colonias de abejas.....	147
Capítulo 4: Discusión general	155
Capítulo 5: Conclusiones	161
Conclusions	165
Bibliografía	169
Anexo I.....	193
Anexo II	221
Anexo III.....	225
Anexo IV.....	237

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Producción mundial de miel (1000 t). Datos: FAO, citados en <i>Honey reports, statistics and presentations from the Commission to the Council (CC) and the European Parliament (EP) on the implementation of the national apiculture programmes (NAP) in the Member States (MS)</i> (2013).	20
Fig. 2. Producción de miel (en toneladas) por países miembros de la Unión Europea, en 2011. Datos: FAO, citados en <i>Honey reports, statistics and presentations from the CC and the EP on the implementation of the NAP in the MS</i> (2013).	22
Fig. 3. A. Porcentajes de apicultores profesionales (más de 150 colmenas), semiprofesionales (entre 50 y 149 colmenas) y aficionados (menos de 50 colmenas) presentes en las Islas Baleares. B. Distribución de apiarios entre las diferentes islas del archipiélago Balear. Fuente: Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA) de la <i>Conselleria de Agricultura, Medi ambient i Territori</i> , Noviembre de 2014.	23
Fig. 4. Porcentajes observados de pérdidas de colmenas de abejas. Fuente: Adaptado de Neumann & Carreck, 2010.	24
Fig. 5. Aspecto de la superficie dorsal (a, c, e y f) y ventral (b y d) de hembras adultas de <i>V. jacobsoni</i> (haplotipo Java) (a y b), <i>V. destructor</i> (haplotipo Corea) (c y d), <i>V. rindereri</i> (e) y <i>V. underwoodi</i> (f). La barra mide 500 µm. Fuente: Anderson y Trueman (2000).	30
Fig. 6. Aspecto general de las diferentes fases del ciclo de <i>Varroa</i> , obtenidas de una celda de obrera. Fila superior, de izquierda a derecha: protoninfa, deutocrisálida. Fila inferior, de izquierda a derecha: hembra joven adulta, acabada de mudar, hembra fundadora y macho. La barra mide 1 mm. Fuente: Leza, 2014.	34
Fig. 7. A. Aspecto de la superficie ventral de una hembra adulta de <i>V. destructor</i> . Se indican estructuras anatómicas. E.= esclerito; a1, a2, a3, a4: apéndices I, II, III y IV del idiosoma, respectivamente. B. Aspecto de la superficie dorsal de una hembra adulta del ácaro. Fuente: Leza, 2014.	35
Fig. 8. Vista ventral anterior del aparato bucal de una hembra adulta. Fuente: Leza, 2014.	37

Fig. 9. Detalle de las apéndices marchadores II y III derecha de una hembra adulta, en posición ventral. (1) Coxa, (2) Trocánter, (3) Fémur, (4) Genu, (5) Tibia, (6) Tarso, (7) Apotele. Fuente: Leza, 2014.	37
Fig. 10. Ciclo biológico de <i>V. destructor</i> . Fuente: adaptado de Henderson <i>et al.</i> (1986).	39
Fig. 11. Celda de cría de abeja obrera, tras retirar la pupa. Se observa una hembra fundadora de <i>V. destructor</i> y un macho, además de la “zona de acumulación fecal” = ZAF y la zona donde se acumulan las exuvias. Fuente: Leza, 2014.	42
Fig. 12. Patrón anual de crecimiento de las colonias de abejas. Línea continua: abejas; línea discontinua: cría de obrera. A. Modelo del Norte de Europa. B. Modelo Centroeuropeo. C. Modelo de zonas tropicales. D. Modelo mediterráneo. Fuente: Adaptado de Calis <i>et al.</i> (1999) y Murilhas (2002).	44
Fig. 13. Curva de crecimiento del ácaro a lo largo de un año en un clima templado del Hemisferio Norte (línea continua) y en un clima mediterráneo (línea discontinua). Fuente: Adaptado de OIE (2008) y Murilhas (2002).	45
Fig. 14. Curva poblacional del ácaro en cuatro regiones de la Península Ibérica. A. Clima mediterráneo (Valencia). B. Clima mediterráneo continental (Cordillera Bética). C. Clima mediterráneo continental oceánico (surco Intrabético). D. Clima mediterráneo subtropical (Costa del Sol, Andalucía). Las flechas indican el momento de la aplicación acaricida. Fuente: Adaptado de García Fernández (1997) y Calatayud y Verdú (1992).	46
Fig. 15. Dos individuos que presentan alas deformadas y abdomen reducido, síntomas claros de una infección por el virus de las alas deformadas (DWV). Fuente: Leza, 2010.	47
Fig. 16. Localización de los apiarios estudiados. Del área del Raiguer: (1) Campanet (UTM: 497254, 4404559) y (2) Santa María (UTM: 482445, 4386007); del Pla: (3) Llubí (UTM: 501457, 4393633) y (4) Ariany (UTM: 507689, 4388030); de la zona de Tramuntana: (5) Andratx (UTM: 449384, 4379963) y (6) Puigpunyent (UTM: 464222, 4385320); de Llevant: (7) Capdepera (UTM: 537436, 4396395) y (8) Son Servera (UTM: 530676, 4389326) y de la zona de Migjorn: (9) Campos (UTM: 505434, 4361827) y (10) Campos II (UTM: 503850, 4360334).	58
Fig. 17. Fotografías de los apiarios 1 (A), 3 (B), 5 (C) y 10 (D).	61
Fig. 18. A. Base de la colmena modificada con una malla de 3 mm y una bandeja extraíble. B. Base colocada en una colmena en campo.	62
Fig. 19. Fondo de la colmena en la que se pueden observar las deyecciones y los restos producidos por la colonia, agrupados en líneas de “suciedad”.	63

Fig. 20. Localización por municipios de los apiarios muestreados en 2010, en Eivissa y Mallorca.	67
Fig. 21. Localización por municipios de los apiarios muestreados en 2011, en Menorca y Mallorca.	67
Fig. 22. Examen de las muestras de abejas adultas. A. Pesado de muestras. B. Examen visual de las muestras. C. Recuento de ácaros.	69
Fig. 23. Examen de las muestras de cría de abejas. A. Retirada de los opérculos de las celdas y extracción de las larvas. B. Porción de un cuadro de colmena con cría de abeja. C. Ácaros extraídos de las celdas de cría.	69
Fig. 24. Localización del apiario experimental de la Universidad de las Islas Baleares (UIB).	71
Fig. 25. Apiario experimental ubicado en el Campus de la UIB.	72
Fig. 26. A. Tira de Apivar entre el tercer y cuarto cuadro de la colmena. B. Bandeja de Apiguard colocada sobre los cuadros de una colmena. C. Aplicación de BeeVital.	74
Fig. 27. Localización de los pinares en Eivissa. (A) Zona tratada con <i>Btk</i> (UTM: 31S 379032 m E 4322751 m N) y (B) parcela control (UTM: 31S 367720 m E 4321474 m N).	77
Fig. 28. Diferentes pasos de la metodología empleada para preparar las unidades experimentales. Cría de reinas (A-D). A-B. Transvase de larvas desde el cuadro de cría a las celdillas reales artificiales. C. Celdillas reales artificiales. Transvase de una larva a la cúpula, con la ayuda de un <i>picking</i> (aguja para el transvase). D. Introducción del cuadro con las celdillas artificiales en los núcleos tipo Perfección. E. Marcaje de una reina sujeta en el interior de un pistón. F. Marcaje de los cuadros utilizados en el presente estudio; en la fotografía puede apreciarse un núcleo Perfección de 5 cuadros.	80
Fig. 29. A. Fotografía de un cuadro objeto de estudio. B. Fotografía del mismo cuadro en el que se ha marcado el área de cría en color amarillo, usando el programa de Análisis de Imagen Arc View GIS 3.2.	81
Fig. 30. Curva poblacional de <i>Varroa</i> (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en la zona del Raiguer. En color verde el apiario 1 (Campanet) y en azul el apiario 2 (Santa María). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.	86

Fig. 31. Curva poblacional de <i>Varroa</i> (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en la zona del Pla. En color verde el apiario 3 (Llubí) y en azul el apiario 4 (Ariany). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.	87
Fig. 32. Curva poblacional de <i>Varroa</i> (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en la zona de la Serra de Tramuntana. En color verde el apiario 5 (Andratx) y en azul el apiario 6 (Puigpunyent). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.	88
Fig. 33. Curva poblacional de <i>Varroa</i> (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2010 en la zona de Llevant. En color verde el apiario 7 (Capdepera) y en azul el apiario 8 (Son Servera). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.	89
Fig. 34. Curva poblacional de <i>Varroa</i> (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en la zona de Migjorn. En color verde el apiario 9 (Campos I) y en azul el apiario 10 (Campos II). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.	90
Fig. 35. Curva poblacional general de <i>Varroa destructor</i> (medias \pm error estándar), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011.	91
Fig. 36. Media mensual del número de cuadros ocupados por abejas en cada muestreo (medias \pm error estándar), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011.	92
Fig. 37. Curva del número total de colonias perdidas en cada muestreo (medias \pm error estándar), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011, en el conjunto de apiarios incluidos en este trabajo.	93
Fig. 38. A. Patrón estacional de la temperatura mínima absoluta, la temperatura máxima absoluta y la temperatura media ($^{\circ}\text{C}$) (medias \pm error estándar). B. Patrón estacional de la precipitación (mm) (medias \pm error estándar). C. Patrón estacional de la humedad relativa media (%) (medias \pm errores estándar), registrados desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011.	94
Fig. 39. Patrón estacional del número total de tratamientos antivarroa aplicados a lo largo de los años, desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011.	95
Fig. 40. Comparación entre los valores observados y predichos de la abundancia de <i>Varroa</i> a partir de los modelos ambientales ajustados a las diferentes escalas de tiempo.	101

Fig. 41. Cantidad de colmenas presentes en los apiarios muestreados (%) en las Illes Balears. N= 69.	105
Fig. 42. Cantidad de colmenas presentes en los apiarios muestreados (%), representado por islas. Mallorca: n= 51; Menorca: n= 8; Eivissa: n= 6; Formentera: n= 4.	106
Fig. 43. Proporción de apicultores aficionados (1-50 colmenas), semiprofesionales (51-150 colmenas) y profesionales (más de 150 colmenas) en el conjunto de las Islas Baleares. N= 60.	107
Fig. 44. Proporción de apicultores aficionados (1-50 colmenas), semiprofesionales (51-150 colmenas) y profesionales (más de 150 colmenas), representado por islas. Mallorca: n= 49; Menorca: n= 8; Eivissa: n= 5; Formentera: n= 4.	108
Fig. 45. Tipo de colmenas presentes en los apiarios muestreados (%) en las Illes Balears. N= 74.	109
Fig. 46. Tipo de colmenas presentes en los apiarios muestreados (%), representado por islas. Mallorca: n= 56; Menorca: n= 8; Eivissa: n= 6; Formentera: n= 4.	110
Fig. 47. Número de tratamientos antivarroa al año (%) en las Illes Balears. N= 58.	111
Fig. 48. Número de tratamientos antivarroa al año (%), representado por islas. Mallorca: n= 42; Menorca: n= 6; Eivissa: n= 6; Formentera: n= 4.	112
Fig. 49. Productos antivarroa usados durante el primer tratamiento anual en las Illes Balears. N= 64.	113
Fig. 50. Productos antivarroa usados durante el segundo tratamiento anual en las Illes Balears. N= 26.	113
Fig. 51. Productos antivarroa usados en cada isla. Mallorca: n= 55; Menorca: n= 14; Eivissa: n= 10; Formentera: n= 6.	114
Fig. 52. Mes en el que se realiza la aplicación del tratamiento antivarroa en los casos en los que solo se efectúa una aplicación, en las Illes Balears. N= 36.	116
Fig. 53. Mes en el que se realiza la aplicación del tratamiento antivarroa en los casos en los que se efectúan dos aplicaciones, en las Illes Balears. Primer tratamiento: n= 34; segundo tratamiento: n= 25.	117
Fig. 54. Mapa de distribución del promedio de la prevalencia de <i>Varroa</i> (%) por municipios, en otoño de 2010, en Mallorca, Eivissa y Formentera.	121

Fig. 55. Mapa de distribución del promedio de la tasa de infestación de <i>Varroa</i> (%) por municipios, en otoño de 2010, en Mallorca, Eivissa y Formentera.	122
Fig. 56. Mapa de distribución del promedio de la prevalencia de <i>Varroa</i> (%) por municipios, en primavera de 2011, en Mallorca y Menorca.	124
Fig. 57. Mapa de distribución del promedio de la tasa de infestación de <i>Varroa</i> (%) por municipios, en primavera de 2011, en Mallorca y Menorca.	125
Fig. 58. Mapa de distribución del promedio de la prevalencia de <i>Varroa</i> (%) por municipios, de los años 2010 y 2011, en el conjunto de Baleares.	127
Fig. 59. Mapa de distribución del promedio de la tasa de infestación de <i>Varroa</i> (%) por municipios, de los años 2010 y 2011, en el conjunto de Baleares.	130
Fig. 60. Número de colmenas con <i>Varroa</i> por apiario en las muestras de Mallorca y Baleares.	134
Fig. 61. Media del número de ácaros caídos \pm error estándar de antes, durante y después del tratamiento, en unidades arbitrarias (U.A.), durante primavera de 2010. s.a.t.= semana anterior al tratamiento; s.= semana; s.p.t.= semana posterior al tratamiento.	137
Fig. 62. Media del número de ácaros caídos \pm error estándar de antes, durante y después del tratamiento, en unidades arbitrarias (U.A.), en otoño de 2011. s.a.t.= semana anterior al tratamiento; s.= semana; s.p.t.= semana posterior al tratamiento.	140
Fig. 63. Media del número de ácaros caídos \pm error estándar de antes, durante y después del tratamiento, en unidades arbitrarias (U.A.), obtenidas en primavera de 2013. s.a.t.= semana anterior al tratamiento; s.= semana; s.p.t.= semana posterior al tratamiento.	143
Fig. 64. Evolución del porcentaje de celdas ocupadas por cría de los núcleos Control (línea continua) y los núcleos tratados con <i>Btk</i> (línea discontinua). La flecha señala el momento de la aplicación del insecticida.	148
Fig. 65. A. Cuadro de una colmena muestreada, en el que pueden observarse hasta 5 celdas reales, señaladas con una flecha. B. Enjambre natural en un árbol localizado en la zona de estudio.	150
Fig. 66. Los datos representan las medias del porcentaje de celdas ocupadas por cría a lo largo del experimento en ambos grupos de colmenas. Los valores a t_0 fueron fijados en 100, y los valores obtenidos en los siguientes muestreos fueron representados como el porcentaje del valor de t_0 .	151

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Producción mundial de miel por regiones (1000 t). Datos: FAO, citados en <i>Honey reports, statistics and presentations from the CC and the EP on the implementation of the NAP in the MS</i> (2013).	21
Tabla 2. Identificación y distribución de las especies del género <i>Varroa</i> , incluyendo los haplotipos de <i>V. destructor</i> y <i>V. jacobsoni</i> . Fuente: Anderson y Trueman (2000) y Delfinado-Baker y Aggarwal (1987).	32
Tabla 3. Tamaño, precipitación media anual (P) y temperatura media anual (T) de las Islas Baleares.	56
Tabla 4. Porcentaje de área que engloba una superficie de 3 Km de radio alrededor de cada apiario cubierta por recursos vegetales (Área vegetal (%)) y porcentaje de esa área cubierta por zonas sin vegetación (Área no-vegetal (%)).	59
Tabla 5. Porcentaje de área que engloba una superficie de 3 Km de radio alrededor de cada apiario cubierta por cada masa vegetal diferenciada.	60
Tabla 6. Descripción de las variables consideradas en los modelos de la abundancia de <i>Varroa</i> .	65
Tabla 7. Características de los productos ensayados: principio activo (PA), presentación (P), tiempo de aplicación en semanas (T), modo de actuación (MA).	73
Tabla 8. Selección de los efectos aleatorios adecuados para los modelos de abundancia de <i>Varroa</i> : Tabla de valores de AIC para los modelos globales (que contienen todos los predictores ambientales) con diferentes combinaciones de efectos aleatorios para cada variable dependiente.	96
Tabla 9. Mejores modelos para el modelo anual, con los predictores de cada uno de ellos y los valores de LogLik, AIC y δ AIC.	97
Tabla 10. Coeficientes y valores de p para los predictores del modelo anual.	97
Tabla 11. Mejores modelos para el modelo semestral, con los predictores de cada uno de ellos y los valores de LogLik, AIC y δ AIC.	98
Tabla 12. Coeficientes y valores de p para los predictores del modelo semestral.	98

Tabla 13. Mejores modelos para el modelo mensual, con los predictores de cada uno de ellos y los valores de LogLik, AIC y δ AIC.	99
Tabla 14. Coeficientes y valores de p para los predictores del modelo mensual.	100
Tabla 15. Proporción de la aplicación correcta e incorrecta de los productos antivarroa en cada isla.	115
Tabla 16. Media y error estándar de los porcentajes de prevalencia (%P) y de la tasa de infestación (%I) en las muestras de abejas adultas, en otoño de 2010, primavera de 2011 y para el conjunto de las muestras (total). n= número de colmenas muestreadas.	119
Tabla 17. Media y error estándar de los porcentajes de prevalencia (%P) y de la tasa de infestación (%I) en las muestras de abejas adultas, en otoño de 2010 y primavera de 2011, por islas. n= número de colmenas muestreadas.	119
Tabla 18. Media y error estándar de los porcentajes de prevalencia (%P) y de la tasa de infestación (%I) en las muestras de abejas adultas de otoño de 2010, por regiones biogeográficas. n= número de colmenas muestreadas.	120
Tabla 19. Media y error estándar de los porcentajes de prevalencia (%P) y de la tasa de infestación (%I) en las muestras de abejas adultas de primavera de 2011, por regiones biogeográficas. n= número de colmenas muestreadas.	123
Tabla 20. Número de apiarios con todas las colmenas negativas a <i>Varroa</i> (Nivel 0), con nivel 1 (1 colmena de las 6 muestreadas por apiario parasitada por <i>Varroa</i>), nivel 2 (2 colmenas parasitadas de 6), nivel 3 (3/6), nivel 4 (4/6), nivel 5 (5/6) y nivel 6 (todas las colmenas del apiario parasitadas por <i>Varroa</i>), en otoño de 2010 y primavera de 2011.	126
Tabla 21. Número de apiarios cuyas colmenas presentan tasas de infestación media e infestación máxima muy ligeros, ligeros, medios, moderados o graves, en otoño de 2010 y primavera de 2011.	128
Tabla 22. Porcentaje de focalidad (%F) en las muestras de abejas adultas y de cría, en otoño de 2010, primavera de 2011 y para el conjunto de las muestras (total). n= número de apiarios muestreados.	131
Tabla 23. Porcentaje de focalidad (%F) en las muestras de abejas adultas y de cría de otoño de 2010 y primavera de 2011, por islas y regiones biogeográficas. n= número de apiarios muestreados.	132
Tabla 24. Número de ácaros caídos al fondo de la colmena (media \pm error estándar) obtenidos en las colmenas tratadas (Apivar y Apiguard) y control, desde el inicio del estudio (semana anterior al tratamiento) hasta la finalización del mismo (semana posterior a la finalización del tratamiento), llevado a cabo en primavera de 2010.	136

Tabla 25. Porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos (%R) y porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos (%CNAC) en las colmenas tratadas con Apivar y Apiguard, en primavera de 2010. M: media; EE: error estándar.	138
Tabla 26. Número de ácaros caídos al fondo de la colmena (media \pm error estándar) obtenidos en las colmenas tratadas (Apivar y Apiguard) y control, desde el inicio del estudio (semana anterior al tratamiento) hasta la finalización del mismo (semana posterior a la finalización del tratamiento), llevado a cabo en otoño de 2011.	139
Tabla 27. Porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos (%R) y porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos (%CNAC) en las colmenas tratadas con Apivar y Apiguard, en otoño de 2011. M: media; EE: error estándar.	141
Tabla 28. Número de ácaros caídos al fondo de la colmena (media \pm error estándar) obtenidos en las colmenas tratadas (Apivar, Apiguard y BeeVital) y control, desde el inicio del estudio (semana anterior al tratamiento) hasta la finalización del mismo (semana posterior a la finalización del tratamiento), llevado a cabo en primavera de 2013.	142
Tabla 29. Porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos (%R) y porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos (%CNAC) en las colmenas tratadas con Apivar, Apiguard y BeeVital, en primavera de 2013. M: media; EE: error estándar.	144
Tabla 30. Porcentaje de celdas ocupadas por cría, de cada núcleo analizado durante el periodo de muestreo. Btk: <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> ; C: control (núcleos no tratados); M: media; EE: error estándar.	148
Tabla 31. Resumen del clima y de la información sobre la localización de las estaciones meteorológicas utilizadas para cada apiario, en el estudio de la Dinámica poblacional de <i>V. destructor</i> y los factores que la modulan.	223



Estado sanitario de las colonias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) de las Islas Baleares: impacto del parásito *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) y efecto de los tratamientos aéreos con *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

Tesis doctoral, Maria del Mar Leza Salord

Resumen

En las últimas décadas se ha observado una elevada tasa de pérdida de colonias de abejas (*Apis mellifera*) a nivel mundial, lo que supone un riesgo debido al importante papel que desempeñan estos insectos en la conservación de ecosistemas y en la producción de alimentos. En la mayoría de casos se identifican claramente los factores implicados en las pérdidas: parásitos y patógenos introducidos, estado nutricional de las abejas y exposición a pesticidas. El objetivo de esta tesis se centró en el estudio de dos factores importantes para el estado sanitario de las colonias de abejas en Baleares: el ácaro *Varroa destructor* y el uso del insecticida *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*). Se estudió la dinámica poblacional de *V. destructor*, que se estimó evaluando la caída natural en el fondo de la colmena, y el rol de factores biológicos, climáticos, paisajísticos y de manejo sobre la curva poblacional. La prevalencia, infestación y focalidad del ácaro se calculó a partir de muestras de abejas adultas y de cría, recogidas en primavera y otoño. Además, la eficacia de los acaricidas Apivar, Apiguard y BeeVital se evaluó en condiciones de campo. Asimismo se analizó el efecto sobre las abejas de la aplicación aérea en campo de *Btk* valorando el porcentaje de celdas ocupadas por cría mediante análisis de imágenes.

La abundancia de *Varroa* a lo largo del año resultó bimodal, con dos máximos, uno durante primavera y otro en verano/otoño, resultando el de primavera el más elevado. A partir de un Modelo Lineal Generalizado Mixto se mostró que la abundancia de *Varroa* aumentó significativamente con la abundancia de las abejas. Asimismo, la abundancia del ácaro aumentó al disminuir las temperaturas en el primer semestre del año y su abundancia disminuyó con el aumento de la humedad relativa en el periodo de julio a diciembre. Además, el presente trabajo es uno de los primeros que relaciona la reducida disponibilidad de recursos naturales con los niveles de *Varroa*, mostrando que

las colmenas situadas en una zona con una menor proporción de recursos naturales presentaron una mayor abundancia de *Varroa*.

La infestación media del ácaro en Baleares fue ligera (menor al 1%), la prevalencia detectada fue de entre el 34,78% en otoño y el 44,09% en primavera, y más del 80% de los apiarios muestreados en Baleares presentaban *Varroa*. Se estudió la distribución estadística del número de colonias por apiario parasitadas por *Varroa*, observándose que se ajusta a la distribución Poisson, lo que refleja la situación epidemiológica endémica de este parásito en Baleares.

Una encuesta realizada a los apicultores indicó un bajo nivel de profesionalización del sector en Baleares y una inadecuada aplicación de los tratamientos. En los ensayos de campo de la eficacia de los acaricidas, el Apiguard (Timol) resultó el más eficaz, y el momento de aplicación más adecuado fue primavera. La baja eficacia del Apivar (Amitraz) podría estar relacionada con la aparición de resistencias. Así, el Timol podría representar una alternativa en las estrategias de control integrado contra *V. destructor*, ya que tiene un bajo riesgo de residuos y de resistencias.

Finalmente, los resultados de la aplicación aérea del *Btk* (realizada para controlar la procesionaria del pino) sobre las colonias de *Apis mellifera* no mostraron ningún efecto de este insecticida en el desarrollo de la cría de las abejas.



Estat sanitari de les colònies de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) de les Illes Balears: impacte del paràsit *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) i efecte dels tractaments aeris amb *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

Tesis doctoral, Maria del Mar Leza Salord

Resum

Durant les darreres dècades s'ha observat una elevada taxa de pèrdua de colònies d'abelles (*Apis mellifera*) a nivell mundial, la qual cosa suposa un risc degut a l'important paper que desenvolupen aquests insectes en la conservació d'ecosistemes i en la producció d'aliments. A la majoria dels casos s'identifiquen clarament els factors implicats en les pèrdues: paràsits i patògens introduïts, estat nutricional de les abelles i exposició a pesticides. L'objectiu d'aquesta tesi es va centrar en l'estudi de dos factors importants per a l'estat sanitari de les colònies d'abelles a Balears: l'àcar *Varroa destructor* i l'ús de l'insecticida *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*). Es va estudiar la dinàmica poblacional de *V. destructor*, que va ser estimat calculant la caiguda natural de l'àcar en el fons de la casera, i el rol de factors biològics, climàtics, paisatgístics i de maneig sobre la corba poblacional. La prevalença, infestació i focalitat de l'àcar es va calcular a partir de mostres d'abelles adultes i de cria recollides en primavera i tardor. A més, l'eficàcia dels acaricides Apivar, Apiguard y BeeVital es va avaluar en condicions de camp. Així mateix, es va analitzar l'efecte sobre les abelles de l'aplicació aèria a camp de *Btk*, valorant el percentatge de cel·les ocupades per cria mitjançant anàlisi d'imatges.

L'abundància de *Varroa* al llarg de l'any va resultar bimodal, amb dos màxims, un durant primavera i l'altre a l'estiu-tardor, resultant el de primavera el més elevat. A partir d'un Model Lineal Generalitzat Mixt es va mostrar que l'abundància de *Varroa* va augmentar significativament amb l'abundància de les abelles. Així mateix, l'abundància de l'àcar va augmentar al disminuir les temperatures del primer semestre de l'any i la seva abundància va disminuir amb l'augment de la humitat relativa del període de juliol a desembre. A més, el present treball és un dels primers que relaciona la reduïda disponibilitat de recursos naturals amb els nivells de *Varroa*, mostrant que les

caseres situades a una zona amb una menor proporció de recursos naturals presentaven una major abundància de *Varroa*.

La infestació mitjana de l'àcar a Balears fou lleugera (menor a l'1%), la prevalença detectada fou d'entre el 34,78% a la tardor i el 44,09% a primavera, i més del 80% dels apiaris mostrejats a Balears presentaven *Varroa*. Es va estudiar la distribució estadística del nombre de colònies per apiari parasitades per *Varroa*, observant-se que s'ajusta a una distribució Poisson, la qual cosa reflexa la situació epidemiològica endèmica d'aquest paràsit a Balears.

Una enquesta realitzada als apicultors va indicar un baix nivell de professionalització del sector a Balears i una inadequada aplicació dels tractaments. En els assajos de camp de l'eficàcia dels acaricides, l'Apiguard (Timol) va resultar el més eficaç, i el moment d'aplicació més adequat fou primavera. La baixa eficàcia de l'Apivar (Amitraz) podria estar relacionada amb l'aparició de resistències. Així, el Timol podria representar una alternativa en les estratègies de control integrat contra *V. destructor*, ja que presenta un baix risc de residus i de resistències.

Finalment, els resultats de l'aplicació aèria del *Btk* (realitzada per a controlar la processionària del pi) sobre les colònies d' *Apis mellifera* no mostraren cap efecte d'aquest insecticida en el desenvolupament de la cria d'abelles.



Health status of the *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies in the Balearic Islands: impact of the parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and effect of aerial treatments of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

Doctoral Thesis, Maria del Mar Leza Salord

Abstract

Rapid and substantial losses have been observed in honeybee (*Apis mellifera*) populations worldwide over the last decade. Honeybees contribute to food security and their extinction would represent a serious biological imbalance. These losses have been attributed to a combination of different potential causes, such as diseases, poor nutrition and frequent applications of insecticides to control pests. The aim of the present thesis was the study of two important factors related to the health status of the honeybee colonies in the Balearic Islands: the mite *Varroa destructor* and the application of the insecticide *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*). This study examines the seasonal patterns of *V. destructor*, estimated by assessing the natural falling of the mite using modified bottom board, and the role of different factors, such as host density, natural resources, management and climate. Prevalence, infestation and focality of the mite have been estimated in adult and brood samples during spring and autumn. Furthermore, the efficacy of miticides such as Apivar, Apiguard and BeeVital has been tested in field conditions. Finally, the impact of aerial applications of *Btk* on honeybee colonies has been assessed by estimating breeding through image analysis.

The annual pattern of abundance of *Varroa* was bimodal, with two peaks, one in spring and other in summer/autumn, being the spring peak always larger. The relationship between *Varroa* abundance and environmental predictors was examined using Generalized Linear Mixed Models, showing higher *Varroa* abundance when bee densities increased. Furthermore, *Varroa* abundance was higher at low temperatures from January to June and lower at high relative humidity periods from July to December. A key novel finding was that low availability of natural flowering resources lead to high levels of infestation of *Varroa*.

The mean infestation of the mite in the Balearic Islands was low (less than 1%), the prevalence detected was between 34.78% during autumn and 44.09% during spring, and more than 80% of the apiaries sampled showed *Varroa*. The statistical distribution of the number of colonies per apiary with *Varroa* was fitted to a Poisson distribution, reflecting the endemic epidemiological situation of the parasite in the Balearic Islands.

A survey conducted to beekeepers indicated a low-level of professionalization of the apiculture and showed that miticides are frequently wrongly applied. Field assays of the efficacy of miticides revealed that Apiguard (Thymol) was more effective, being Spring the best season to apply the product. Other products such as Apivar (Amitraz) demonstrated a poor efficacy, which may be attributed to resistance phenomenon that would be needed to be tested in Balearic population honeybees. Therefore, Thymol could represent an alternative in integrated control strategies against *V. destructor*, having a low risk of residues and resistance.

Finally, the aerial treatments of *Btk* against processionary caterpillar did not show any effect of on the brood development of honeybees.

Capítulo 1: Introducción y objetivos

Capítulo 1: Introducción

Las abejas de la miel y su estado sanitario se han convertido en las últimas décadas en un tema relevante para científicos, apicultores y la sociedad en general, como consecuencia de las implicaciones ambientales y económicas que supone la elevada tasa de pérdida de colmenas que se ha estado observando recientemente. Y es que las abejas juegan un papel importante en la polinización y su desaparición provocaría un serio desequilibrio biológico y desencadenaría una crisis alimentaria a nivel mundial.

Precisamente este capítulo versa sobre la importancia económica y ambiental de las abejas, así como sobre su actual estado de salud. Entre los factores más relevantes que influyen en su estado sanitario, se han destacado el cuadro nutricional, el uso de pesticidas y la presencia de parásitos y patógenos, centrandó la atención en el ácaro ectoparásito *Varroa destructor* (Acari: Varroidae).

1.1.- Importancia socio-económica y ambiental de las abejas

Las **abejas** desarrollan un rol importante tanto en la **conservación de los ecosistemas naturales** como en la **producción de alimentos** a nivel mundial, ya que son polinizadores esenciales de plantas silvestres y cultivadas (Smith *et al.*, 2013).

Se estima que las abejas polinizan alrededor del 80% de los cultivos y plantas silvestres, contribuyendo como mínimo con 22 billones de euros cada año a la agricultura europea. Asimismo, algunos estudios revelan que la proporción de cultivos dependientes de estos polinizadores se está incrementando a nivel mundial, valorando el aumento en un 300 % desde 1961 (Aizen y Harder, 2009).

Precisamente por su valiosa contribución a la **polinización** de frutales, cultivos y flora silvestre, la **abeja melífera** (*Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae)) es el tercer animal doméstico más importante de Europa, después del ganado bovino y

porcino y antes que las aves de corral (Tautz, 2008). Se han publicado numerosos estudios sobre el valor económico de la polinización de la abeja melífera (Robinson *et al.*, 1989; Morse y Calderone, 2000; Hanley *et al.*, 2014), estimando su valor a nivel global en 215 billones de dólares al año (van Engelsdorp *et al.*, 2008; Gallai *et al.*, 2009), lo que equivale a 173.305 millones de euros.

Además de este importante rol ambiental que juegan las abejas debido a su labor de polinización, las abejas elaboran diferentes **productos apícolas** como miel, polen, cera, propóleos, jalea real y veneno, siendo la **miel** el producto de mayor relevancia.

A **nivel mundial**, la producción de miel ha ido aumentando en las últimas décadas, lo que está asociado al incremento del número de colmenas. Concretamente, la producción de miel se ha incrementado en un 40% aproximadamente desde 1982 (Figura 1), y el número de colmenas ha aumentado un 45% desde 1961 (Aizen y Harder, 2009).

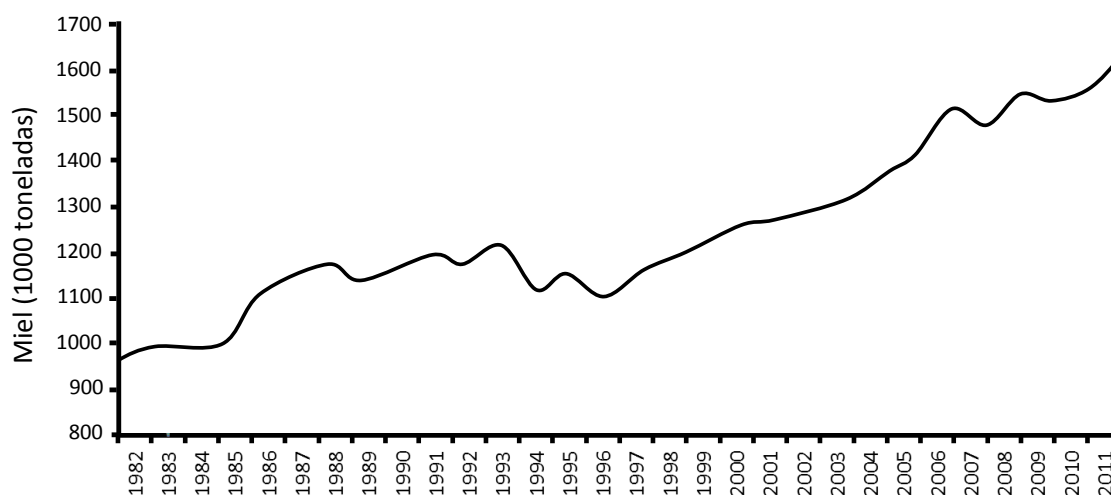


Figura 1. Producción mundial de miel (1000 t). Datos: FAO, citados en *Honey reports, statistics and presentations from the Commission to the Council (CC) and the European Parliament (EP) on the implementation of the national apiculture programmes (NAP) in the Member States (MS)* (2013).

Datos de la FAO sitúan a **Europa** como el segundo productor de miel del mundo, después de Asia, contribuyendo con un 22,8% al total de la producción mundial (Tabla 1). Según la Comisión Europea, en la Unión Europea hay 630.000 apicultores y un total de 16.000.000 de colmenas (Chauzat *et al.*, 2014), que produjeron 217.366 toneladas en 2011 (Fig. 2).

Tabla 1. Producción mundial de miel por regiones (1000 t). Datos: FAO, citados en *Honey reports, statistics and presentations from the CC and the EP on the implementation of the NAP in the MS* (2013).

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Asia	489	515	543	586	615	664	674	683	732
Europa	317	335	343	358	339	352	354	350	373
Centro y Sudamérica	209	215	236	244	222	211	200	206	213
África	152	155	162	180	175	183	177	174	186
Norte América	117	118	109	119	99	104	98	113	103
Oceanía	29	24	26	29	29	31	30	30	30
Total	1.322	1.363	1.419	1.516	1.478	1.545	1.534	1.556	1.636

De entre los países de la UE, **España** es el primer productor de miel, según fuentes de la FAO (Fig. 2) y el segundo en cuanto al número de colmenas (un 17,59% del total). Como puede observarse en la Fig. 2, la producción de miel en 2011 se situó en 34.000 toneladas, registrándose una recuperación de la producción después del importante descenso de 2005, que se atribuyó a la pérdida de colmenas debida al síndrome de despoblamiento sufrido ese año (Higes *et al.*, 2010). Destaca el alto nivel de profesionalización del sector, siendo el segundo país con más proporción de apicultores profesionales (definidos como aquellos cuyas explotaciones reúnen más de 150 colmenas) suponiendo un 22,51% del total, después de Grecia (39,53%). Según el MAGRAMA existe un incremento constante del censo, que en el periodo 2006-2012 aumentó un 12%.

En cuanto al valor de producción del sector, datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) de 2012, apuntan que la importancia económica en España de la apicultura es menor que otros sectores ganaderos, con un valor estimado anual de la producción (fundamentalmente miel, polen y cera) próximo a 62 millones de euros, representando el 0,44% de la Producción Final Ganadera (PFG) y el 0,17% de la Producción Final Agraria (PFA). Aunque en esa estimación no se ha incluido el valor que las abejas tienen respecto a la polinización de los cultivos (que según la FAO es 20-30 veces superior al de los productos apícolas) y la conservación del medio ambiente.

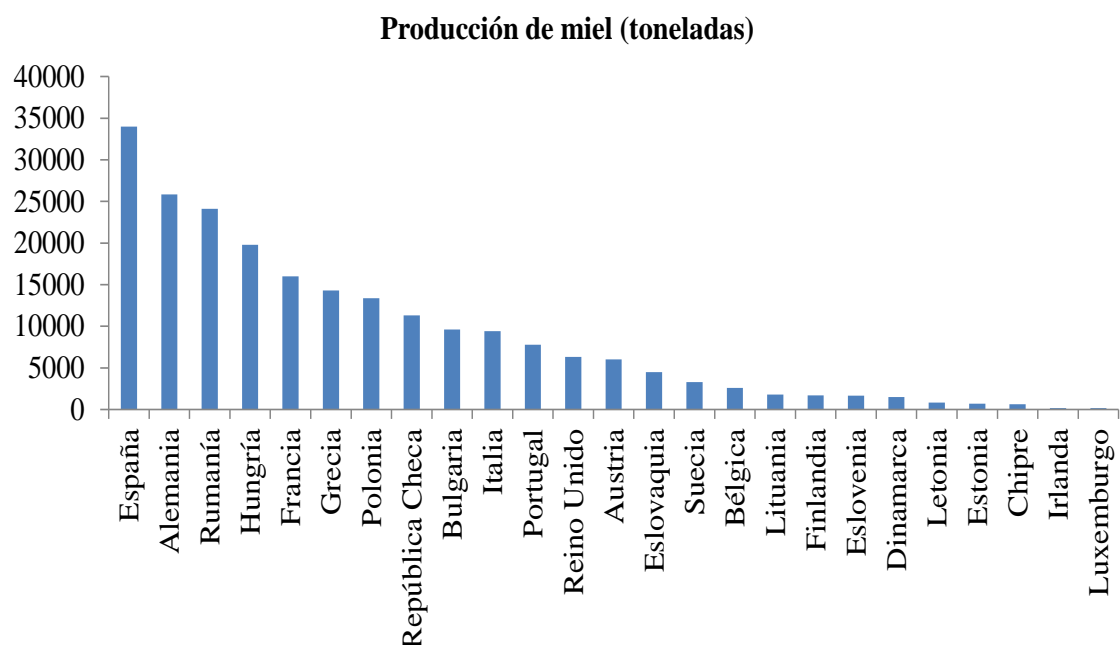


Fig. 2. Producción de miel (en toneladas) por países miembros de la Unión Europea, en 2011. Datos: FAO, citados en *Honey reports, statistics and presentations from the CC and the EP on the implementation of the NAP in the MS* (2013).

Según datos de DataComex (Agencia Estatal de Administración Tributaria, AEAT), la tendencia tanto de exportaciones como importaciones de miel en España ha ido aumentando en los últimos diez años. En 2013 España exportó 21.284 t, de las cuales 18.304 t se dirigieron hacia otros países de la UE (un 33,3% hacia Francia,

seguido de Alemania con un 23,7%). Asimismo, España importó 22.096 toneladas, de las cuales 17.026 t provenían de países de fuera de UE (de las cuales un 86,6% procedía de China, seguido de Uruguay con un 3,3%).

Centrando la atención en el caso de las **Islas Baleares**, la apicultura de esta región se caracteriza por presentar un alto porcentaje de aficionados, apicultores pequeños o de autoconsumo que, en su gran mayoría, no practican trashumancia. Según fuentes del Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA) actualizado a fecha de noviembre de 2014, en las Islas Baleares hay un total de 552 explotaciones, lo que supone un 0,02% de las explotaciones en España. Si bien España es el segundo país con más proporción de apicultores profesionales de la UE (con un 22,51% de profesionales), en Baleares los profesionales (explotaciones con más de 150 colmenas) representan el 2% del total (Fig. 3A). La mitad de las explotaciones se concentran en Mallorca (Fig. 3B), y más del 90% son estantes (frente al 60% del resto de España). En 2012 la producción de miel en Baleares fue de 100 t, un 0,0034% de la producción española.

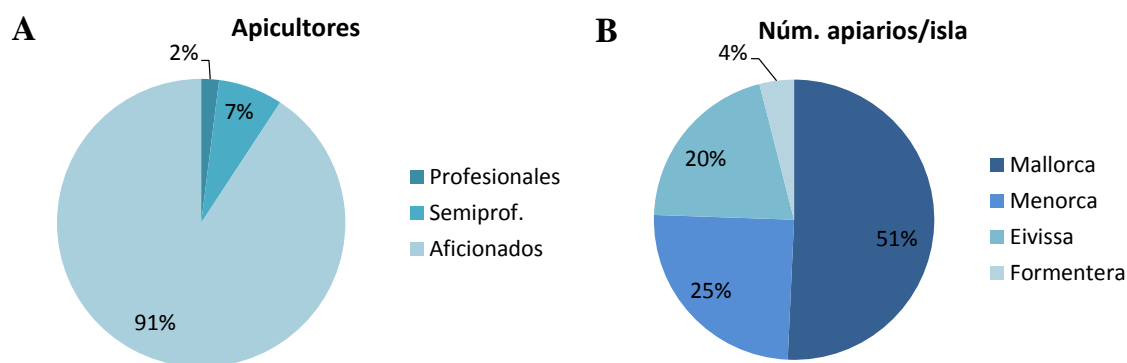


Fig. 3. A. Porcentajes de apicultores profesionales (más de 150 colmenas), semiprofesionales (entre 50 y 149 colmenas) y aficionados (menos de 50 colmenas) presentes en las Islas Baleares. **B.** Distribución de apiarios entre las diferentes islas del archipiélago Balear. Fuente: Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA) de la *Conselleria de Agricultura, Medi ambient i Territori*, Noviembre de 2014.

Además del valor de la polinización y de los productos apícolas, la apicultura presenta un valor añadido ya que puede contribuir a la creación de **medios de vida**

sostenibles para muchos pequeños agricultores y otros habitantes, tanto de zonas rurales como no rurales, en **países en vías de desarrollo**. Estas empresas apícolas ofrecen un gran potencial con inversiones mínimas, ya que no requiere la propiedad o el alquiler de la tierra, se puede iniciar con los equipos y herramientas que pueden ser de origen local y en muchos casos las habilidades y los conocimientos necesarios se encuentran en las propias tradiciones locales. Aparte de suponer una importante fuente de ingresos regulares para las familias de apicultores, los productos apícolas mejoran la nutrición y la salud de las familias (FAO, 2011).

1.2.- Sanidad apícola

El número global de colmenas se ha visto incrementado en un 45% desde 1961 (Aizen y Harder, 2009), sin embargo en las últimas décadas se ha observado una elevada tasa de **pérdida de colonias** de abejas en todo el hemisferio norte (Neumann y Carreck, 2010) (Fig. 4).

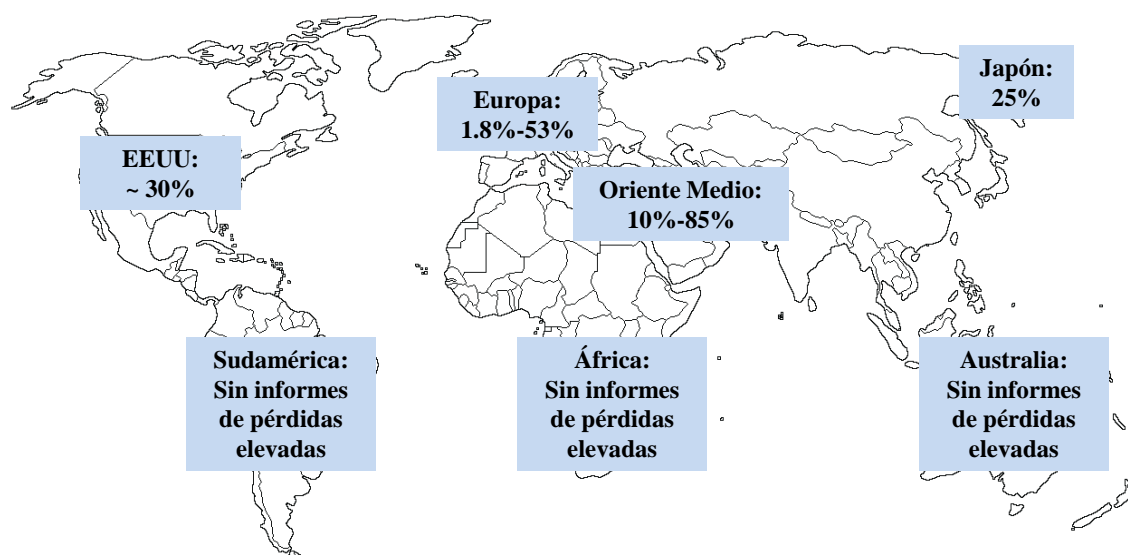


Fig. 4. Porcentajes observados de pérdidas de colmenas de abejas. Fuente: Adaptado de Neumann & Carreck, 2010.

Estas pérdidas han suscitado un gran interés entre la comunidad científica y la sociedad (Kearns *et al.*, 1998; Withgott, 1999; Kremen y Ricketts, 2000; Holden, 2006), debido a las repercusiones que tienen tanto económicas como a nivel de seguridad alimentaria y riqueza biológica.

Investigadores de todo el mundo han llevado a cabo numerosos estudios para entender los factores que contribuyen a este declive, pero sin una estandarización de los métodos ni de la terminología utilizada para definir los casos de pérdidas de colmenas. Así, durante mucho tiempo las pérdidas han sido erróneamente atribuidas al trastorno del colapso de las colonias o “*Colony Collapse Disorder*” (CCD siglas en inglés), no obstante el CCD es solo uno de los posibles factores que influyen en las las pérdidas de colmenas, pero no la única (vanEngelsdorp y Meixner, 2010). Para atajar esta doble problemática, la asociación internacional COLOSS (“Prevention of honey bee COLony LOSSes” - <http://coloss.org/>, prevención de la pérdida de colonias de abejas de la miel) publicó un libro, el COLOSS BEEBOOK, en el que se describen tanto los métodos de estudio como la terminología estándar, reconocidos a nivel internacional. A continuación se definen los conceptos de colmena perdida y colmena débil y se describe la sintomatología del síndrome de despoblamiento y del trastorno del colapso de las colonias, tal y como están detallados en el COLOSS BEEBOOK (van der Zee *et al.*, 2013).

Las características que presenta una **colmena perdida** son las siguientes:

- a) Se reduce tanto el número de abejas de la colmena que ya no puede realizar las actividades biológicas normales necesarias para su supervivencia (mantener a la cría, recolección de recursos), o
- b) la colmena tiene problemas relacionados con la reina que no pueden ser resueltos (como por ejemplo, la reina realiza únicamente puesta de zánganos, o bien las obreras, en ausencia de la reina, realizan una puesta de zánganos) o
- c) la colmena se ha perdido por causas ajenas a problemas de salud, como debido a un robo, al fuego, a inundaciones, tormentas.
- d) La colmena ya no tiene abejas vivas.

Una **colmena débil** es una colmena que no se considera perdida, pero que presenta un número de abejas menor del que cabría esperar por el tamaño que se observó en una inspección anterior.

Por otra parte, los síntomas que presenta una colmena con **síndrome de despoblamiento de las colonias** o “*Colony Depopulation Syndrome*” (CDS siglas en inglés) son los siguientes:

- a) Reducción del número de abejas vivas (no hay o quedan muy pocas), y
- b) no hay abejas muertas o hay muy pocas enfrente de la colmena o en el apiario, y además
- c) hay comida en la colmena (van der Zee *et al.*, 2013).

El **trastorno del colapso de las colonias** o “*Colony Collapse Disorder*” (CCD siglas en inglés) se caracteriza por los siguientes síntomas:

- a) Una rápida pérdida de abejas obreras adultas en colonias débiles o colonias muertas, pero que tienen un exceso de cría en relación a la población adulta (vanEngelsdorp *et al.*, 2009b);
- b) no hay abejas muertas, ni dentro ni en la zona de alrededor de las colmenas afectadas (vanEngelsdorp *et al.*, 2009b);
- c) invasión posterior de las colmenas por plagas (Ellis *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2013) u otras colonias vecinas (Cox-Foster *et al.*, 2007); y
- d) las colonias afectadas no presentaban niveles dañinos del ácaro *Varroa destructor* ni del microsporidio *Nosema* sp. en el momento del colapso (vanEngelsdorp *et al.*, 2009b).

En la mayoría de estos casos se identifican claramente los factores implicados en las pérdidas, aunque en el caso del CCD todavía se desconocen las causas concretas que lo provocan (Williams *et al.*, 2010). En este sentido, hay un creciente consenso entre los científicos de que, en la mayoría de los casos, **las pérdidas se deben a una combinación de factores**. Así, las investigaciones sobre las causas apuntan en tres

direcciones: la presencia de **parásitos y patógenos** introducidos, el **estado nutricional** de las abejas y la exposición a **pesticidas** (Goulson *et al.*, 2015).

1.2.1.- Parásitos y patógenos

Los **parásitos y patógenos** introducidos son particularmente devastadores para las abejas. Entre ellos destacan el ácaro *Varroa destructor*, los virus y el microsporidio *Nosema* spp.

Antes de la entrada en Europa y América del Norte del ectoparásito *V. destructor* en la década de los setenta y ochenta (respectivamente), las enfermedades de mayor repercusión económica eran las que afectaban a la cría de abeja, como la loque americana (*Paenibacillus larvae*), la loque europea (*Melissococcus plutonius*) y la ascosferosis (*Ascosphaera apis*). A día de hoy no son las más relevantes, aunque siguen causando pérdidas significativas a nivel global (vanEngelsdorp y Meixner, 2010).

Actualmente un factor clave de las pérdidas recientes de colmenas a nivel mundial es el ácaro *V. destructor* (Brodschneider y Crailsheim, 2010; Currie *et al.*, 2010; Chauzat *et al.*, 2010; Genersch *et al.*, 2010; Guzman-Novoa *et al.*, 2010; Le Conte *et al.*, 2010; Schafer *et al.*, 2010; Topolska *et al.*, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2010; Nazzi *et al.*, 2012). Este ácaro se alimenta de la hemolinfa de las abejas, siendo además vector de diferentes virus, entre los que destaca el virus de las alas deformadas (*Deformed wing virus*, DWV) (Gisder *et al.*, 2009), cuya infección se ha visto que está significativamente correlacionada con la pérdida de colmenas (Genersch y Aubert, 2010). Si bien se han desarrollado diversas estrategias para el control de *V. destructor*, ninguna hasta el momento ha sido eficaz.

Por otra parte, el parásito *N. ceranae*, que provoca la disentería en abejas, ha sido citado como el causante de las elevadas pérdidas sufridas en España (Higes *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008; Botias *et al.*, 2012), y aunque su virulencia todavía no ha sido demostrada en otros países (Gisder *et al.*, 2010), algunas investigaciones apuntan a que es un problema global, tal y como indica la amplia prevalencia de este parásito en múltiples hospedadores, como *A. mellifera* y *A. cerana* (Botias *et al.*, 2013; Higes *et al.*, 2013).

1.2.2.- Estado nutricional

El **estado nutricional** de las abejas juega un papel importante en la resistencia a las enfermedades y es el reflejo de los cambios producidos en las últimas décadas en los campos de cultivo, que se han visto empobrecidos en cuanto a diversidad.

En este sentido, la intensificación agrícola, el aumento de la superficie de monocultivos y la pérdida de hábitat natural favorecen el empobrecimiento del estado nutricional de las abejas de la miel, afectando a su salud, a la cantidad de progenie producida y a su longevidad (Oldroyd, 2007; Brodschneider y Crailsheim, 2010).

1.2.3.- Pesticidas

Se ha comprobado que la exposición a **pesticidas** puede provocar efectos perjudiciales sobre el sistema inmunológico, la memoria, el comportamiento de búsqueda de alimento o la discriminación de olores en las abejas (Desneux *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Alaux *et al.*, 2010; Bernal *et al.*, 2010; Williamson y Wright, 2013).

i) Insecticidas de síntesis: los neonicotinoides

Actualmente los insecticidas neonicotinoides han centrado toda la atención. Son insecticidas sistémicos, extensamente usados en campos de cultivo polinizados por abejas de la miel (Johnson *et al.*, 2010), cuyos residuos se han encontrado en muestras de polen y néctar (Thompson, 2010; Cresswell, 2011). Estos productos químicos pueden provocar una toxicidad aguda, subletal y crónica en función del nivel de concentración que presenten. Algunos estudios muestran el efecto negativo de los neonicotinoides sobre las abejas (Desneux *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 2013), mientras que otros muestran efectos poco significativos a nivel de colonia bajo condiciones de toxicidad crónica (Nguyen *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010). Desde diciembre de 2013, el uso de tres de estos insecticidas (Imidacloprid, Thiametoxam y Clotianidina) está prohibido parcialmente en la Unión Europea por un periodo de dos años, en base a informes elaborados por la EFSA (*European Food Safety Authority*) en los que se confirma el riesgo que suponen estas materias para las abejas. Además, algunos estudios muestran que la vulnerabilidad a ciertos patógenos, como

Nosema, se ve aumentada por la presencia de neonicotinoides (Pettis *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

ii) Insecticidas de origen biológico: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

Por otra parte, en los últimos años la comunidad científica ha debatido sobre la implicación del insecticida de origen biológico *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (*Bt*) en las pérdidas de colonias de abejas, debido a su uso intensivo para el control de plagas agrícolas y forestales (Iriarte *et al.*, 1998; Mommaerts *et al.*, 2010). El *Bt* es uno de los bioinsecticidas más usados, empleado desde hace décadas como alternativa a los plaguicidas químicos. Las toxinas derivadas del *Bt* (proteínas Cry y Cyt, glicoproteínas de elevado peso molecular denominadas δ -endotoxinas) se sintetizan durante la fase de esporulación del bacilo y forma inclusiones cristalinas parasporales, que actúan selectivamente contra Lepidópteros (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk*), Coleópteros (*Bt* subsp. *tenebrionis*) y Dípteros (*Bt* subsp. *israeliensis*) (Pigott y Ellar, 2007). Sin embargo, al aplicarse el insecticida en aerosol los organismos no-diana (por ejemplo las abejas) quedan expuestos a las toxinas vía contacto o por la ingestión de polen y néctar contaminado. Los estudios muestran que este pesticida no induce la mortalidad de las abejas (Hanley *et al.*, 2003; Malone *et al.*, 2004; Porcar *et al.*, 2008; Alquisira-Ramirez *et al.*, 2014), aunque hay ensayos de laboratorio que muestran efectos negativos en el pecoreo (Ramirez-Romero *et al.*, 2005; Ramirez-Romero *et al.*, 2008) o toxicidad sobre las abejas adultas (Brighenti *et al.*, 2007).

iii) Acaricidas antivarroa

Finalmente, otro grupo de pesticidas a tener en cuenta son los acaricidas que se usan para controlar la varroosis. Éstos se colocan directamente en la colmena y se acumulan en la cera (Johnson *et al.*, 2009), por lo que están en continuo contacto directo con las abejas. Hay que destacar que estudios recientes han detectado una elevada variedad de acaricidas y pesticidas agrícolas dentro de las colonias de abejas (VanEngelsdorp *et al.*, 2009a; Mullin *et al.*, 2010), observando un efecto sinérgico sobre las colmenas de algunos de ellos (Johnson *et al.*, 2009).

1.3.- El parásito *Varroa destructor*

1.3.1.- Taxonomía, distribución geográfica e historia natural

El género *Varroa* incluye cuatro especies de ácaros ectoparásitos obligados: *V. destructor*, *V. jacobsoni*, *V. underwoodi* y *V. rindereri*. En la Fig. 5 pueden apreciarse las diferencias morfológicas entre las cuatro especies del género *Varroa*.

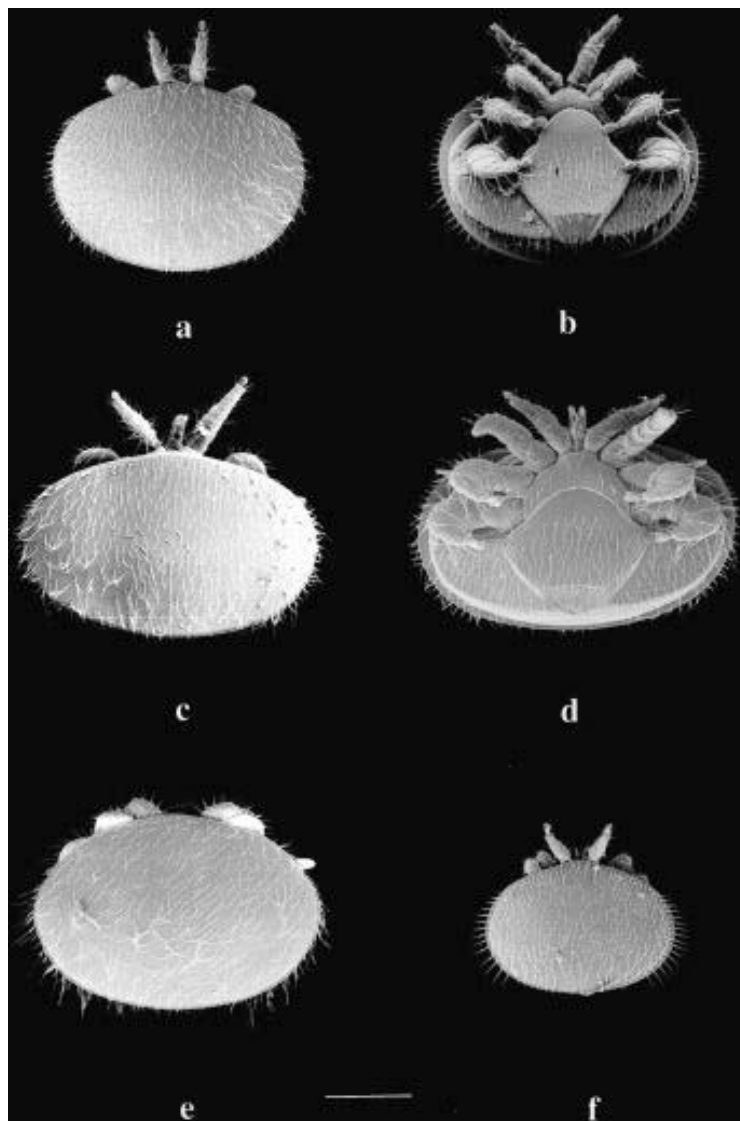


Fig. 5. Aspecto de la superficie dorsal (a, c, e y f) y ventral (b y d) de hembras adultas de *V. jacobsoni* (haplotipo Java) (a y b), *V. destructor* (haplotipo Corea) (c y d), *V. rindereri* (e) y *V. underwoodi* (f). La barra mide 500 μm . Fuente: Anderson y Trueman (2000).

La clasificación taxonómica (después de Lindquist *et al.*, 2009) de *V. destructor* se presenta a continuación:

Phylum Arthropoda

Subphylum Chelicerata

Classis Arachnida

Subclassis Acari

Superordo Parasitiformes

Ordo Mesostigmata

Familia Varroidae

Varroa destructor

V. destructor es el ácaro responsable de la enfermedad conocida como varroosis en *Apis mellifera* y la única especie de *Varroa* que provoca pérdidas económicas importantes en apicultura. Hasta el año 2000, cuando Anderson y Trueman (2000) describieron dicha especie, se consideraba que la especie responsable de la enfermedad era *V. jacobsoni*, por lo que todos los estudios anteriores sobre varroosis referentes a *V. jacobsoni* tienen en realidad como sujeto de investigación a *V. destructor*. Anderson y Trueman (2000) llevaron a cabo un estudio en el que analizaron ácaros del género *Varroa* de diferentes lugares del mundo y encontraron diferencias morfológicas, reproductivas y genéticas, e identificaron la nueva especie *V. destructor*, que parasita tanto *A. mellifera* (hospedador nuevo) como *A. cerana* (hospedador original). Aunque los detalles acerca del cambio de hospedador siguen siendo debatidos (Rosenkranz *et al.*, 2010), lo más probable es que el proceso se produjera cuando se transportó un conjunto de colonias de *A. mellifera* al Este de Rusia o al Extremo Oriente en la primera mitad del siglo XX, induciendo una distribución simpátrica de las dos especies de abejas (Oldroyd, 1999) permitiendo que el parásito infestara la nueva especie hospedadora. Un largo período de coevolución permitió que se estableciera una relación hospedador-parásito estable en *A. cerana* (Rath, 1999), lo que no ocurre todavía con el nuevo hospedador *A. mellifera*. Este parásito se fue expandiendo alrededor del mundo,

encontrándose en la región de la costa oriental de la URSS (1952), en Pakistán (1955), Japón (1958), China (1959), Bulgaria (1967), América del Sur (Paraguay, 1971), Alemania (1977), España (1985), Estados Unidos (1987), Reino Unido (1992), Nueva Zelanda (2000), Hawai (2007) (de Guzman y Rinderer, 1999; Thompson *et al.*, 2002; Llorente, 2003; Rosenkranz *et al.*, 2010). Hoy en día, *V. destructor* es casi cosmopolita, sin encontrarse todavía en Australia (AQIS, *Australian Government*, 2014).

Se han descrito al menos seis haplotipos de *V. destructor*, de los cuales dos parasitan *A. mellifera* (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación y distribución de las especies del género *Varroa*, incluyendo los haplotipos de *V. destructor* y *V. jacobsoni*. Fuente: Anderson y Trueman (2000) y Delfinado-Baker y Aggarwal (1987).

Especie	Hospedador	Haplotipo	Distribución geográfica
<i>V. destructor</i>	<i>Apis mellifera</i>	Corea (K, del inglés Korea)	Europa, Oriente Medio, Sudáfrica, Asia, Norteamérica y Sudamérica.
		Japón/Tailandia (J)	Japón, Tailandia, Norteamérica y Sudamérica.
	<i>Apis cerana</i>	Japón/Tailandia	Japón, Tailandia.
		Nepal	Nepal.
		Corea	Corea.
		China	China.
		Vietnam	Vietnam.
<i>V. jacobsoni</i> *	<i>Apis cerana</i>	Ambon Bali Borneo Flores Java Lombok Sumatra Sumbawa Malasia	Indonesia, Papúa Nueva Guinea.
<i>V. underwoodi</i>	<i>Apis cerana</i>		Nepal
<i>V. rindereri</i>	<i>Apis koschevnikovi</i>		Borneo

* *V. jacobsoni* puede encontrarse parasitando *A. mellifera*, pero sin capacidad reproductiva en esta especie.

Mientras que el haplotipo K es más virulento y se encuentra distribuido por todo el mundo, el haplotipo J presenta una distribución más restringida y una menor virulencia (de Guzman y Rinderer, 1999).

En España, *Varroa* se detectó por primera vez en la frontera con Francia, en diciembre de 1985 (Llorente, 2003) y desde entonces se propagó por toda la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias. Los aspectos relacionados con la expansión del ácaro en Baleares son poco conocidos. Hay dos hipótesis sobre la entrada de *Varroa* en Mallorca: o bien entró por la zona oeste a partir de unas colmenas trashumantes afectadas procedentes de Valencia, o bien se expandió desde la zona noreste de la isla a través de unas colmenas procedentes del centro o del norte de Europa.

Un estudio llevado a cabo por Muñoz *et al.* (2008) confirmó que el haplotipo Coreano (K) es el que está presente en *Apis mellifera iberiensis*, tanto en la Península Ibérica como en ambos archipiélagos.

1.3.2.- Morfología

Este apartado se centra en la morfología externa de *V. destructor* y en algunos aspectos de su morfología interna que, por su relación con la biología del ácaro, son de especial interés.

Esta especie presenta un claro **dimorfismo sexual** y, en el caso de las hembras, muestra numerosas adaptaciones morfológicas al parasitismo.

Macroscópicamente, la distinción entre sexos en edad adulta se aprecia en tres aspectos (Ifantidis, 1983). En primer lugar se observa una diferencia en el tamaño del idiosoma y en la relación de tamaño entre el idiosoma y los apéndices. Los machos son más pequeños que las hembras y tienen los apéndices más largos en relación con el tamaño del idiosoma. Las hembras miden 1167,3 μ m (\pm 26,8 μ m) de largo y 1708,9 μ m (\pm 41,2 μ m) de ancho (Anderson y Trueman, 2000), mientras que los machos miden 832 μ m (\pm 80 μ m) de largo y 795 μ m (\pm 88 μ m) de ancho (Delfinado-Baker, 1984). Otra diferencia entre sexos es la forma del cuerpo, elíptica en las hembras y más redonda-

triangular en los machos. Finalmente, la coloración del cuerpo también es diferente, siendo las hembras de color marrón (lo que se debe a que tanto el escudo dorsal como los ventrales están fuertemente esclerotizados) y los machos de un amarillo claro (ya que la esclerotización es débil, marcada sobre todo a nivel de los apéndices y el escudo dorsal) (Fig. 6).

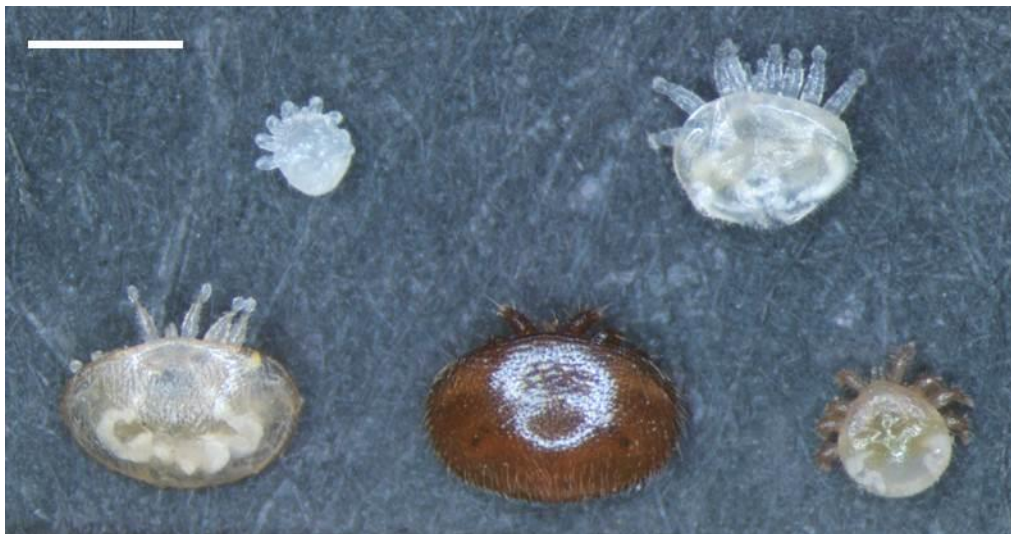


Fig. 6. Aspecto general de las diferentes fases del ciclo de *Varroa*, obtenidas de una celda de obrera. Fila superior, de izquierda a derecha: protoninfa, deutocrisálida. Fila inferior, de izquierda a derecha: hembra joven adulta, acabada de mudar, hembra fundadora y macho. La barra mide 1 mm. Fuente: Leza, 2014.

Como todos los ácaros, el adulto tiene el cuerpo dividido en dos tagmas: el gnatosoma y el idiosoma (Fig. 7A). El **gnatosoma** es la región que incluye el aparato bucal, en posición antero-ventral. El **idiosoma** es el tagma posterior, comprende casi la totalidad del cuerpo del ácaro y lleva cuatro pares de apéndices, el primero con función sensorial y los otros tres con función marchadora.

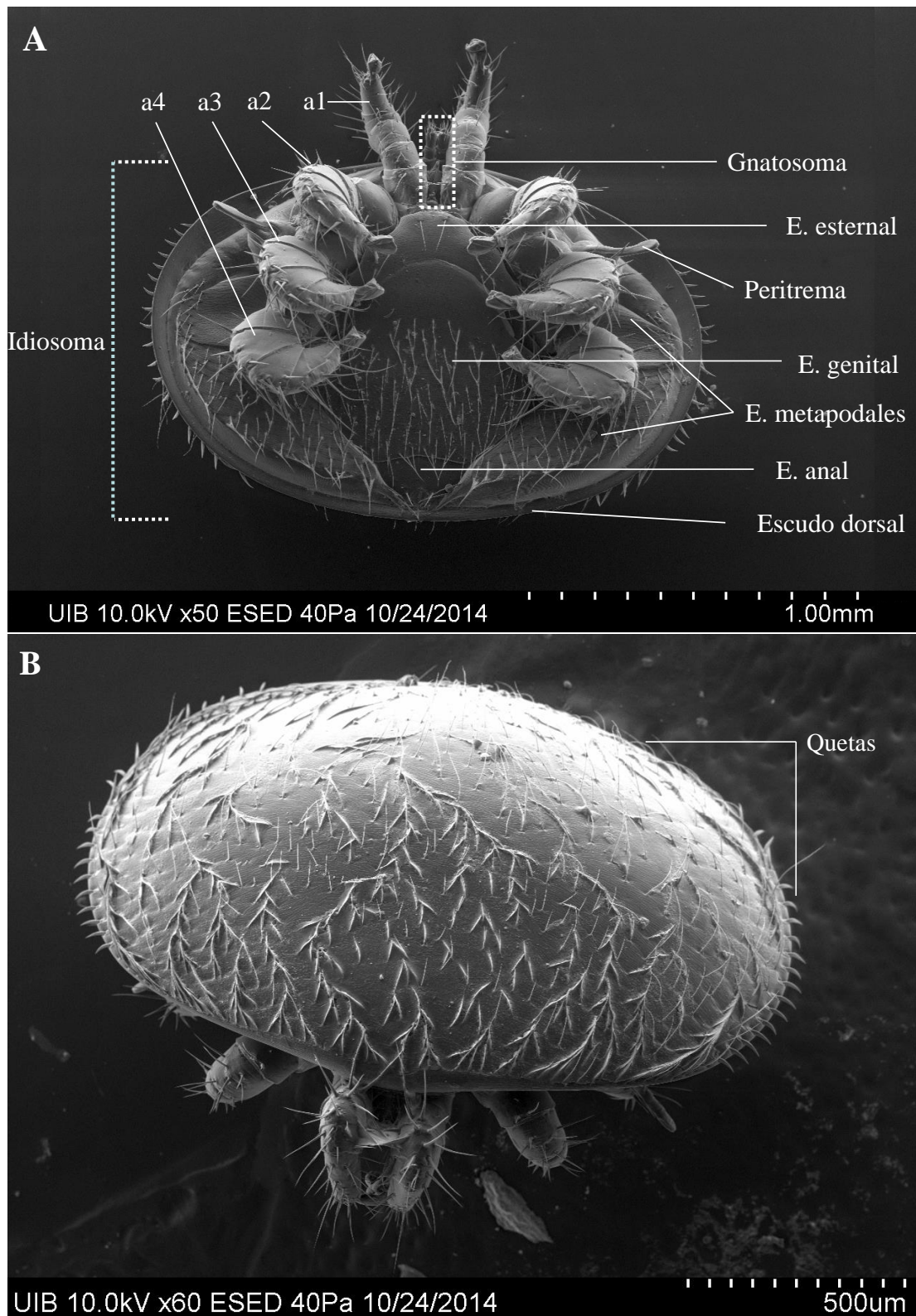


Fig. 7. A. Aspecto de la superficie ventral de una hembra adulta de *V. destructor*. Se indican estructuras anatómicas. E.= esclerito; a1, a2, a3, a4: apéndices I, II, III y IV del idiosoma, respectivamente. **B.** Aspecto de la superficie dorsal de una hembra adulta del ácaro. Fuente: Leza, 2014.

El gnatosoma se encuentra enfundado en el **camerostoma**, que es una cavidad hallada en la zona antero-ventral del idiosoma, entre las bases del primer par de apéndices (Fig. 7A). El idiosoma está fuertemente esclerotizado en las hembras. Ventralmente está formado por diferentes placas ventrales, denominadas escleritos (siguiendo el eje antero-posterior encontramos: esclerito esternal, genital, anal, metapodal anterior y un par de escleritos metapodales posteriores). Entre los escleritos hay una membrana fina y flexible, que le permite a la hembra dilatarse después de la ingesta de hemolinfa y dar cabida a los huevos desarrollados. Dorsalmente se presenta formado por un fuerte caparazón quitinoso sin dividir (Fig. 7B).

Todo el cuerpo, incluyendo los apéndices y el aparato bucal, se cubre con diferentes tipos de **quetas** que tienen funciones mecano y quimiorreceptoras (Milani y Nannelli, 1988). En la parte dorsal del escudo se distinguen dos tipos de quetas: las filiformes, que están distribuidas por toda la superficie dorsal, y las espiniformes, que se encuentran en la línea marginal lateral del escudo (Fig. 7B).

El **aparato bucal**, adaptado en las hembras para perforar y succionar, está formado por dos pedipalpos sensoriales y dos quelíceros. Cada quelíceros consta de tres segmentos (basal, medio y distal). En las hembras, el segmento distal es móvil y tiene dos dientes pequeños (Fig. 8). En los machos, este segmento se ha transformado en el espermiódactilo, que es una estructura en forma de cánula por la que se transfiere el esperma al tracto genital de la hembra. Debido a esta modificación el macho no puede alimentarse, por lo que no sobrevive fuera de la celda de cría.

En las hembras, a diferencia de los machos, el idiosoma presenta **adaptaciones al parasitismo**, como un aplanamiento dorso-ventral. Además, los apéndices son cortos y fuertes, con los siete artejos habituales en ácaros: coxa, trocánter, fémur, genu (o patela), tibia, tarso y, por último, el apotele (o pretarso) en la extremidad distal, que en esta especie está adaptado para la fijación al hospedador (De Ruijter y Kaas, 1983) (Fig. 9).

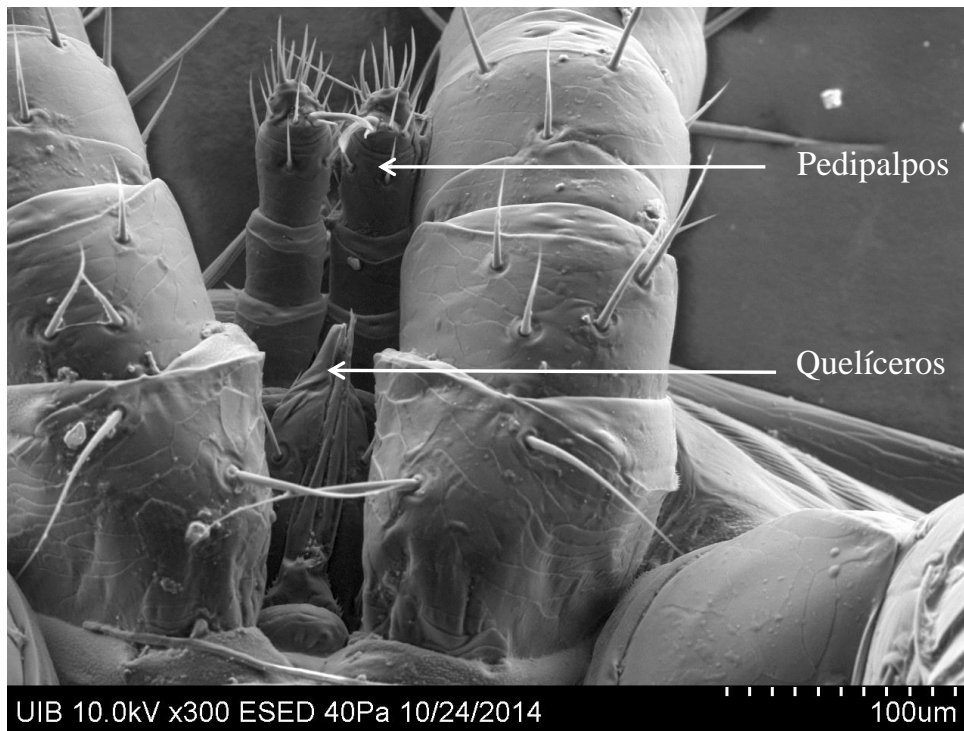


Fig. 8. Vista ventral anterior del aparato bucal de una hembra adulta. Fuente: Leza, 2014.

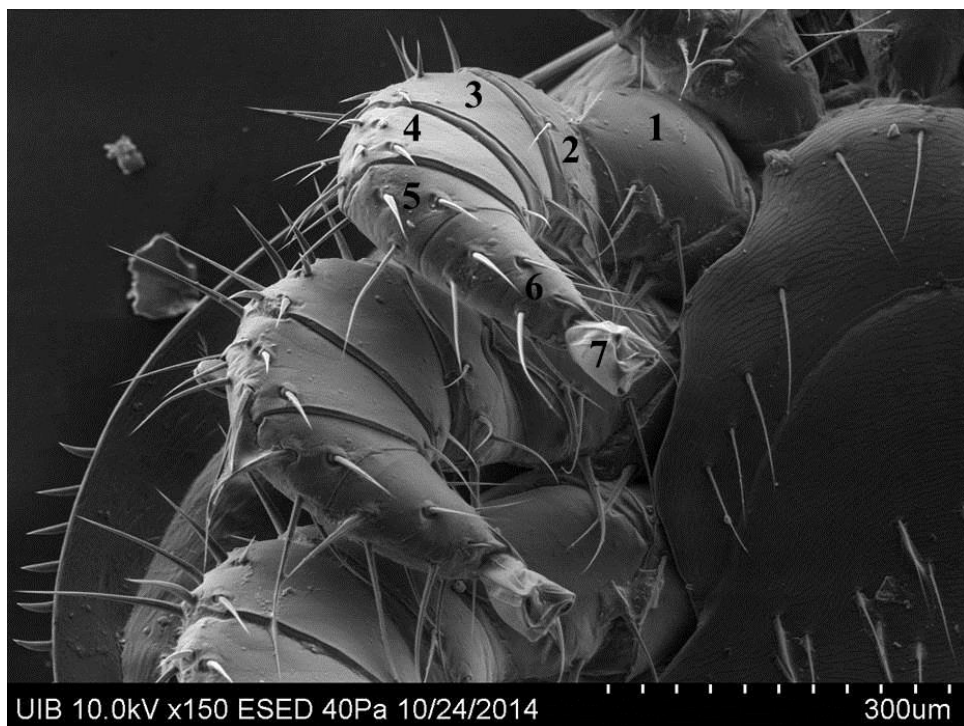


Fig. 9. Detalle de los apéndices marchadores II y III derecha de una hembra adulta, en posición ventral. (1) Coxa, (2) Trocánter, (3) Fémur, (4) Genu, (5) Tibia, (6) Tarso, (7) Apotele. Fuente: Leza, 2014.

El **primer par de apéndices** del idiosoma se utiliza raramente para el movimiento, tiene una función sensorial similar a las antenas de los insectos (Rickli *et al.*, 1992). En los tarsos de dichos apéndices se encuentra un órgano sensorial (Ramm y Böckeler, 1989), presumiblemente para la percepción olfativa, gustativa y con la presencia de receptores de humedad y temperatura.

Referente al **sistema reproductor femenino**, la hembra recibe el esperma por un par de poros, llamados solenostomas, localizados a cada lado del idiosoma, entre las coxas III y IV. Estos poros se abren en un sistema de túbulos hasta el conducto del esperma, que conduce a la espermateca. La espermateca es un órgano en forma de saco (Alberti y Hänel, 1986) que sirve como depósito para los espermatozoides y que conecta con la cámara espermática, que a su vez establece la conexión con el ovario, en donde el oocito es fecundado. El oocito llega al útero, pasa a la vagina y al orificio genital (situado entre el segundo par de apéndices del idiosoma), a través del cual se liberan los huevos.

El **sistema reproductor masculino** está formado por un solo testículo situado en la parte posterior del cuerpo. Desde el testículo emergen dos conductos deferentes que se unen a un único conducto eyaculador, que se abre en el borde de la placa esternal entre el segundo par de apéndices del idiosoma, y se comunica con el espermiodáctilo.

El **sistema respiratorio** está formado por una red simétrica de tráqueas y traqueolas, que se comunica con el exterior por medio de un estigma, un orificio situado entre las coxas III y IV, uno a cada lado. La depresión que rodea el estigma se prolonga en un apéndice tubular aplanado, el peritrema respiratorio (Fig. 7A).

1.3.3.- Ciclo biológico

El ciclo biológico de *V. destructor* está íntimamente ligado a la abeja y carece de estadio de vida libre (Fig. 10).

En el caso de las hembras, el ciclo biológico consta de dos fases: la **fase forética** en las abejas adultas, y la **fase reproductiva** dentro de las celdas de cría de abeja. En

cambio, los machos presentan una única fase que se encuentra solamente en las celdas de cría operculadas.

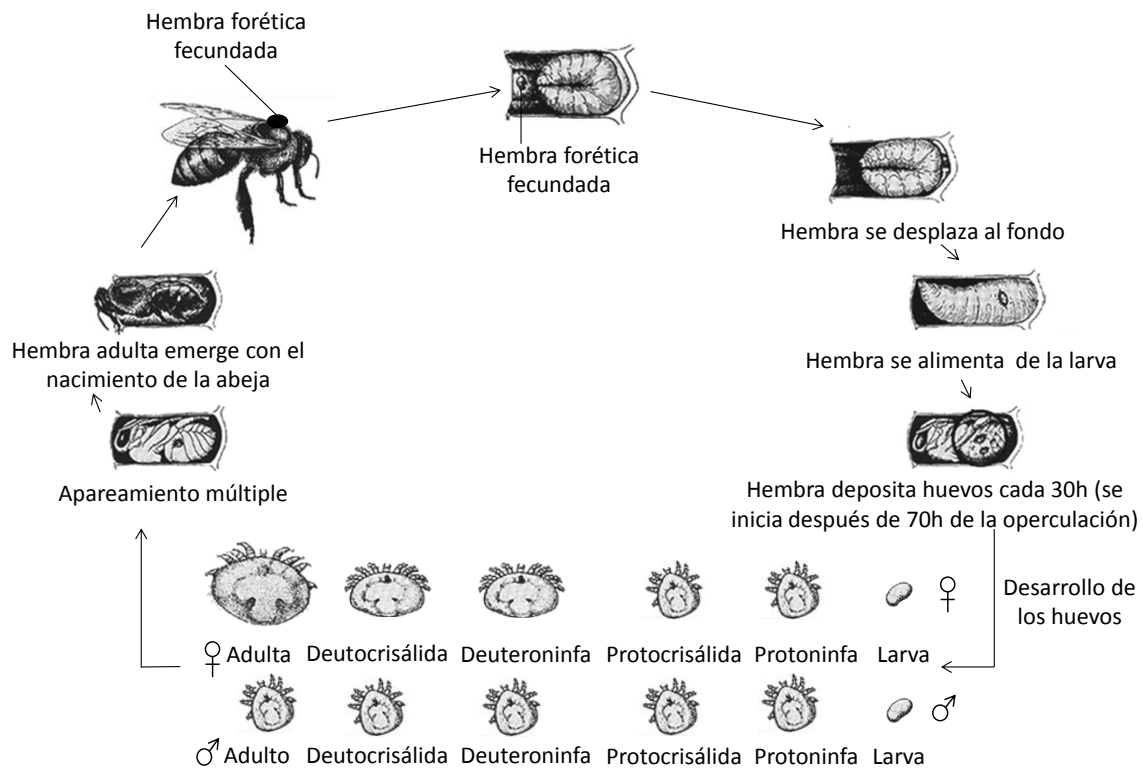


Fig. 10. Ciclo biológico de *V. destructor*. Fuente: adaptado de Henderson *et al.* (1986).

Durante la **fase forética**, las hembras de *Varroa* se adhieren a las abejas adultas por la zona de los esternitos (Fernandez *et al.*, 1993). Es en esta fase cuando los ácaros pueden ser diseminados, o bien por las abejas obreras durante el pecoreo (a veces se desorientan y derivan hacia otras colmenas) y la enjambrazón (Kuenen y Calderone, 1997), o bien por los zánganos (que tienen acceso a cualquier colmena durante la temporada reproductiva de las abejas).

Las hembras de *Varroa* han desarrollado un **comportamiento de búsqueda y preferencia del hospedador**, que se desencadena por varios factores, tanto físicos como químicos. Prefieren las abejas nodrizas que alimentan las larvas, para así poder

introducirse más fácilmente en las celdas. Todavía no está claro el proceso de selección de las abejas, pero se cree que usan el reconocimiento de la composición de la cutícula de las abejas, que sigue patrones en función de su edad o de la función específica que desempeña (Kuenen y Calderone, 1997). Asimismo, el parásito tiene preferencia por las celdas de cría de macho para aumentar las posibilidades de éxito reproductivo (Fuchs, 1990; Boot *et al.*, 1995; Calderone y Kuenen, 2001), ya que son de mayor tamaño y permanecen operculadas durante más tiempo.

La **fase reproductiva** comienza con la entrada de una hembra progenitora fecundada (hembra fundadora) en el interior de la celda de cría de abeja, en la que hay una larva de estadio quinto. El ácaro se coloca entre la larva de abeja y la pared de la parte inferior de la celda y queda sumergido en el alimento de la larva hospedadora. Este comportamiento puede ser una adaptación del parásito para evitar la detección y la eliminación por parte de las abejas que se ocupan de la higiene de la colmena.

Aproximadamente cinco horas después de la operculación de la celda, la larva de la abeja ha consumido el resto de su comida, de la que se ha alimentado también el ácaro (Ifantidis, 1988), y éste empieza a succionar la hemolinfa de la larva. En las siguientes horas empieza la oogénesis, seguida de la vitelogénesis (Steiner *et al.*, 1994; Steiner *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 2000), y setenta horas después de la operculación de la celda, *Varroa* deposita el primer **huevo** (Ifantidis, 1983; Steiner *et al.*, 1994). Éste no está fecundado, debido a la determinación haplo-diploide del sexo, y por tanto da lugar a un **macho haploide**. Los huevos posteriores están fecundados y dan **hembras**, en intervalos de treinta horas (Rehm y Ritter, 1989; Ifantidis, 1990; Martin, 1994). Normalmente ponen cinco huevos en las celdas de abejas obreras y seis en las celdas de zánganos (Martin, 1994; Martin, 1995; Garrido y Rosenkranz, 2003), diferencia que se debe a que la fase operculada de los zánganos dura catorce días, frente a los doce que dura la de las obreras.

Durante las primeras horas después de la oviposición se desarrolla la **larva** del ácaro dentro del huevo (Nannelli, 1985). Posteriormente pasa por una primera etapa ninfal, que se divide en una fase móvil: **protoninfa**, y una inmóvil: **protocrisálida**. A continuación pasa por una segunda etapa ninfal, que también se divide en dos fases:

deuteroninfa (móvil) y **deutocrisálida** (inmóvil), hasta la fase **adulto** (inmediatamente después de la última muda) (Ifantidis, 1983; Laurent y Santas, 1987; Donze y Guerin, 1994) (Fig. 10). El tiempo de desarrollo es de unos 5,8 y 6,6 días en hembras y machos, respectivamente (Rehm y Ritter, 1989; Ifantidis, 1990; Donze y Guerin, 1994; Martin, 1994). Las exuvias (cubierta cuticular que abandona el artrópodo tras la muda) de la abeja y de los ácaros se acumulan en el fondo de la celda (Fig. 11).

Por otra parte, la hembra fundadora perfora la cutícula de la pupa de la abeja, generalmente a nivel del quinto segmento, para que las ninfas que se están desarrollando puedan alimentarse. Después de la alimentación, los ácaros migran a la “zona de acumulación fecal” (Donze y Guerin, 1994; Kanbar y Engels, 2003). Esta zona, que es de color blanquecino (Fig. 11), es donde los ácaros se aparean normalmente, lo que ocurre en cuanto alcanzan la madurez sexual. El macho alcanza la madurez antes que las hembras descendientes y queda a la espera de la primera hembra adulta madura, lo que ocurre unas veinte horas más tarde. El **apareamiento** se inicia tan pronto la primera hembra alcanza la madurez y emite las feromonas volátiles que atraen al macho (Donze *et al.*, 1996; Ziegelmann *et al.*, 2013). El apareamiento es múltiple, con cada una de las hembras descendientes maduras. La espermateca se puede llenar con 35 espermatozoides, tras varios apareamientos (Donze y Guerin, 1994; Donze *et al.*, 1996).

El ciclo se completa cuando nace la nueva abeja, ya que con ella emergen la hembra fundadora y aquellas descendientes hembras que dispusieron de tiempo suficiente para alcanzar la madurez. Tanto el descendiente macho como sus hermanas inmaduras no sobreviven.

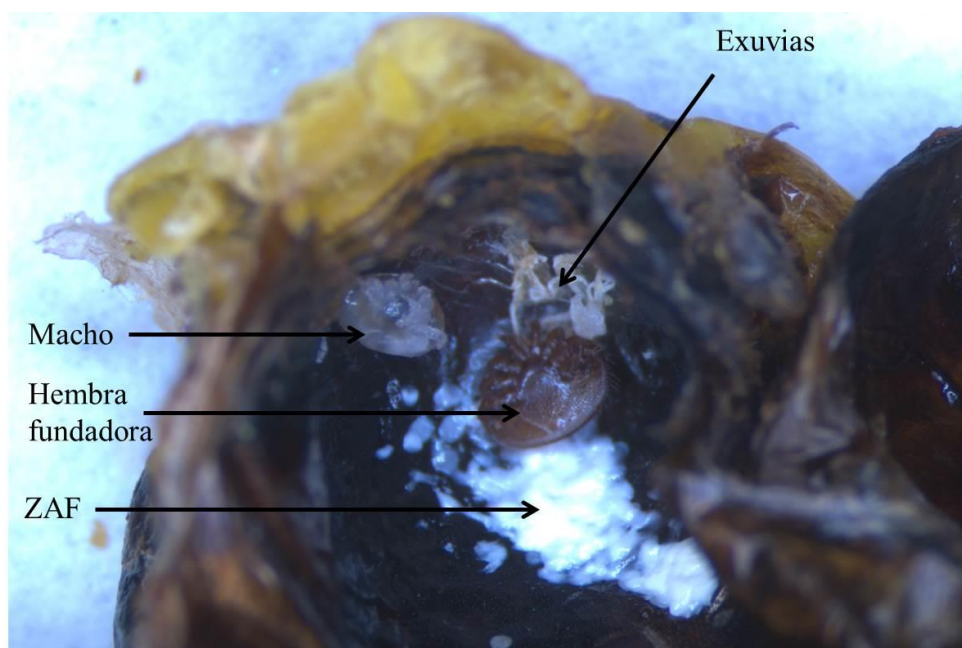


Fig. 11. Celda de cría de abeja obrera, tras retirar la pupa. Se observa una hembra fundadora de *V. destructor* y un macho, además de la “zona de acumulación fecal” = ZAF y la zona donde se acumulan las exuvias. Fuente: Leza, 2014.

1.3.4.- Dinámica poblacional e influencia de los factores ambientales

La dinámica poblacional de *V. destructor* depende de multitud de **factores**, tanto intrínsecos (características del hospedador y del parásito), como extrínsecos a la colmena (relativos al ambiente). La mayoría de estos factores se ven influenciados entre ellos y forman parte de un complejo multifactorial. En este apartado se describen los factores que tienen influencia sobre la dinámica poblacional del ácaro, pese a que todavía no se conoce con exactitud el impacto de cada parámetro por separado (Rosenkranz *et al.*, 2010). Asimismo, en este apartado, se describe la curva poblacional anual del ácaro.

Entre los **factores intrínsecos** destacan aquellos que modifican el ratio reproductivo y la mortalidad del parásito, que dependen de las características tanto del hospedador como del parásito. Las características del parásito que influyen en el crecimiento de su población son la capacidad reproductiva y la esperanza de vida; mientras que entre las características del hospedador destacan la viabilidad de la cría, la

presencia de cría de zánganos, la enjambrazón y el grado de comportamiento de defensa de la colonia (Fries *et al.*, 1994; Calis *et al.*, 1999; Fries *et al.*, 2003).

Las condiciones microclimáticas de la colmena se pueden ver afectadas por **factores externos** como la temperatura, la humedad o la disponibilidad de polen y néctar, que influyen en algunas características del hospedador (DeJong *et al.*, 1984; Moretto *et al.*, 1991; Eguaras *et al.*, 1994; García-Fernández *et al.*, 1995; DeJong, 1996; Moretto *et al.*, 1997), y que pueden influir indirectamente sobre la población del ácaro (Rosenkranz *et al.*, 2010). Por ejemplo, Kraus y Velthuis (1997) observaron que en condiciones de elevada temperatura y humedad relativa, las abejas no podían mantener la cría, lo que provocó una menor abundancia del parásito. Otro factor que puede influir en la dinámica poblacional es la reinfestación, entendida como el intercambio de ácaros que se da cuando los zánganos van de una colmena a otra, cuando se producen pillajes (Greatti *et al.*, 1992; Goodwin *et al.*, 2006) o deriva de las abejas o cuando se intercambian cuadros debido al manejo del apicultor, y que induce a una pérdida de ácaros en unas colmenas y a una entrada en otras.

La **curva poblacional anual** del parásito está estrechamente relacionada con el **patrón anual del hospedador**, ya que requiere de cría para poder completar su ciclo. Como puede observarse en las Figuras 12A y 12B, en las zonas del Norte y del Centro de Europa con **clima templado frío**, el patrón anual de la colonia de abejas se caracteriza por presentar un solo pico anual de cría y una parada invernal de la misma (Jeffree, 1955; Wilson, 1986). En cambio, el modelo es diferente al de las áreas **tropicales** (Fig. 12C), **subtropicales** o **mediterráneas** (Fig. 12D) con inviernos suaves y disponibilidad de alimento a lo largo del año, lo que permite la cría durante todo el año (excepto algún periodo de enjambrazón) (Calatayud y Verdu, 1995; Branco *et al.*, 1999; Calis *et al.*, 1999).

Si bien parece lógico, en un principio, que la abundancia de *Varroa* sea mayor en colmenas de áreas tropicales, se ha observado que los niveles de infestación son menores en dichas zonas (DeJong *et al.*, 1984; Ritter y DeJong, 1984; Moretto *et al.*, 1991; Eguaras *et al.*, 1994; García-Fernández *et al.*, 1995; Rosenkranz *et al.*, 2010), lo

que demuestra un posible equilibrio entre la viabilidad de la cría del hospedador, el ratio de parasitación y la mortalidad del ácaro.

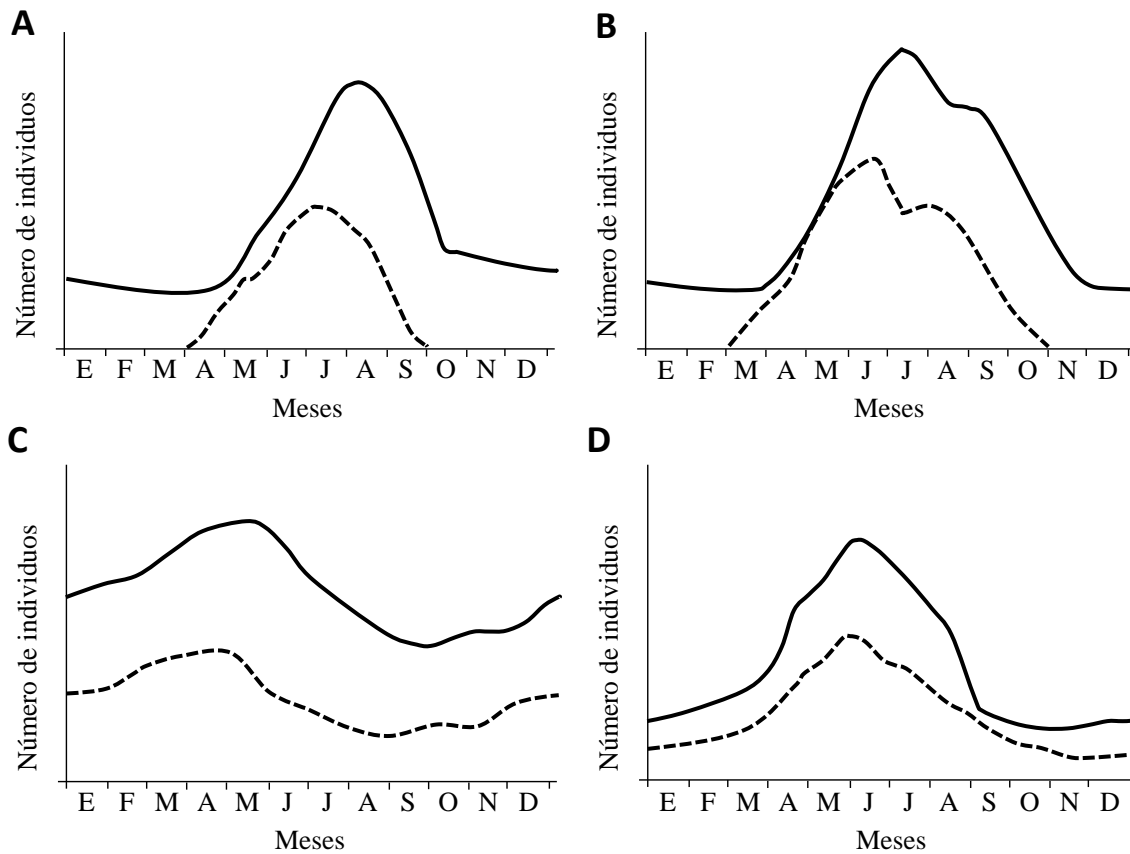


Fig. 12. Patrón anual de crecimiento de las colonias de abejas. Línea continua: abejas; línea discontinua: cría de obrera. **A.** Modelo del Norte de Europa. **B.** Modelo Centroeuropeo. **C.** Modelo de zonas tropicales. **D.** Modelo mediterráneo. Fuente: Adaptado de Calis *et al.* (1999) y Murilhas (2002).

Varios estudios confirman que las colonias de abejas que no reciben tratamiento acaricida pueden llegar al colapso después de tres o cuatro años de la infestación inicial en el caso de **clima templado** (Korpela *et al.*, 1992; Buchler, 1994; OIE, 2008). Por el contrario, en zonas con **clima tropical** esta parasitación no resulta letal (OIE, 2008). En clima templado la población de abejas disminuye durante otoño e invierno (Fig. 13; OIE, 2008), aumentando así la parasitación relativa. Como consecuencia, estas abejas adultas que sobreviven al invierno están debilitadas y la mayoría no son capaces de

sobrevivir hasta la primavera (Amdam *et al.*, 2004). Por lo que la amenaza real parece ser la disminución del hospedador que provoca un aumento del ratio de parasitación, más que la presencia de cría constante.

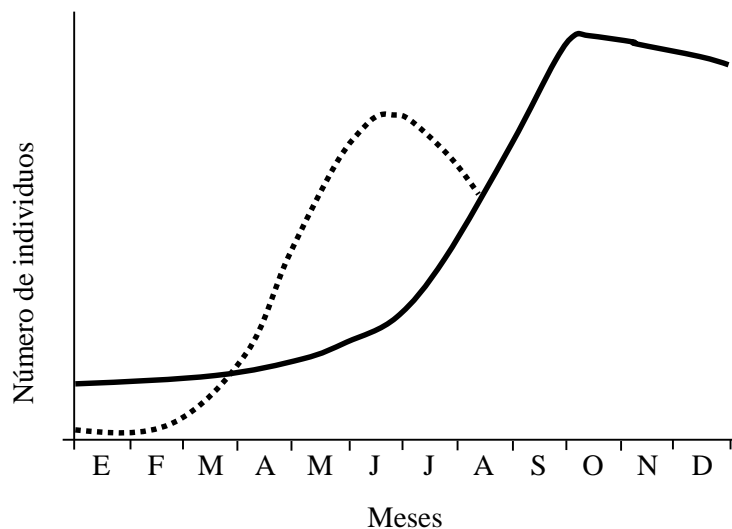


Fig. 13. Curva de crecimiento del ácaro a lo largo de un año en un clima templado del Hemisferio Norte (línea continua) y en un clima mediterráneo (línea discontinua). Fuente: Adaptado de OIE (2008) y Murilhas (2002).

Analizando el caso concreto del **clima templado mediterráneo** en el que se enmarca la presente tesis, varios estudios confirman que las colonias de abejas que no reciben tratamiento acaricida pueden llegar al colapso después de un año de la infestación inicial (Calatayud y Verdú, 1992; Rinderer *et al.*, 1993; Branco *et al.*, 1999; Murilhas, 2002) (Fig. 13). Se ha observado que la curva poblacional del ácaro en colmenas tratadas sigue dos modelos diferentes. Por una parte, en un estudio realizado en condiciones de clima mediterráneo subtropical (llevado a cabo en la Costa del Sol, Andalucía) la curva resultó exponencial y llegó al colapso antes del verano. Por otra parte, en el resto de zonas estudiadas la curva resultó bimodal. Por ejemplo, en la llanura litoral valenciana se observó un pico en noviembre y otro más elevado en abril. En el surco Intrabético se observó un pico menor en diciembre y uno más elevado en marzo, mientras que en la cordillera Bética se mantuvo el pico de diciembre, pero el pico máximo se desplazó a junio (Fig. 14).

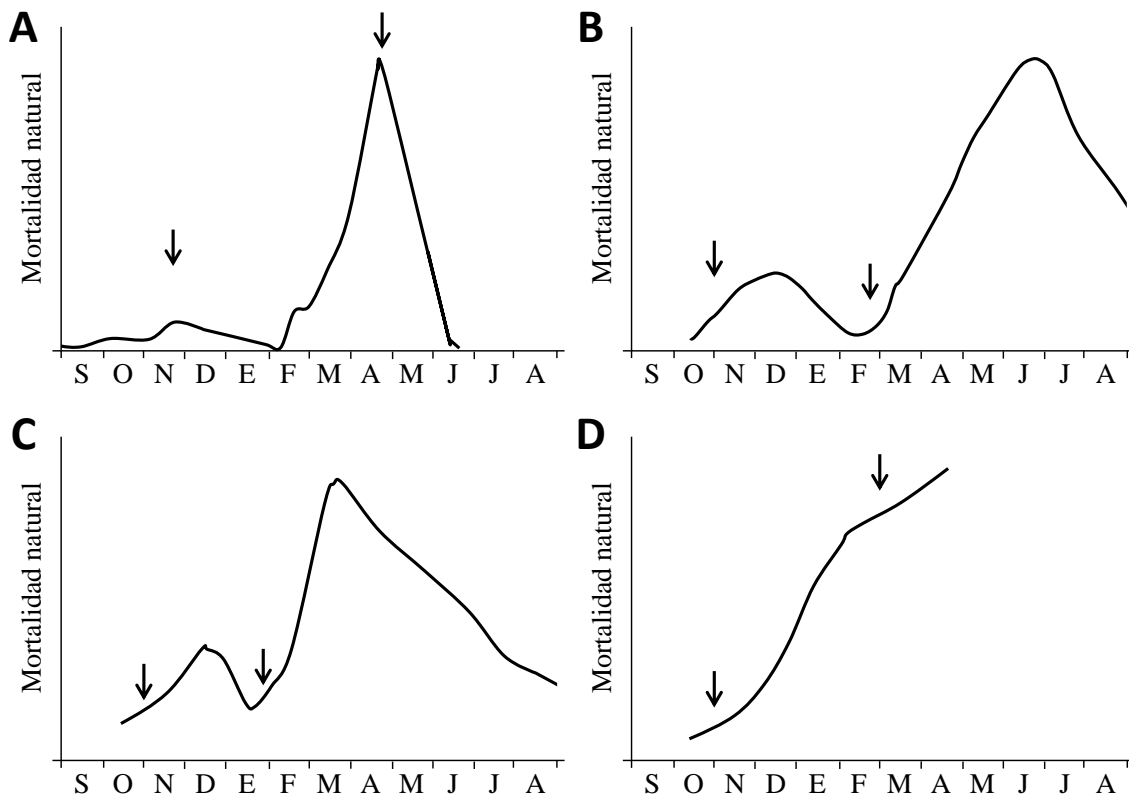


Fig. 14. Curva poblacional del ácaro en cuatro regiones de la Península Ibérica. **A.** Clima mediterráneo (Valencia). **B.** Clima mediterráneo continental (Cordillera Bética). **C.** Clima mediterráneo continental oceánico (surco Intrabético). **D.** Clima mediterráneo subtropical (Costa del Sol, Andalucía). Las flechas indican el momento de la aplicación acaricida. Fuente: Adaptado de García Fernández (1997) y Calatayud y Verdú (1992).

1.3.5.- Patología

A continuación se explican la sintomatología clínica y los daños provocados por la varroosis, así como los efectos sinérgicos que se dan en combinación con otros patógenos o factores ambientales.

Esta enfermedad afecta tanto a nivel individual como a nivel de la colonia. A **nivel individual** afecta a los estadios larvario y pupal. El ácaro succiona cantidades importantes de **hemolinfa**, tanto de las abejas adultas como de las fases inmaduras (Donze y Guerin, 1994; de D'Aubeterre *et al.*, 1999; Garedew *et al.*, 2004). La pérdida

de hemolinfa durante el desarrollo ontogenético provoca una pérdida de peso significativa y una reducción de la esperanza de vida (Dejong *et al.*, 1982; Amdam *et al.*, 2004). Un solo ácaro implica una pérdida media de peso corporal del 7% para la abeja obrera en el momento de la eclosión (Dejong *et al.*, 1982), y una pérdida de entre el 11 y 19% en el caso de los zánganos (Duay *et al.*, 2003), lo que deriva en una disminución del rendimiento de vuelo (Duay *et al.*, 2002). Además, las obreras recolectoras parasitadas muestran ausencias prolongadas y una menor tasa de retorno a la colonia, probablemente debido a una disminución de la capacidad de aprendizaje no asociativo y orientación (Kralj y Fuchs, 2006; Kralj *et al.*, 2007).

Además, *V. destructor* es **vector** de varios virus que afectan a las abejas, como el virus de las alas deformadas (DWV), el de la parálisis aguda de las abejas (ABPV, *Acute bee paralysis virus*), el virus israelí de la parálisis aguda (IAPV, *Israeli acute paralysis virus*) y el virus Kashmir (KBV, *Kashmir bee virus*). Como puede observarse en la Fig.15, el DWV provoca una deformación de alas y un abdomen más corto de lo habitual (Boecking y Genersch, 2008; de Miranda *et al.*, 2010). Antes de la entrada de *Varroa*, los virus eran considerados como un problema menor en la salud de las abejas (Allen *et al.*, 1986; Bowen-Walker *et al.*, 1999), pero la transmisión directa de virus provoca en la actualidad serios problemas en las colmenas.



Fig. 15. Dos individuos que presentan alas deformadas y abdomen reducido, síntomas claros de una infección por el virus de las alas deformadas (DWV). Fuente: Leza, 2010.

Aunque los **efectos sinérgicos** son extremadamente difíciles de analizar (Rosenkranz *et al.*, 2010) y hay pocos estudios experimentales sobre el tema, se ha

detectado sinergismo entre *V. destructor* y otros patógenos como *Nosema ceranae* (Cox-Foster *et al.*, 2007; Anderson y East, 2008; Higes *et al.*, 2008; Ribiere *et al.*, 2008), *Paenibacillus larvae* (Brodsgaard *et al.*, 2000) y *Acarapis woodi* (Downey y Winston, 2001). Además, otros factores que podrían provocar efectos sinérgicos en la patología de las abejas serían los pesticidas, los cultivos modificados genéticamente (Desneux *et al.*, 2007; Faucon y Chauzat, 2008; Frazier *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009), el cambio global (Le Conte y Navajas, 2008) y factores de manejo apícola.

Por otra parte, el umbral de daño a partir del cual *Varroa* causa patologías a las **colonias** es muy variable y depende de varios factores como las características de las colonias de abeja y de cría, de la estación del año y de la presencia de virus, de modo que no se correlaciona con un número fijo de ácaros por colonia. Algunos autores han obtenido valores de daño irreversible a nivel de colonia: entre 3000 y 4000 ácaros por colonia en el sur de EEUU (Delaplane y Hood, 1999); una tasa de infestación mayor al 7% en adultos en invierno en Alemania (Liebig, 2015 (comunicación personal)); una tasa de infestación mayor al 30% en adultos en verano en colonias no tratadas (Fries *et al.*, 2003); y una tasa de infestación mayor al 10% o una mortalidad superior a 10 ácaros/día en febrero-marzo en colonias no tratadas en condiciones mediterráneas (Calatayud y Verdú, 1992).

Es importante destacar que los **síntomas clínicos** de esta enfermedad no son aparentes cuando las tasas de infestación son bajas o moderadas, y únicamente son visibles cuando las tasas son elevadas y en muchos casos el daño para la colonia es irreversible. Los síntomas son la atrofia de las alas y el acortamiento del abdomen (Ball, 1985), una brusca reducción de la población de la colmena y una puesta de cría dispersa (Shimanuki *et al.*, 1994).

1.3.6.- Control

En la **problemática** actual del control de *Varroa* están implicados dos factores clave. Por una parte, el hecho de que el ácaro afecte a todas las fases del desarrollo dificulta el control, ya que durante la fase reproductiva del ácaro en el interior de las

celdas operculadas, éste resulta inaccesible a cualquier tratamiento químico. Por otra parte, el uso indiscriminado durante años de pesticidas antivarroa ha propiciado la aparición de residuos de dichos acaricidas en los productos de las colmenas (Wallner, 1999; Martel *et al.*, 2007; Lodesani *et al.*, 2008), y la generación de poblaciones de ácaros resistentes a estos tratamientos (Lodesani *et al.*, 1995; Milani, 1995; Elzen *et al.*, 1999a; Elzen *et al.*, 1999b; Maggi *et al.*, 2011; Skerl *et al.*, 2011; Strachecka *et al.*, 2013).

Tras la primera detección de *Varroa* en España en 1985, el impacto del parásito en la apicultura fue severo: en torno al 40% de las colonias de la Península Ibérica sufrieron un colapso (Llorente, 2003). En España, el Real Decreto 608/2006, de 19 de mayo, establece y regula el Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel. En el artículo 6 del capítulo II de dicho documento se especifican las actuaciones a realizar en el caso de la varroosis y se establece un tratamiento (con un medicamento veterinario) obligatorio al año, asumiendo que con los conocimientos y medios actuales no se puede erradicar.

Actualmente se usan en apicultura numerosos tratamientos químicos, biológicos y biotecnológicos para el control de *V. destructor*.

1) Los grupos de acaricidas más usados en la actualidad en el **control químico** son los de síntesis y los de origen orgánico.

a) Los **acaricidas de síntesis** se usan para el control del ácaro desde hace más de treinta años. El **cumafós** (Checkmite®, Asuntol®, Perizin®) es un organofosforado muy usado; es un acaricida sistémico inhibidor de la acetilcolinesterasa. Destacan también el **tau-fluvalinato** (Apistan®, Klartan®, Mavrik®) y la **flumetrina** (Bayvarol®), que son piretroides que actúan a nivel de los canales de sodio de la membrana celular. El **amitraz** (Apivar®) es una formamidina ampliamente utilizada por los apicultores que actúa en los receptores de octopamina.

Estos tratamientos presentan una serie de ventajas:

- Son fáciles de aplicar.

- Son económicos.
- No requieren un conocimiento amplio de la biología del parásito.

Sin embargo también muestran serias desventajas relacionadas con su naturaleza lipofílica, que le confiere persistencia y permite la acumulación de residuos en la cera de la colmena. Las principales desventajas son las siguientes:

- Pueden dañar directamente a las abejas (Chauzat *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009).
- Pueden dejar residuos en la miel y otros productos apícolas (Wallner, 1999; Martel *et al.*, 2007; Lodesani *et al.*, 2008)
- Provocan la aparición de resistencias en los ácaros (Lodesani *et al.*, 1995; Milani, 1995; Elzen *et al.*, 1999a; Elzen *et al.*, 1999b; Maggi *et al.*, 2011; Skerl *et al.*, 2011; Strachecka *et al.*, 2013).

b) Los **acaricidas de origen orgánico** son compuestos naturales que engloban ácidos orgánicos y aceites esenciales, entre los que destacan los **ácidos fórmico, oxálico, láctico** y el **timol** (Apiguard®, Thymovar®). La mayoría son solubles en agua o volátiles, y son componentes que se encuentran de forma natural en la miel.

Las ventajas de estos tratamientos son las siguientes:

- Tienen una eficacia suficiente para el control del parásito (Emsen y Dodologlu, 2015).
- El riesgo de residuos y acumulación en productos apícolas es bajo (Rosenkranz *et al.*, 2010).
- La probabilidad de desarrollar resistencias a estos acaricidas es baja (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Pero también tienen desventajas, relacionadas con las condiciones bajo las que se deben aplicar, que hacen que a menudo el efecto de estos acaricidas sea variable.

- Por ejemplo, el ácido láctico y oxálico se deben aplicar cuando no haya cría (Higes *et al.*, 1999; Emsen y Dodologlu, 2009), por lo que no pueden usarse en las regiones en las que no hay parada invernal.

- La eficacia de algunos compuestos depende de su evaporación, por lo que las condiciones climáticas, las condiciones del interior de la colmena y el modo de aplicación deben estar cuidadosamente seleccionados para conseguir un efecto óptimo.

2) Los métodos de **control biológico/biotecnológico** se basan en el uso de sustancias naturales o de síntesis relacionadas con la biología del ácaro o con métodos que interfieren en la biología del mismo. Algunos ejemplos son:

a) La captura de ácaros en las celdas operculadas de zánganos (Engels *et al.*, 1984; Maul *et al.*, 1988).

b) La selección de abejas tolerantes a *Varroa* (Padilla-Alvarez y Flores-Serrano, 2011; Zakar *et al.*, 2014).

c) Otros métodos cuya aplicación todavía no se ha perfeccionado (o bien son laboriosos o todavía no se ha confirmado su eficacia) son: el uso de una base de la colmena modificada, la termoterapia (Hoppe y Ritter, 1987), la reducción del tamaño de la celda de abeja, la utilización de frecuencias acústicas y de feromonas, y el uso de hongos entomopatógenos (Shaw *et al.*, 2002).

Objetivos

Con la finalidad de conocer el estado sanitario de las colonias de *Apis mellifera* de las Islas Baleares se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Estudio de la dinámica poblacional del ácaro *Varroa destructor* en Baleares.
- 2.- Influencia de la densidad de abejas, de la disponibilidad de recursos naturales para las abejas, del manejo de las colmenas y del clima en la abundancia de *V. destructor*.
- 3.- Estudio epidemiológico para determinar la prevalencia y niveles de infestación de *V. destructor* en las colmenas de Baleares.
- 4.- Caracterización de los apiarios y de la situación del control de la varroosis en la apicultura balear mediante la realización de encuestas a los apicultores.
- 5.- Evaluación de la eficacia de los acaricidas Apivar (amitraz), Apiguard (timol) y BeeVital (aceites esenciales) en el control de *V. destructor*.
- 6.- Valoración del efecto de la aplicación aérea en campo de *Btk* sobre las colonias de abejas.

Capítulo 2: Material y métodos

Capítulo 2: Material y Métodos

2.1.- Caracterización orográfica y climática de las Islas Baleares

Los estudios se llevaron a cabo en las cuatro islas mayores del Archipiélago Balear, que está formado por un total de 194 islas e islotes. El archipiélago se divide en dos grupos de islas con una historia geográfica distinta. Por una parte las Gimnesias, formadas por Mallorca y Menorca, y por otra las Pitiusas, con Eivissa (Ibiza) y Formentera. Las Gimnesias son las que presentan mayor lejanía con respecto a las costas continentales más inmediatas, ocupando una situación casi central dentro de la cuenca mediterránea.

Desde un punto de vista geomorfológico, en Mallorca se identifican tres grandes unidades: la Sierra de Tramuntana (nordeste), las Sierras de Llevant (sudeste) y la depresión central, en la que se distinguen las siguientes áreas: Raiguer (adosado a la Sierra de Tramuntana), Pla (comprende las llanuras entre las bahías de Palma y Alcúdia) y Migjorn (abarca desde el extremo oriental de la bahía de Palma hasta la costa oriental de la isla) (Grimalt *et al.*, 1991). En Menorca se identifican dos mitades: la septentrional o región de Tramuntana (cadena montañosa de formas suaves y muy erosionadas) y la meridional o Migjorn (zona llana, con elevaciones inferiores a 150 m) (Rosselló *et al.*, 2003). En Eivissa destacan dos conjuntos montañosos: Es Amunts (al norte) y Serra Grossa (al sur), de formas suaves y redondeadas y el resto del territorio es llano. Formentera está formada por dos bloques unidos por un istmo; es casi en su totalidad llana, salvo por la meseta de Sa Mola (al sureste) (Vilà y Vallès, 2001).

Las principales características físicas del medio de las islas en las que se llevaron a cabo los estudios pueden observarse en la Tabla 3.

El régimen anual de lluvias en Baleares presenta una marcada irregularidad, mostrando un único máximo de otoño, que viene seguido de un invierno relativamente lluvioso (precipitaciones irregulares), una progresiva disminución en primavera y un verano marcado por la aridez. En Mallorca destaca la variación espacial de las

precipitaciones medias, con máximos de 1400-1600 mm anuales en Sierra de Tramuntana, mientras que en el litoral meridional no se superan los 300-350 mm, lo que se debe básicamente a factores de tipo orográfico. En Menorca también se produce esta variación, presentado 450 mm en la región sudeste y 650 mm en regiones del interior y del extremo noreste. Las precipitaciones en las Pitiusas son escasas (Grimalt *et al.*, 1991; Vilà y Vallès, 2001; Rosselló *et al.*, 2003).

Tabla 3. Tamaño, precipitación media anual (P) y temperatura media anual (T) de las Islas Baleares.

	Tamaño (km ²)	P (l/m ²)	T (°C)
Mallorca	3667	650	16-17
Menorca	716	600	16-17
Eivissa	541	450	17
Formentera	82	350	19

En cuanto a las temperaturas, Baleares presenta un mínimo centrado en enero, que se prolonga hasta febrero. El mes más cálido es agosto, seguido por julio. En Mallorca, la temperatura máxima media más elevada está en torno a 30°C y la mínima media se sitúa en 5-6°C. La distribución territorial de las temperaturas medias en Mallorca presenta una marcada relación con el relieve (la mayoría en torno a 16-17°C), localizando cuatro áreas más frías: la Sierra de Tramuntana, las Sierras de Llevant, los puntos más elevados del Pla y la depresión de Campos. La isla que registra las temperaturas medias más elevadas es Formentera (Grimalt *et al.*, 1991; Vilà y Vallès, 2001; Rosselló *et al.*, 2003).

Siguiendo la clasificación del clima mediterráneo en base al índice de Emberger, el llano de Mallorca es templado, la zona norte de la isla es subhúmeda y la zona sur es semiárida. La zona de montaña es la que presenta la variación mayor, siendo cálida semiárida en el suroeste y fresca subhúmeda en la parte central. En Menorca predomina

el clima subhúmedo, siendo la zona costera templada. Ibiza presenta zonas templadas y semiáridas en la zona sur y Formentera clima semiárido (Llorens *et al.*, 2007).

Bioclimáticamente en Mallorca se distingue clima termomediterráneo subhúmedo en el norte y termomediterráneo seco y mesomediterráneo seco en el resto. En la Sierra de Tramuntana aparece mesomediterráneo subhúmedo/húmedo con algunos enclaves supramediterráneo húmedos. En Menorca se distinguen: mesomediterráneo y supramediterráneo, y en Eivissa: termomediterráneo, con un ombroclima seco inferior (Rivas-Martínez, 1995).

En cuanto a la caracterización de la vegetación, la isla que presenta un mayor porcentaje de su territorio cubierto por masa forestal es Menorca, con un 56,62%, frente a un 42% de Mallorca y un 47,84% de Eivissa y Formentera. En las cuatro islas predominan los pinares (44,06% de masa forestal en Mallorca, 24,96% en Menorca y 85,12% en Ibiza y Formentera). En Mallorca y Menorca destacan los encinares (22,46% en Mallorca y 13,04 en Menorca) y acebuchales (26,84% en Mallorca y 39,77% en Menorca) y los sabinares son residuales (0,25% en Mallorca y 1,19% en Menorca). En cambio, en Ibiza y Formentera los sabinares (13,90) están más representados, y destaca la ausencia de encinares y una baja presencia de acebuchales (0,16%) (Datos del Tercer Inventario Forestal Nacional (1997-2006)).

2.2.- Dinámica poblacional de *V. destructor* y los factores que la modulan¹

2.2.1.- Localización y zona de estudio

Para el presente estudio se seleccionaron diez apiarios, dos por cada una de las zonas geomorfológicas diferenciadas (Sierra de Tramuntana, Llevant, Raiguer, Pla y Migjorn), cuya localización exacta se presenta en la Figura 16. Todos los apiarios seleccionados estaban ubicados en fincas privadas.

¹ La versión en inglés en formato artículo se puede consultar en el anexo. En vías de publicación.

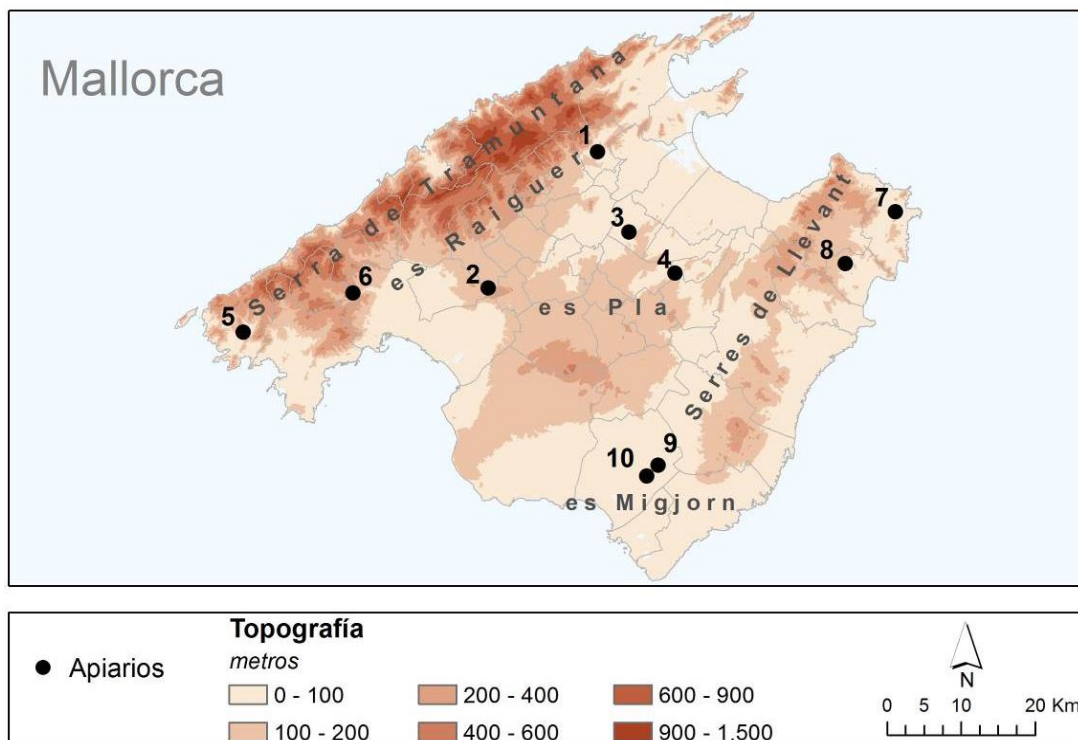


Fig. 16. Localización de los apiarios estudiados. Del área del Raiguer: (1) Campanet (UTM: 497254, 4404559) y (2) Santa María (UTM: 482445, 4386007); del Pla: (3) Llubí (UTM: 501457, 4393633) y (4) Ariany (UTM: 507689, 4388030); de la zona de Tramuntana: (5) Andratx (UTM: 449384, 4379963) y (6) Puigpunyent (UTM: 464222, 4385320); de Llevant: (7) Capdepera (UTM: 537436, 4396395) y (8) Son Servera (UTM: 530676, 4389326) y de la zona de Migjorn: (9) Campos (UTM: 505434, 4361827) y (10) Campos II (UTM: 503850, 4360334).

Con el fin de relacionar la proporción de recursos vegetales presentes en las zonas de estudio con la abundancia de *Varroa*, se calculó la proporción de área cubierta por vegetación, tanto natural como antrópica (por ejemplo: encinares, frutales, pinares, garrigas, cultivos, jardines) y la proporción cubierta por zonas sin vegetación (por ejemplo: edificios, carreteras, fuentes), en un área de 3 km de radio alrededor de cada apiario. Para ello se usó la base de datos de Usos del suelo (*Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori, Govern de les Illes Balears*), a una resolución de 5 m, usando el programa ArcGIS versión 10.1 (*Environmental Systems Research Institute, Redlands, California, EEUU*) (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de área que engloba una superficie de 3 Km de radio alrededor de cada apiario cubierta por recursos vegetales (Área vegetal (%)) y porcentaje de esa área cubierta por zonas sin vegetación (Área no-vegetal (%)).

Zona	Localización apiario	Número ID apiario	Área no-vegetal (%)	Área vegetal (%)
Raiguer	Campanet	1	7,0	93,0
	Santa Maria	2	15,4	84,6
Pla	Llubí	3	15,5	84,5
	Ariany	4	16,8	83,2
Tramuntana	Andratx	5	18,0	82,0
	Puigpunyent	6	9,1	90,9
Llevant	Capdepera	7	36,3	63,7
	Son Servera	8	18,2	81,8
Migjorn	Campos I	9	15,4	84,6
	Campos II	10	9,9	90,1

La zona del apiario 1 (Campanet) fue la que más proporción de recursos vegetales presentaba en su entorno, seguida por la del apiario 6 (Puigpunyent) y 10 (Campos II). Por otro lado, el apiario con menor proporción de recursos naturales fue el 7 (Capdepera) (Tabla 4).

Asimismo se calcularon los porcentajes de las masas vegetales más abundantes presentes en el área de 3 km de radio alrededor de cada apiario (Tabla 5).

Como puede observarse en la Tabla 5 cada apiario estaba localizado en un entorno diferente (el jardín de una casa particular (Fig. 17A), un pinar, un campo de equinánecas (Fig. 17B), un almendral (Fig. 17C), monte o una antigua cantera (Fig. 17D)) y presentaba una composición vegetal característica.

Los pinares (*Pinus halepensis*) estaban ampliamente representados en las zonas de estudio. Se caracterizan por presentar un sotobosque denso y rico en flora apícola, entendida como aquella que forma parte de la alimentación de las abejas (recolección de néctar, polen o fuente de mielato), como el brezo (*Erica multiflora*), romero

(*Rosmarinus officinalis*) y estepas (*Cistus* spp.). Entre los campos de frutales destacan los naranjales (*Citrus* spp.), cuyas flores suponen una fuente abundante de néctar. El bosque mixto presenta una combinación de pinos (*Pinus halepensis*), encinas (*Quercus ilex*) y acebuches (*Olea europea* var. *sylvestris*) y también está ampliamente representado en las zonas de estudio, así como los olivares (*Olea europea*), almendrales (*Prunus dulcis*), garriga y cultivos de secano, ricos todos ellos asimismo en flora apícola (Boi *et al.*, 2008).

Tabla 5. Porcentaje de área que engloba una superficie de 3 Km de radio alrededor de cada apiario cubierta por cada masa vegetal diferenciada.

Loc. apiario	Núm. ID apiario	Ubicación	Comp. área veg. (%)
Campanet	1	Casa particular (Fig. 17A)	Frutales (23%) Bosque mixto (18%) Olivar (15%)
Santa Maria	2	Pinar	Pinar (17%) Almendral (14%) Garriga (13%)
Llubí	3	Campo equináceas (Fig. 17B)	Cultivo de secano (22%) Frutales (20%) Garriga (9%)
Ariany	4	Casa particular	Cultivos de secano (45%) Frutales (10%) Garriga (7%)
Andratx	5	Almendral (Fig. 17C)	Pinar (37%) Garriga (14%) Almendral (13%)
Puigpunyent	6	Almendral	Bosque mixto (41%) Garriga (15%) Pinar (13%)
Capdepera	7	Pasto	Garriga (21%) Pinar (13%) Cultivo de secano (9%)
Son Servera	8	Monte	Frutales (24%) Garriga (16%) Cultivos de secano (13%)
Campos I	9	Casa particular	Cultivos de secano (30%) Bosque mixto (20%) Acebuchal (8%)
Campos II	10	Antigua cantera (Fig. 17D)	Bosque mixto (26%) Cultivos de secano (23%) Cultivos de regadío (19%)

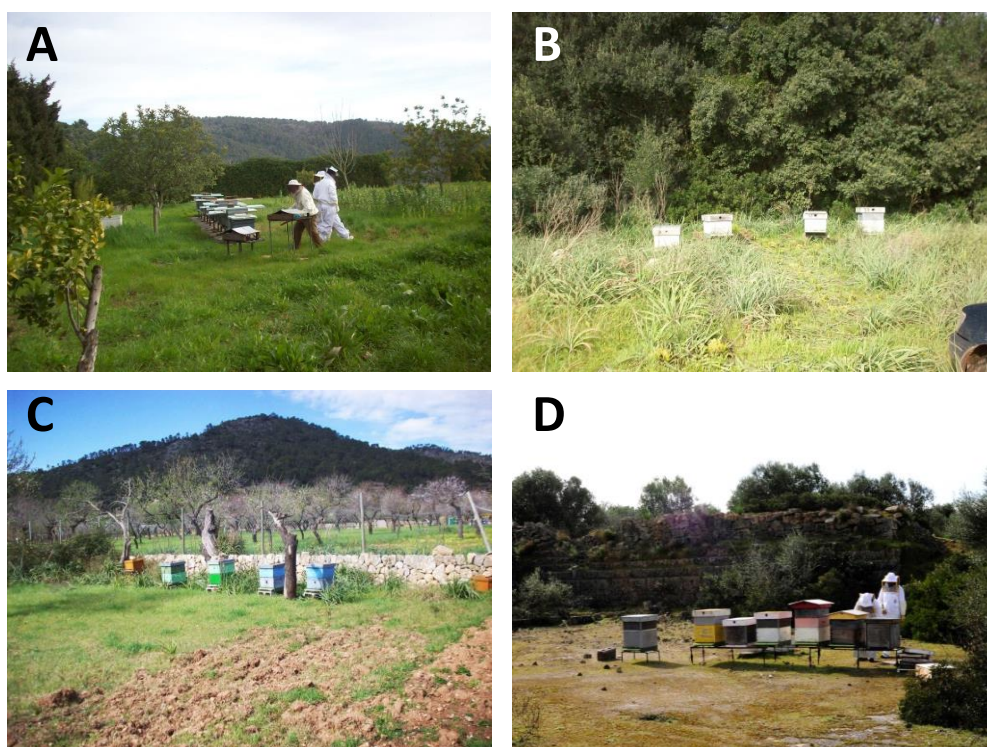


Fig. 17. Fotografías de los apiarios 1 (A), 3 (B), 5 (C) y 10 (D).

2.2.2.- Muestreo en campo y procesamiento de las muestras

Se realizó un diseño longitudinal para poder analizar los cambios de la población del parásito a través del tiempo. El estudio se realizó desde diciembre de 2009 a diciembre de 2010 en los diez apiarios anteriormente citados (apiarios del 1 al 10), y de diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en cinco apiarios (apiarios 2, 3, 6, 9 y 10). Se analizaron un total de 950 muestras.

Los experimentos se llevaron a cabo con colonias de *Apis mellifera iberiensis*, criadas en colmenas tipo Perfección estándar, infestadas de forma natural con *Varroa destructor*.

Para estimar el tamaño de la población del parásito se llevó a cabo el método de muestreo de ácaros caídos de forma natural en el fondo de la colmena. Se optó por esta metodología ya que resulta adecuada para estimar la infestación de la colonia (Branco *et al.*, 2006; Dietemann *et al.*, 2013), es un método no destructivo/no invasivo, es rápido y

no es necesario abrir la colmena. Así permite un muestreo periódico de la misma colmena, sin interferir en su funcionamiento ni condiciones. Presenta algunas desventajas como una menor fiabilidad en casos concretos en los que no hay cría en la colmena, lo que no ocurre en nuestras condiciones, o en los que se da un colapso de la colmena debida a varroosis (Branco *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo el estudio, se muestrearon cinco colmenas en cada apiario. Cada colmena estaba equipada con una base modificada que incluye una malla perforada de 3 mm de paso (Fig. 18). Esto permite que caigan al fondo de la base los individuos del ácaro, pero no las abejas. La base incluye una bandeja extraíble en donde se colocaba un papel impregnado con vaselina, que mantiene los ácaros adheridos al papel. Dicho papel se retiraba al cabo de cuatro días, periodo suficiente para mantener la eficacia del método en nuestras condiciones (Flores *et al.*, 2002). Este muestreo se realizaba periódicamente, una vez al mes.

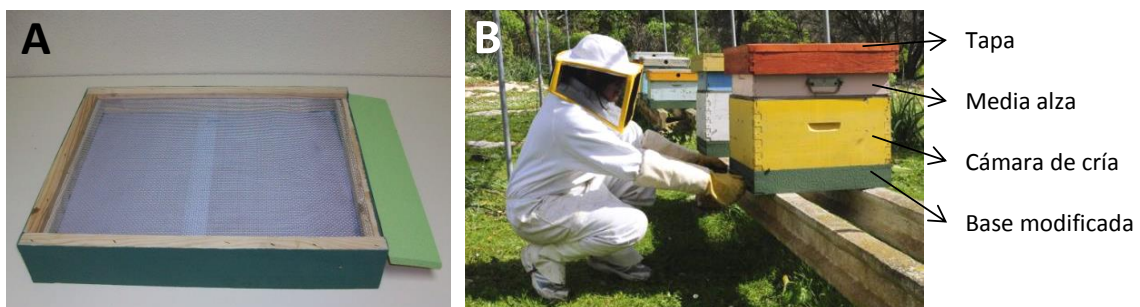


Fig. 18. A. Base de la colmena modificada con una malla de 3 mm y una bandeja extraíble. B. Base colocada en una colmena en campo.

En cada papel obtenido se analizaban por una parte los ácaros caídos por muerte natural, y por otra el número de líneas de “suciedad” observadas en el papel, compuestas por las deyecciones de las abejas, restos de cera y polen (Fig. 19) y que refleja el número de cuadros ocupados por abejas, que es una estimación del tamaño de la población de abejas (Nasr *et al.*, 1990; Guzman-Novoa *et al.*, 2010).

En cuanto a los datos ambientales, los datos climáticos se obtuvieron de estaciones meteorológicas localizadas a una distancia de entre 0 y 15 km de los apiarios (Agencia Estatal de Meteorología – AEMET). En la Tabla del Anexo II (Tabla 31) se muestran la distancia y las coordenadas exactas de dichas estaciones.

Por otra parte, se registró, periódicamente, el momento en que los apicultores realizaban el tratamiento antivarroa y el producto usado.



Fig. 19. Fondo de la colmena en la que se pueden observar las deyecciones y los restos producidos por la colonia, agrupados en líneas de “suciedad”.

2.2.3.- Análisis de datos y análisis estadístico

Las medias y desviaciones estándar fueron calculadas para cada variable. Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA. Se usó el programa estadístico SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Un nivel de $p < 0,05$ fue aceptado como significativo.

Por otra parte, para la elaboración del análisis y el desarrollo del modelo estadístico descrito en este apartado, se realizó una estancia de tres meses en el centro de investigación *Centre for Ecology & Hydrology* (Wallingford, Reino Unido), *Natural Environment Research Council*, bajo la supervisión de la Dra. Bethan Purse.

Se analizó la relación entre la abundancia de *Varroa* (variable respuesta) y los predictores ambientales (variables explicativas) en diferentes escalas de tiempo

utilizando **Modelos Lineales Generalizados Mixtos** (*Generalized Linear Mixed Models*, GLMM), ajustándolo a una estructura de error binomial negativo usando el paquete *glmmADMB* (Fournier *et al.*, 2012; Skaug *et al.*, 2013) del programa de software R (*R Development Core Team*, 2013). Esta estructura de error se prefirió sobre una estructura de error de Poisson porque se detectó sobredispersión significativa en los residuos del GLMM de Poisson.

La **abundancia anual y semestral** (enero a junio y de julio a diciembre) de *Varroa* se analizó por separado como variables respuesta (o dependientes) en relación a ocho variables climáticas, paisajísticas y biológicas (variables explicativas o predictores), tal y como se indica en la Tabla 6. Tanto los valores promedio de las variables climáticas y de la abundancia de abejas y de *Varroa*, como la presencia/ausencia de tratamientos fueron anotados dentro de los mismos periodos que para la variable dependiente, por lo que no se consideraron efectos rezagados de los predictores. Para tener en cuenta la potencial falta de independencia de las observaciones entre colmenas, apiarios y zonas climáticas, estos factores fueron considerados como factores de efectos aleatorios. Estos factores de efectos aleatorios fueron combinados obteniendo diferentes modelos globales conteniendo las ocho variables ambientales. La selección del modelo se realizó en base al Criterio de Información Akaike (AIC) (Akaike, 1973), seleccionando al que obtuvo el menor valor de AIC. Después de haber seleccionado los efectos aleatorios más apropiados, todas las posibles combinaciones de los ocho predictores fueron ajustados y el modelo con menor AIC fue seleccionado, a menos que el AIC de este modelo fuera de menos de 2 unidades de la AIC del modelo nulo sin predictores, en cuyo caso la hipótesis nula se preferiría al modelo. Inicialmente se consideraron una gama más amplia de variables de temperatura, precipitación y humedad, pero debido al alto grado de colinealidad entre ellos (los valores estadísticos de la prueba de correlación de Pearson superaron 0,7 o fueron inferiores a -0,7), una única variable de temperatura (temperatura mínima absoluta) y una sola variable de humedad (humedad relativa media) se mantuvo para análisis posteriores. Entre las otras variables, la disponibilidad de recursos naturales de floración fue altamente correlacionada con la cobertura de la tierra improductiva, así que los modelos que incluían ambas variables no fueron ajustados.

Tabla 6. Descripción de las variables consideradas en los modelos de la abundancia de *Varroa*.

Categoría de la variable	Variable (Abreviación)	Descripción y unidades
Biológica	Abundancia de <i>Varroa</i> (V)	Número de ácaros caídos durante un muestreo de 4 días, realizado una vez al mes. Los valores mensuales se promediaron para el análisis semestral y anual.
	Abundancia de abejas (A)	Número de cuadros ocupados por abejas (máximo 10) durante un muestreo de 4 días, realizado una vez al mes. Los valores mensuales se promediaron para el análisis semestral y anual.
Climática	Temperatura mínima absoluta (TMA)	Temperatura mínima registrada durante el mes de estudio (°C).
	Humedad media (HM)	Promedio de la humedad media diaria de cada mes de estudio (%).
Paisajística	Porcentaje de área que engloba una superficie de 3 Km de radio alrededor del apiario cubierta por recursos naturales (Rec_Nat)	Estos recursos incluyen encinares, bosques de ribera, bosque mixto, cítricos, garrigas, algarrobales, cultivos herbáceos de regadío y secano, huertos, jardines, olivares, pastos, pinares, acebuchales, viñedos y otros frutales.
	Porcentaje de área que engloba una superficie de 3 Km de radio alrededor del apiario cubierta por tierra improductiva (Rec_Imp)	Incluye edificios, agua, carreteras y dunas.
Manejo	Tratamiento (Trat)	Codificado como 1 si se aplicó un tratamiento químico (Apivar) durante el mes o periodo, 2 para el tratamiento orgánico (Apiguard) y 0 si no se aplicó ningún tratamiento ese mes o periodo.

La **abundancia mensual de *Varroa*** fue modelada igualmente en relación con los valores mensuales de las variables climáticas, biológicas y de tratamiento, además de la

variable de recursos naturales. Como se esperaba detectar rezagos (*lags*) en la respuesta de las poblaciones de *Varroa* a los factores ambientales, se consideraron los efectos rezagados teniendo en cuenta los valores de los dos meses anteriores (lag 1 y lag 2) del clima, de la abundancia de *Varroa*, la abundancia de abejas, la pérdida de población y el tratamiento, en lugar de los valores observados en el mismo mes (lag 0). Una vez más, todas las posibles combinaciones de los catorce predictores fueron considerados y la selección de los mejores modelos se realizó en base al criterio de AIC.

La precisión de los modelos finales de abundancia se evaluó a partir de correlaciones de Pearson entre los valores de abundancia observados y pronosticados. Para evaluar si la autocorrelación temporal fue plenamente tenida en cuenta en los modelos mensuales, se utilizaron parcelas de autocorrelación de residuos del modelo.

2.3.- Estudio epidemiológico de la varroosis en las colonias de abejas en las Islas Baleares

2.3.1.- Localización y zona de estudio

Durante el primer año de estudio (2010) se muestrearon 46 apiarios, de los cuales 36 estaban distribuidos por las diferentes zonas geomorfológicas de Mallorca (4 en la zona del Pla, 6 en Migjorn, 7 en Raiguer, 12 en la Sierra de Tramuntana, 2 en Llevant y 5 en la Bahía de Palma), 6 en Eivissa y 4 en Formentera (Fig. 20).

En el segundo año de estudio (2011) se muestrearon 31 apiarios, de los cuales 21 pertenecían a Mallorca (1 en el Pla, 1 en Migjorn, 8 en Raiguer, 9 en Serra y 2 en la Bahía de Palma) y 10 en Menorca (Fig. 21).

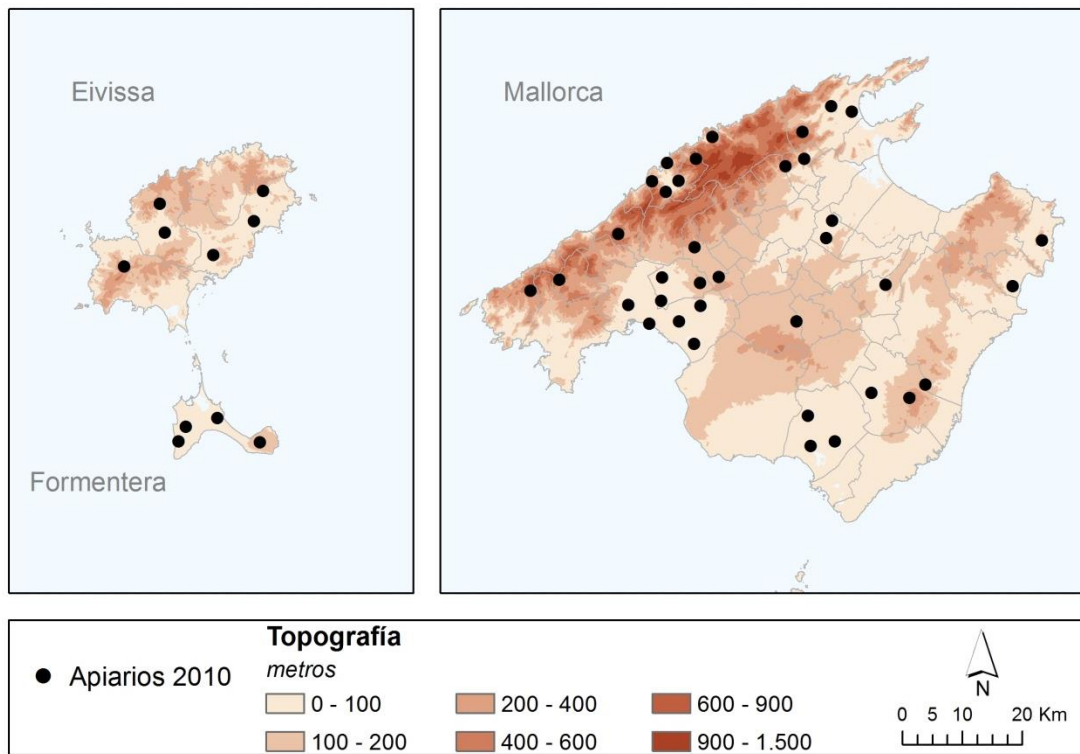


Fig. 20. Localización por municipios de los apiarios muestreados en 2010, en Eivissa y Mallorca.

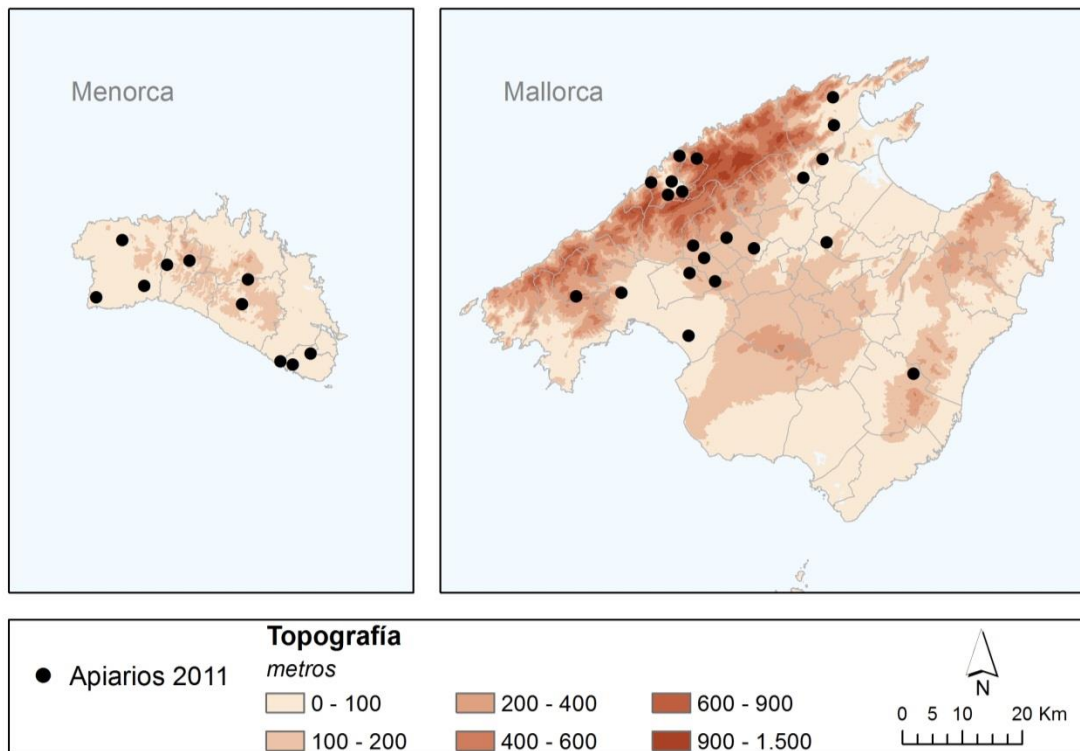


Fig. 21. Localización por municipios de los apiarios muestreados en 2011, en Menorca y Mallorca.

2.3.2.- Muestreo en campo y procesamiento de las muestras

Se realizó un diseño transversal que fue llevado a cabo en dos temporadas del año diferentes. Concretamente los muestreos se realizaron en otoño de 2010 y primavera de 2011, ya que son periodos que presentan una mayor prevalencia del parásito.

En cada apiario se seleccionaron al azar 6 colmenas, por lo que se muestrearon un total de 462 colmenas (276 en otoño de 2010 y 186 en primavera de 2011).

De cada colmena se recolectaron dos muestras: una muestra de abejas adultas (preferentemente obreras, $n > 200$) y una muestra de cría de obrera (de todos los estadios de desarrollo, $n > 400$). Así, se muestrearon y analizaron un total de 924 muestras (552 de otoño de 2010 y 372 de primavera de 2011). Todo el material se conservó congelado hasta el momento de su análisis.

Para el procesamiento de las muestras recogidas en 2010, se realizó una estancia en el Departamento de Patología Apícola del Centro Apícola Regional, enmarcado en el Centro Agrario de Marchamalo (Castilla-La Mancha, España), bajo la supervisión del Dr. Mariano Higes y la Dra. Raquel Martín-Hernández.

El procesamiento de las muestras de abejas adultas se basó en el recomendado por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2004), con alguna modificación. Cada muestra se examinaba individualmente. Por una parte se pesaba la muestra en una balanza de precisión y se realizaba un examen visual (para detectar síntomas de enfermedades) y, por otra parte se realizaba el recuento de ácaros sobre fondo blanco, que se desprendían fácilmente de las abejas (Fig. 22).

En el caso del procesamiento de las muestras de cría también se siguió el método descrito por la OIE (2004) modificándolo parcialmente. De cada muestra, se retiraban los opérculos de las celdas con un bisturí, se extraían las larvas con una pinza y se determinaba la presencia o ausencia de *Varroa* (Fig. 23).



Fig. 22. Examen de las muestras de abejas adultas. **A.** Pesado de muestras. **B.** Examen visual de las muestras. **C.** Recuento de ácaros.

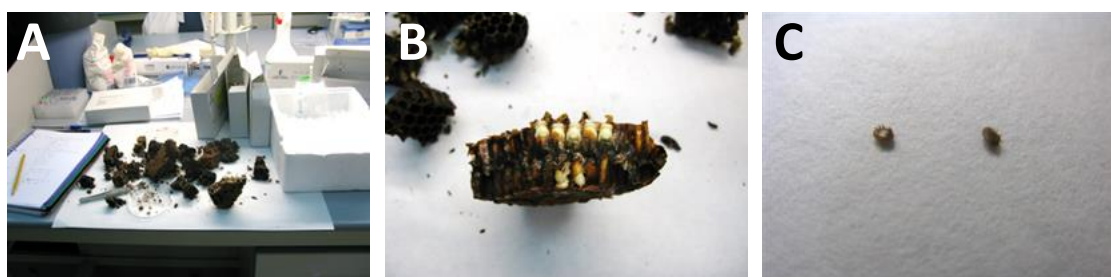


Fig. 23. Examen de las muestras de cría de abejas. **A.** Retirada de los opérculos de las celdas y extracción de las larvas. **B.** Porción de un cuadro de colmena con cría de abeja. **C.** Ácaros extraídos de las celdas de cría.

Paralelamente al muestreo, con la finalidad de **caracterizar la apicultura balear** se realizó una **ENCUESTA** a los apicultores participantes, a través de la cual se requería la siguiente información:

- Número y tipo de colmenas del apiario muestreado.
- Número total de colmenas del apicultor encuestado.
- Número, producto, dosis, tiempo de aplicación y fechas de la realización del tratamiento antivarroa.
- Realización de tratamientos para otras enfermedades.

2.3.3.- Análisis de datos y análisis estadístico

Se calcularon los siguientes índices parasitarios:

- **Porcentaje de prevalencia (%P)** = (número de colmenas parasitadas / número total de colmenas muestreadas) * 100.

- **Porcentaje de tasa de infestación (%I)** = (número de ácaros / abeja) * 100.

- **Porcentaje de focalidad (%F)** = (número de apiarios parasitadas / número total de apiarios muestreados) * 100

Las medias y desviaciones estándar fueron calculadas para cada variable. Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA. Se usó el programa estadístico SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Un nivel de $p < 0,05$ fue aceptado como significativo.

Además, la distribución estadística del número de colonias por apiario parasitadas por *Varroa* se comparó con una distribución Poisson, para determinar si la presencia del ácaro en un apiario ocurre independiente y uniformemente entre las colmenas o si, por el contrario, se ve influida por el estado de las otras colmenas del apiario como consecuencia de la proximidad entre ellas.

2.4.- Evaluación de la eficacia de acaricidas en el control de *V. destructor*²

2.4.1.- Localización y zona de estudio

Estos ensayos se llevaron a cabo en el apiario experimental del Laboratorio de Zoología, ubicado en el Campus de la Universidad de las Islas Baleares (UIB), cuya localización exacta es 39° 38' 30.20''N, 2° 38' 23.57'' E (Mallorca) (Fig. 24).

² La versión en inglés en formato artículo se puede consultar en el anexo. En vías de publicación.

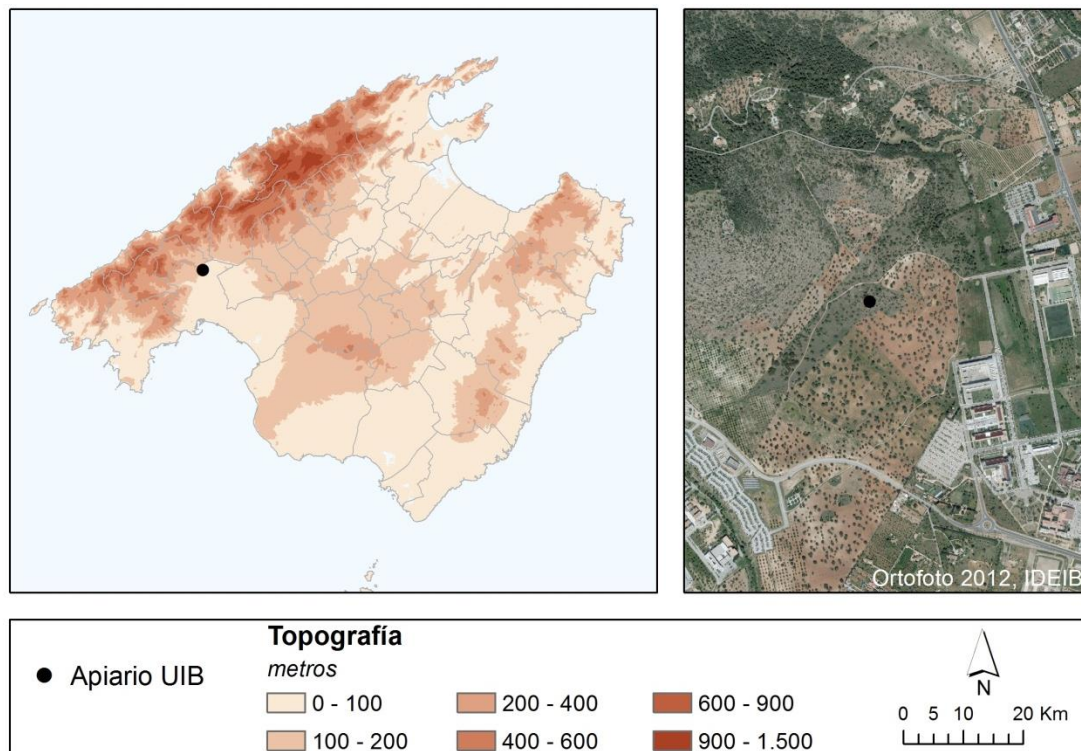


Fig. 24. Localización del apiario experimental de la Universidad de las Islas Baleares (UIB).

Está ubicado en una zona rural (Fig. 25), con una cobertura vegetal del 79,3% del área de radio 3 km alrededor del apiario. Aproximadamente un tercio del área (28,6%) está formada por algarrobos (*Ceratonia siliqua*), también predominan los olivos (10,5%), almendros (9,3%), pastos de herbáceas de secano (8,7%) en los que destacan plantas que constituyen una fuente abundante de néctar como el asfódelo (*Asphodelus microcarpus*), y formaciones como el bosque mixto (6,1%), la garriga (5,8%), acebuchal (3,9%) y pinar (1,5%). Asimismo hay una agrupación de pequeñas dimensiones de encinas y jardines alrededor. Además destaca la presencia de una zona húmeda (*Font de la Vila*).



Fig. 25. Apiario experimental ubicado en el Campus de la UIB.

2.4.2.- Muestreo en campo y procesamiento de las muestras

Se realizaron tres ensayos. El primero de ellos se desarrolló en primavera (entre el 8 de abril y el 31 de mayo de 2010), el segundo a finales de otoño (entre el 3 de noviembre y el 30 de diciembre de 2011) y el tercero a finales de primavera (entre el 9 de mayo y el 27 de junio de 2013).

El apiario estaba formado por colmenas tipo Perfección estándar, con colonias de *Apis mellifera iberiensis*, infestadas de forma natural por *V. destructor*. Para estimar el tamaño de la población del parásito se llevó a cabo el método de muestreo de ácaros caídos en el fondo de la colmena, tal y como se ha explicado en el apartado 2.1, pero con una modificación: en este caso los papeles impregnados con vaselina se reemplazaban una vez a la semana, durante todo el ensayo (Floris *et al.*, 2001; Loucif-ayad *et al.*, 2010). En los tres ensayos se inició el muestreo una semana antes de realizar el tratamiento, para tener un dato de la infestación inicial de cada colmena (Floris *et al.*, 2001; Floris *et al.*, 2004; Satta *et al.*, 2005; Loucif-ayad *et al.*, 2010).

Para los dos primeros ensayos se muestrearon 15 colmenas, y para el tercero se usaron 20. Las colmenas se distribuyeron en grupos, usándose en cada ensayo cinco colmenas por tratamiento, dejando un grupo de cinco como control, sin tratar (Floris *et al.*, 2001; Floris *et al.*, 2004; Satta *et al.*, 2005; Loucif-ayad *et al.*, 2010). Se procesaron un total de 305 muestras.

En los dos primeros ensayos se aplicaron dos tratamientos diferentes: Apivar® (Veto-Pharma SA, Villebon-sur-Yvette, France) y Apiguard® (Vita Europe Ltd., Basingstoke, GB), y en el tercero se añadió el tratamiento con BeeVital Hive Clean® (Natures Laboratory Ltd., Yorkshire, GB). En la Tabla 7 pueden observarse las características de cada tratamiento usado. Los tratamientos se aplicaron de acuerdo con las indicaciones de los fabricantes.

Cada tira de polietileno del tratamiento con AV contiene 500 mg de amitraz. Se introdujeron dos tiras del producto en cada colmena, una entre el tercer y cuarto cuadro y la otra entre el séptimo y octavo (Fig. 26A). Las tiras se retiraron al cabo de seis semanas.

Tabla 7. Características de los productos ensayados: principio activo (PA), presentación (P), tiempo de aplicación en semanas (T), modo de actuación (MA).

	PA	P	T	MA
Apivar (AV)	Amitraz (de síntesis)	Tiras de polietileno	6	Por contacto (neurotóxico)
Apiguard (AG)	Timol (origen orgánico)	Bandejas con gel	4	Vapores y por contacto (lo que induce a limpiarse)
BeeVital (BV)	Ácido oxálico, ác. fórmico y otros aceites esenciales (origen org.)	Recipiente con líquido	3	Vapores y por contacto (limpieza y cambio de olor, los ácaros se desprenden)

Cada bandeja del tratamiento de AG está compuesta por 50 g de gel de liberación lenta, que contiene un 25% de timol, por lo que cada bandeja incluye 12,5 g. En cada colmena seleccionada para este tratamiento, se colocó una bandeja abierta hacia la parte superior sobre los cuadros, en el centro de la colmena (Fig. 26B). A las dos semanas se retiró la primera bandeja y se colocó una segunda, que se retiró al cabo de otro par de semanas. Según el fabricante, AG debe aplicarse cuando la temperatura sea mayor de 15°C.

En cuanto al BV, en cada aplicación se utilizaron 20 ml del producto, que se aplicó en forma de gotas mediante una jeringa, entre los cuadros de las colmenas (Fig. 26C). Se realizó una aplicación a la semana, durante tres semanas consecutivas. En este caso el fabricante también aconseja unas condiciones de temperatura determinadas para una eficacia óptima (entre -1 y 25°C).

Los datos climáticos se obtuvieron de la estación meteorológica (de la Agencia Estatal de Meteorología – AEMET) situada en la parcela de estudio (39° 38' 36.25''N, 2° 38' 41.64''E).



Fig. 26. **A.** Tira de Apivar entre el tercer y cuarto cuadro de la colmena. **B.** Bandeja de Apiguard colocada sobre los cuadros de una colmena. **C.** Aplicación de BeeVital.

2.4.3.- Análisis de datos y análisis estadístico

Se obtuvo un dato semanal del número de ácaros caídos (NAC), de cada una de las colmenas muestreadas (tanto tratadas como control), desde una semana antes a la realización del tratamiento hasta una semana posterior a la finalización del tratamiento.

A partir de estos datos, se calcularon dos parámetros diferentes para estimar la eficacia de los tratamientos, que se explican a continuación.

- **El porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos (%CNAC)** se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CNAC} = 100 - [(\text{NAC}_{ft} * 100) / \text{NAC}_{at}],$$

donde NAC_{ft} es el número de ácaros caídos en la semana posterior a la finalización del tratamiento;

y NAC_{at} es el número de ácaros caídos en la semana de antes del tratamiento.

Este parámetro relaciona el número de ácaros presentes antes y después de realizar el tratamiento. Si un acaricida ha resultado efectivo el % CNAC dará un valor positivo, y viceversa. Por ejemplo si el número de ácaros se ha reducido a la mitad después de la aplicación del tratamiento, el % CNAC será 50%. En cambio si el número de ácaros ha aumentado el doble después del tratamiento, el % CNAC será -50%, mostrando la ineficacia del tratamiento.

Para representar estos resultados, se elaboró una gráfica en la que aparecían los datos obtenidos por semanas en base a unas unidades arbitrarias (UA). Para ello, los valores medios semanales del NAC obtenidos la semana antes de realizar el tratamiento se fijaron en 100, y los valores de las siguientes semanas se representaron como un porcentaje del valor mencionado para la semana anterior a la realización del tratamiento. Esto permite observar la evolución de la población de las colmenas en función del tratamiento recibido (o control).

- **El porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos (%R)** se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\%R = 100 * [1 - (NAC_{atc} * NAC_{ftt} / NAC_{att} * NAC_{fte})],$$

donde NAC_{atc} es el número de ácaros caídos en la semana de antes del tratamiento en las colmenas control;

NAC_{ftt} es el número de ácaros caídos en la semana posterior a la finalización del tratamiento en las colmenas tratadas;

NAC_{att} es el número de ácaros caídos en la semana de antes del tratamiento en las colmenas tratadas;

y NAC_{ftc} es el número de ácaros caídos en la semana posterior a la finalización del tratamiento en las colmenas control.

Este parámetro también relaciona el número de ácaros presentes antes y después de realizar el tratamiento, pero comparándolo con colmenas control. Así se incorpora la variación de la población del ácaro causada por otros factores (como la mortalidad natural, la natalidad, la inmigración o la emigración), medida en las colmenas control. Pueden darse 3 casos:

- que en las colmenas tratadas se haya producido una reducción del número de ácaros, en la misma medida que se haya dado en las colmenas control: el tratamiento no ha resultado eficaz. En este caso el %R será cero.

- que en las colmenas tratadas se haya producido una reducción del número de ácaros mayor que la que se haya dado en las colmenas control: el tratamiento ha resultado eficaz. En este caso el %R será mayor a cero (valor positivo).

- que en las colmenas control se haya dado una reducción mayor que en las colmenas tratadas: el tratamiento no ha resultado eficaz. En este caso el %R será menor a cero (valor negativo).

El %R es un índice que aporta Satta *et al.* (2005), a partir de una modificación de la fórmula del porcentaje de mortalidad del ácaro descrita por Floris *et al.* (2001). Este último autor usa los datos de infestación en abejas adultas, en lugar de los NAC, y concluye que el método de evaluación de la eficacia basado en el porcentaje de mortalidad del ácaro es probablemente más preciso que el porcentaje del cambio de infestación, ya que incorpora la variación de la población del ácaro causada por otros factores (como la mortalidad natural, la natalidad, la inmigración o la emigración), que son fácilmente medidos usando colmenas no tratadas durante el periodo del ensayo.

Las medias y desviaciones estándar fueron calculadas para cada variable. Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA. Se usó el programa estadístico SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Un nivel de $p \leq 0,05$ fue aceptado como significativo.

2.5.- Efecto de la aplicación aérea en campo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) sobre las colonias de abejas³

2.5.1.- Localización y zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en dos pinares, de características semejantes, de la zona noreste de la isla de Eivissa, cuya localización exacta puede observarse en la Fig. 27. La alianza vegetal que caracteriza a ambos pinares es *Cneoro tricocci* – *Pistacietum lentisci*, cuyas especies vegetales más representadas son el pino (*Pinus halepensis*), lentisco (*Pistacia lentiscus*), olivillo (*Cneorum tricoccum*), coscoja (*Quercus coccifera*), sabina (*Juniperus turbinata*), brezo (*Erica multiflora*) y olivarda (*Dittrichia viscosa*).

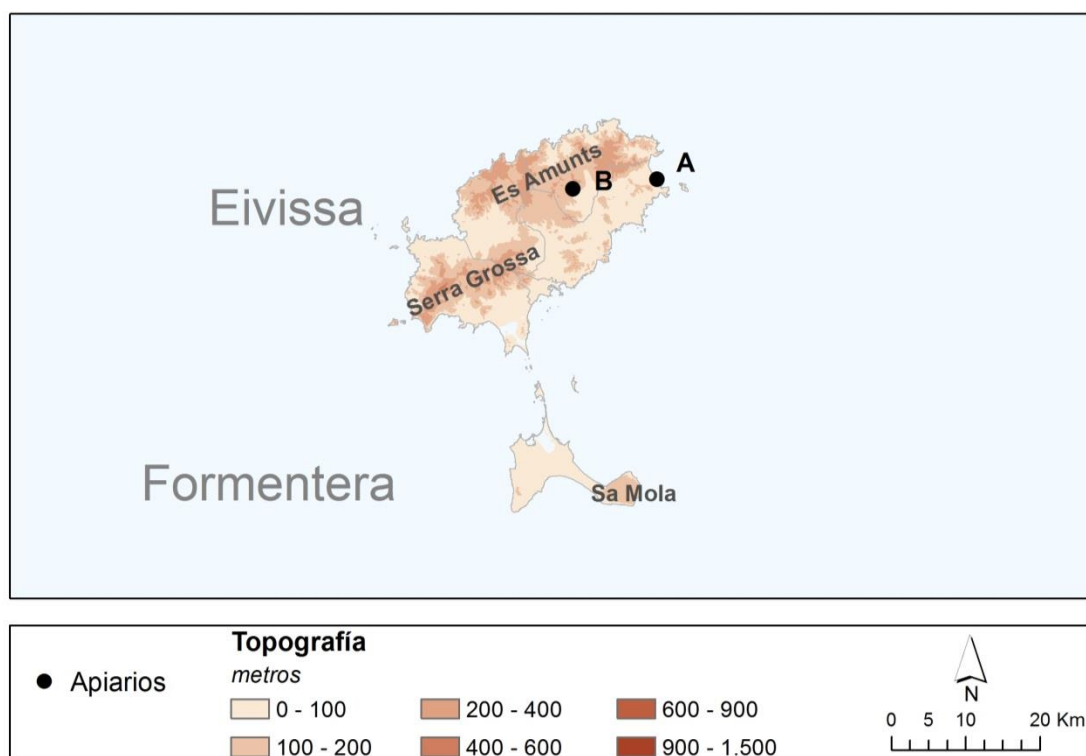


Fig. 27. Localización de los pinares en Eivissa. (A) Zona tratada con *Btk* (UTM: 31S 379032 m E 4322751 m N) y (B) parcela control (UTM: 31S 367720 m E 4321474 m N).

³ La versión en inglés en formato artículo se puede consultar en el anexo. Publicado en *Spanish Journal of Agricultural Research*, **12**, 405-408.

2.5.2.- Muestreo en campo y procesamiento de las muestras

Se seleccionaron dos campos de estudio, uno de ellos localizado en una zona tratada con *Btk* (para el control de la procesionaria del pino, *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller 1775) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae)) y el segundo en una zona libre de tratamientos, que fue tomado como control. Ambos estaban separados una distancia de 10 km, distancia insalvable por el vuelo de las abejas y libre asimismo del efecto deriva en las pulverizaciones.

Para realizar este estudio se elaboró un diseño BACI (del inglés *Before-After Control-Impact*. Diseño anterior, diseño posterior, de control, de impacto) (Green, 1979), para poder estimar el nivel de impacto provocado por la aplicación del insecticida *Btk*.

Se llevaron a cabo un total de seis muestreos. Las primeras muestras se tomaron el 25 de Agosto de 2009, dos meses antes de la aplicación aérea del tratamiento, que se realizó el 20 de octubre de 2009, mediante un helicóptero. El producto aplicado fue Foray 48 B, Kenogard S.A., España (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, 11.8% p/v (11.8 · 106 of IU g⁻¹). Suspensión concentrada (SC); 3.5 L ha⁻¹ aplicación de ultra-bajo volumen, diámetro de gota: 100-125 micrones). El segundo muestreo se realizó al cabo de cuarenta y cinco días, los siguientes se realizaron cada quince días, y el último se realizó al cabo de treinta días, el 16 de diciembre de 2009.

Con el fin de que las poblaciones de abejas (*Apis mellifera iberiensis*) objeto de estudio fueran lo más homogéneas posible, se optó por utilizar nuevas reinas para que todas fueran de la misma edad. Para ello se siguió la técnica descrita por Doolittle (Flores *et al.*, 1998), conocida como transvase de larvas (Fig. 28). El fundamento de este método es reconducir el desarrollo de una larva de menos de tres días, inicialmente destinada a ser obrera, de modo que al ser transvasada a otra celdilla artificial de tamaño y disposición propia de una celdilla real y situarla en una colonia nueva, dé lugar a una reina. Como sustituto de las celdillas reales se usaron cúpulas de material sintético, sujetas en soportes portacúpulas y éstas a su vez en listones. Los listones se colocaron horizontalmente en marcos de panales sin cera, dispuestos de tal forma que las cúpulas quedaran en posición vertical dirigidas hacia abajo, como las celdillas naturales. Cada

listón contaba con 12 cúpulas, y estaban separados unos de otros por 3 cm (Fig. 28 A-D). Las larvas se extrajeron de las colmenas y se trasvasaron a las mencionadas celdillas artificiales de reinas, junto con una pequeña cantidad de alimento formado por jalea real (60%) y agua destilada estéril. Los cuadros conteniendo estas celdillas artificiales con las larvas sembradas se introdujeron en núcleos huérfanos (sin reina) tipo Perfección (Fig. 28D). Cinco días después las celdillas reales ya estaban operculadas, por lo que se procedió a enjaularlas a fin de evitar que escaparan. El nacimiento de las reinas tuvo lugar entre 12 y 13 días desde que fueron colocadas sus larvas en las celdas reales. Las reinas una vez emergidas fueron sacadas de su jaula e introducidas en un pistón, para su marcaje con un rotulador específico de color verde, que según la normativa en vigor correspondía a las abejas del año 2009 (Fig. 28E). Posteriormente se introdujeron en colmenas de fecundación de 2 cuadros, para que las reinas realizaran el vuelo nupcial. Finalmente se trasladaron a los núcleos definitivos, nuevos núcleos tipo Perfección de 5 cuadros que contenían colonias sin reina.

Paralelamente a la cría de las reinas, se prepararon núcleos nuevos tipo Perfección de cinco cuadros (Fig. 28E). Los cuadros de las colmenas fueron elaborados con cera orgánica. Las dos caras de los cinco cuadros de cada núcleo se identificaron (Fig. 18F). Las abejas no recibieron ningún tratamiento químico. En cada zona de estudio se colocaron cuatro núcleos Perfección.

En cada muestreo se fotografiaban (con una cámara digital Nikon D70 SRL (Single-Lens Reflex)) ambas caras de cada cuadro de los núcleos (metodología seguida en posteriores estudios sobre el impacto del *Btk* en campo (Dai *et al.*, 2012)). Un total de 480 imágenes fueron tomadas y examinadas. En cada muestreo se tomaban 80 imágenes (10 por colmena). Cada fotografía digital se procesaba con el programa de Análisis de Imagen Arc View GIS 3.2. Se marcaban las celdas ocupadas por cría de abeja (tanto operculada como sin opercular) y se calculaba el área ocupada por la cría (Fig. 29).



Fig. 28. Diferentes pasos de la metodología empleada para preparar las unidades experimentales. Cría de reinas (A-D). A-B. Transvase de larvas desde el cuadro de cría a las celdillas reales artificiales. C. Celdillas reales artificiales. Transvase de una larva a la cúpula, con la ayuda de un *picking* (aguja para el transvase). D. Introducción del cuadro con las celdillas artificiales en los núcleos tipo Perfección. E. Marcaje de una reina sujeta en el interior de un pistón. F. Marcaje de los cuadros utilizados en el presente estudio; en la fotografía puede apreciarse un núcleo Perfección de 5 cuadros.

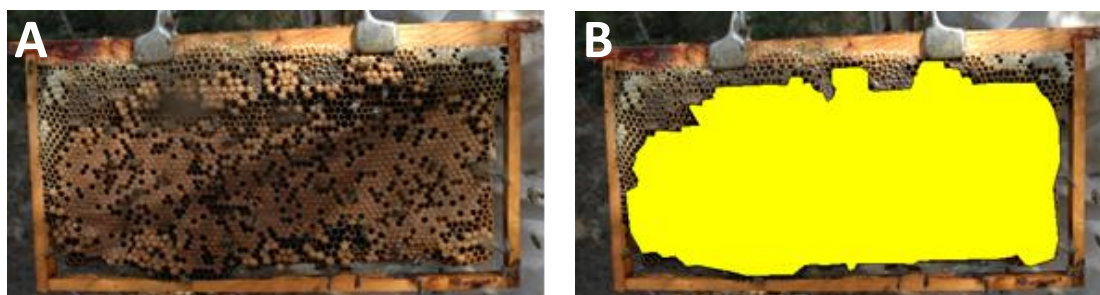


Fig. 29. **A.** Fotografía de un cuadro objeto de estudio. **B.** Fotografía del mismo cuadro en el que se ha marcado el área de cría en color amarillo, usando el programa de Análisis de Imagen Arc View GIS 3.2.

Durante cada uno de los muestreos realizados se observó el estado de los núcleos en cuanto a reservas de miel y polen, y producción de propóleos. Además se observaba la zona de estudio con el fin de localizar enjambres.

2.5.3.- Análisis de datos y análisis estadístico

Se calculó el porcentaje de celdas ocupadas por cría, lo que puede ser usado como un buen indicador de la salud de las reinas y el desarrollo de la cría (Dai *et al.*, 2012). Se elaboró una base de datos de todos los valores obtenidos en cada muestreo.

Se calculó la correlación de los porcentajes de cría entre el grupo tratado y el control, y el ratio *Btk*/control a lo largo del estudio.

Los datos fueron analizados utilizando un diseño factorial mixto 2 x (6 x 4) con un factor entre (grupos control/tratado) y un factor intra (seis puntos temporales). Se usó el programa estadístico SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Un nivel de $p < 0,05$ fue aceptado como significativo. Las medias y desviaciones estándar fueron calculadas para cada variable.

Capítulo 3: Resultados y discusión

Capítulo 3: Resultados y discusión

3.1.- Dinámica poblacional de *V. destructor* y los factores que la modulan⁴

En este apartado se analizan los resultados elaborados a partir del estudio de las 950 muestras obtenidas de los apiarios a lo largo de dos años (2010 y 2011).

En la primera parte de este apartado se describen las curvas poblacionales del parásito obtenidas en cada zona geomorfológica diferenciada (Tramuntana, Raiguer, Pla, Llevant i Migjorn), además de la curva poblacional general del parásito. También se describen las curvas anuales de algunos factores (hospedador, pérdidas de colmenas, temperatura mínima y humedad media) cuya influencia en la población del ácaro se analiza en la segunda parte de este apartado.

Así, en la segunda parte se analizan los factores biológicos, climáticos, paisajísticos y de manejo que modulan la abundancia del ácaro, en base a los modelos estadísticos desarrollados.

3.1.1.- Curva poblacional de *V. destructor*

A continuación se describen las **curvas poblacionales del ácaro** resultantes en cada zona de estudio.

Referente a la curva poblacional de los apiarios localizados en la zona del **Raiguer** (Fig. 30), en el **apiario 1 (Campanet)** se observaron dos picos máximos, uno durante el mes de febrero (53,2 NAC (= valor promedio del número de ácaros caídos)), que coincide con el momento de aplicación del tratamiento antivarroa, y el otro en el

⁴ La versión en inglés en formato artículo se puede consultar en el anexo. En vías de publicación.

mes de agosto (40,2 NAC). El mínimo poblacional de *Varroa* se obtuvo en el mes de mayo (2,8 NAC).

Durante el primer año de estudio en el **apiario 2 (Santa María)** se observaron dos máximos poblacionales, uno durante el mes de julio (137,2 NAC), y otro en el mes de diciembre (122,8 NAC), este último coincidente con la aplicación del tratamiento antivarroa. El mínimo del primer año se registró en marzo (19,4 NAC). Durante el segundo año de estudio se observó un único máximo en el mes de junio (157 NAC). En este caso el mínimo poblacional se detectó en noviembre.

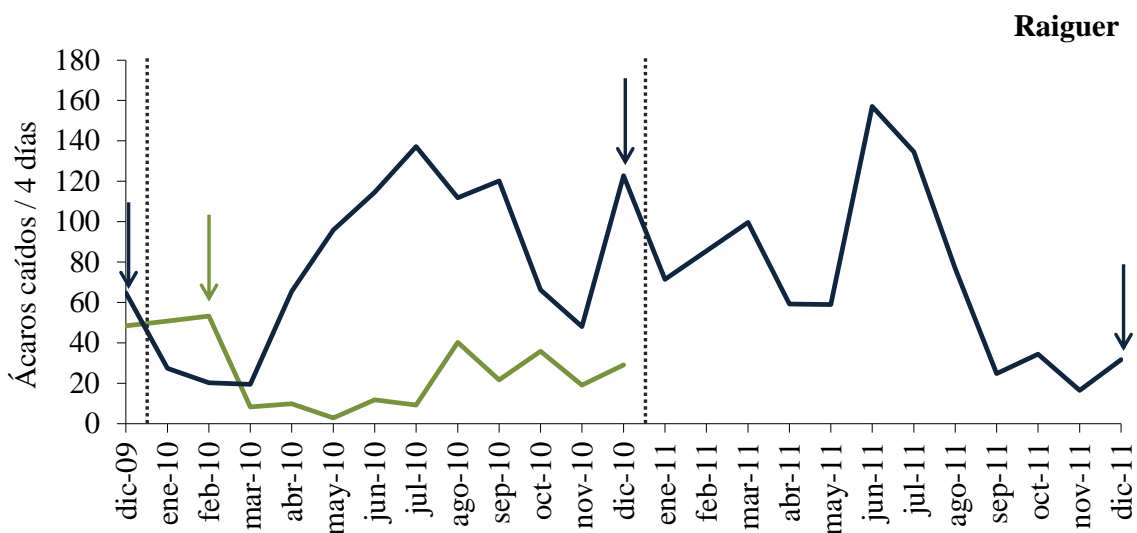


Fig. 30. Curva poblacional de *Varroa* (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en la zona del Raiguer. En color verde el apiario 1 (Campanet) y en azul el apiario 2 (Santa María). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.

Referente a la curva poblacional de los apiarios localizados en la zona del **Pla** (Fig. 31), en el **apiario 3 (Llubí)** se observaron dos picos máximos, uno durante el mes de abril de 2010 (219 NAC), que coincide con el momento de la aplicación del primer tratamiento antivarroa (el segundo se realiza en mayo), y el otro en diciembre (218,2 NAC). Durante el segundo año de estudio no se aplicó ningún tratamiento antivarroa y se observó un único máximo en el mes de enero (246,7 NAC). El mínimo poblacional

del primer año se detectó en julio (18,6 NAC) y del segundo año en agosto (ningún ácaro observado).

En el **apiario 4 (Ariany)** se observaron dos picos máximos, uno durante el mes de marzo (77,7 NAC), y otro poco destacado en el mes de agosto (34,4 NAC). El mínimo poblacional se registró en septiembre (15 NAC).

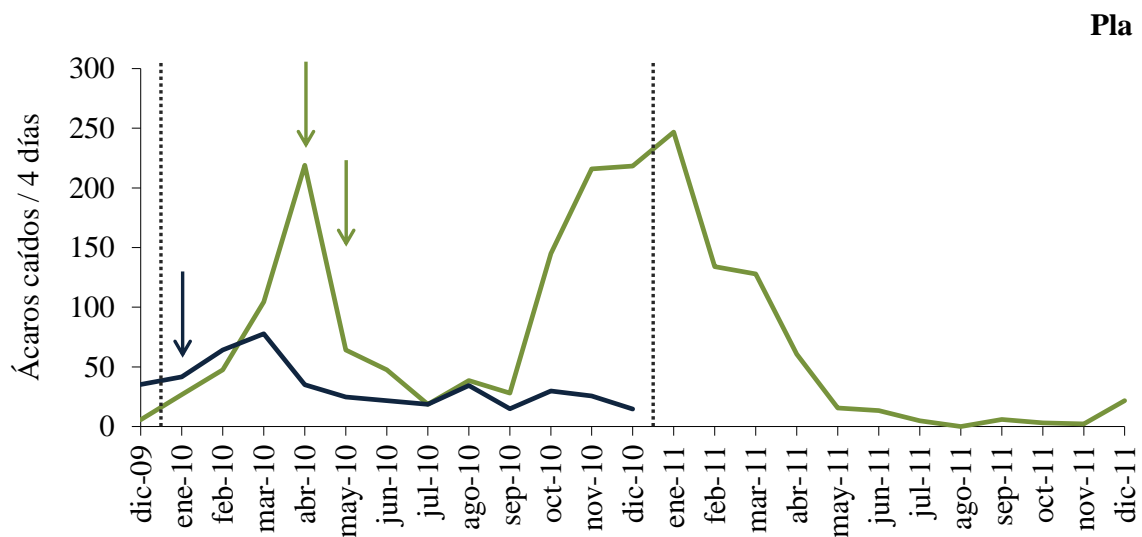


Fig. 31. Curva poblacional de *Varroa* (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en la zona del Pla. En color verde el apiario 3 (Llubí) y en azul el apiario 4 (Ariany). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.

Referente a la curva poblacional de los apiarios localizados en la zona de la **Serra de Tramuntana** (Fig. 32), en el **apiario 5 (Andratx)** se observó un pico máximo durante el mes de mayo (99,7 NAC). El mínimo se registró en diciembre (3,6 NAC).

En el **apiario 6 (Puigpunyent)** se registraron dos picos anuales durante 2010, que coincidieron con las aplicaciones del tratamiento antivarroa (Fig. 32). El primer pico anual se registró durante el mes de marzo (225,4 NAC) y el segundo pico en el mes de septiembre (148,2 NAC). Durante el segundo año también se observaron dos picos, en febrero y noviembre, sin embargo esta vez no coinciden con los tratamientos y además son mucho menores en relación al año anterior (el primer pico anual de 2011 fue un

69,86% menor con respecto al primer pico de 2010). En 2011 se observó un aumento en el número de ácaros durante el mes de abril (23,8 NAC). Los mínimos poblacionales se observaron en abril de 2010 (0,6 NAC) y septiembre de 2011 (ningún ácaro contabilizado).

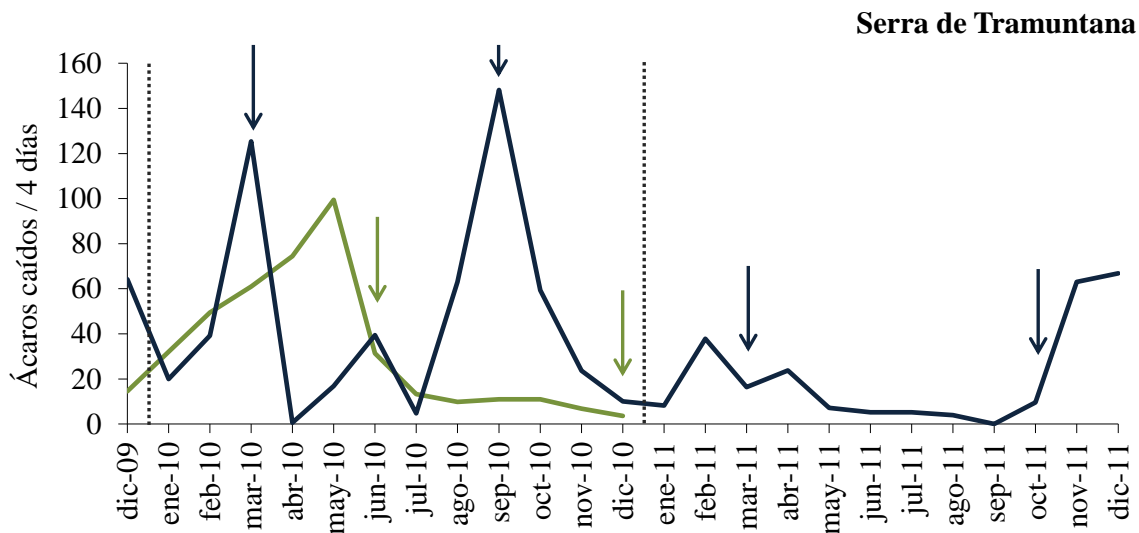


Fig. 32. Curva poblacional de *Varroa* (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en la zona de la Serra de Tramuntana. En color verde el apiario 5 (Andratx) y en azul el apiario 6 (Puigpunyent). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.

Los dos apiarios de la zona de **Llevant** (Fig. 33) presentaron curvas poblacionales similares, a diferencia de los casos anteriores. Se registraron dos picos máximos en ambos apiarios, el primero de los cuales se observó en el mes de marzo, mientras que el segundo máximo del **apiario 7 (Capdepera)** se observó en noviembre (64,2 NAC) y del **apiario 8 (Son Servera)** en diciembre (59 NAC). Los mínimos poblacionales se observaron en junio en el apiario 7 (12,2 NAC) y septiembre en el apiario 8 (3,2 NAC).

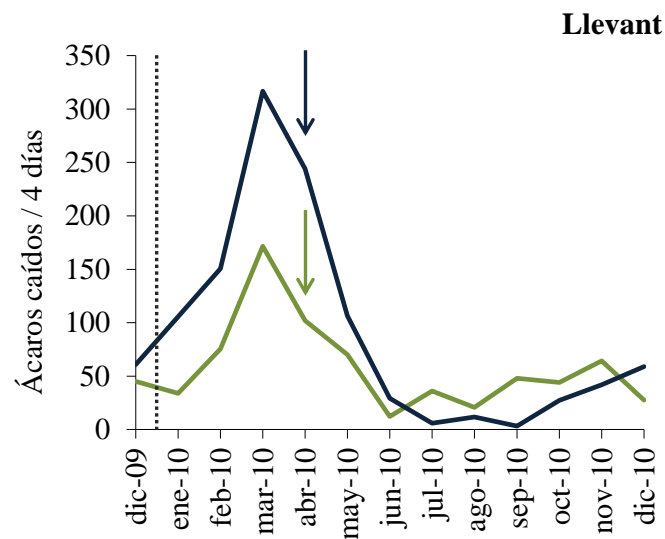


Fig. 33. Curva poblacional de *Varroa* (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2010 en la zona de Llevant. En color verde el apiario 7 (Capdepera) y en azul el apiario 8 (Son Servera). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.

Finalmente, los apiarios localizados en la zona de **Migjorn** presentaron curvas anuales con dos máximos poblacionales en ambos casos (Fig. 34). Así, en el **apiario 9 (Campos I)** se observó un pico en marzo de 2010 (115,8 NAC) y otro en septiembre-octubre de 2010 (71,2 y 72,2 NAC), ambos coincidentes con la aplicación del tratamiento antivarroa. En el segundo año de estudio el pico de marzo se mantuvo (un 67,48% mayor que el del año anterior, 171.6 NAC) y coincidió con el tratamiento, sin embargo el segundo anual se desplazó a junio de 2011 (58,4 NAC).

En el **apiario 10 (Campos II)** se observaron sendos picos máximos en junio y agosto (79 y 74,2 NAC, respectivamente), el primero de cuales coincidió con la aplicación del tratamiento. El patrón en el año siguiente se repitió, aunque en este caso ningún pico máximo coincidió con el tratamiento, además que los valores máximos fueron aproximadamente un 60% menores con respecto a los del año precedente, contabilizándose 32,4 y 28 NAC en junio y agosto, respectivamente.

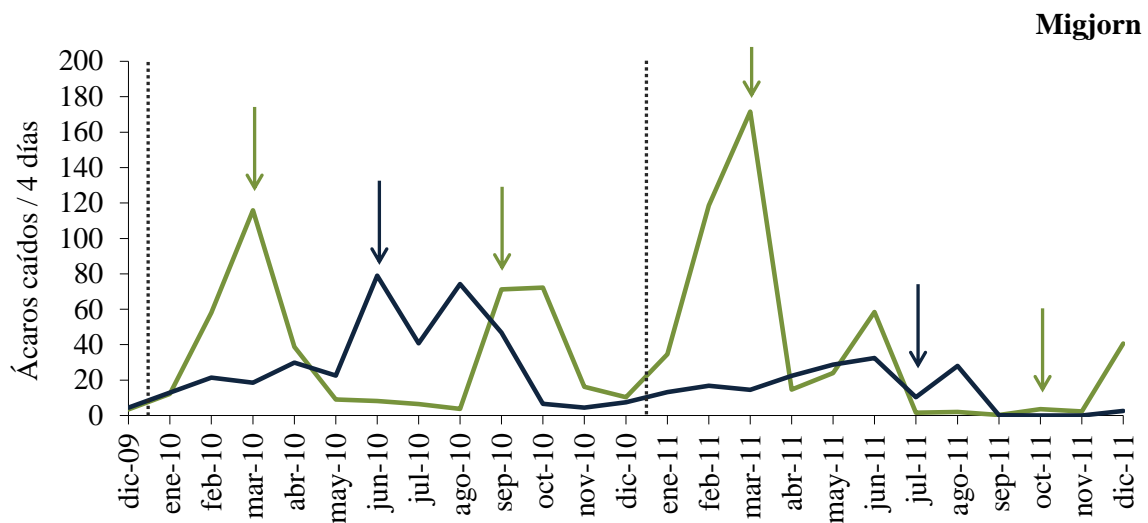


Fig. 34. Curva poblacional de *Varroa* (media del número de ácaros caídos), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en la zona de Migjorn. En color verde el apiario 9 (Campos I) y en azul el apiario 10 (Campos II). Las flechas indican el momento de la aplicación del tratamiento antivarroa.

En la Figura 35 se presenta la **curva poblacional de *V. destructor*** para Baleares durante 2010 y 2011, calculada a partir de las curvas obtenidas en los diez apiarios incluidos en este estudio. En dicha curva se aprecia que la abundancia anual de *Varroa* corresponde a un patrón bimodal, con dos máximos poblacionales, uno situado en primavera y otro en verano/otoño, resultando el máximo de primavera el más elevado en ambos años de estudio. El momento del segundo máximo fue variable entre los años, se dio en septiembre de 2010, mientras que se adelantó a junio en el siguiente año. El valor de NAC más elevado se obtuvo en marzo de 2010 (103,59 NAC), y el más bajo se registró en septiembre de 2011 (6,55 NAC). La abundancia de *Varroa* fue mayor en 2010, con una media del NAC de $52,36 \pm 6,21$ en 2010, y una media de $39,86 \pm 7,83$ NAC en 2011, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los dos años ($p=0,027$).

Este trabajo corresponde al primer estudio sobre la dinámica poblacional de *Varroa* que se realiza en Baleares. La curva poblacional obtenida (Fig. 35) concuerda con trabajos realizados en la zona sur de la Península Ibérica por García-Fernández (1995) y los registrados en el litoral valenciano por Calatayud y Verdú (1992) que

muestran dos picos anuales. Nuestros resultados y los de los trabajos citados anteriormente coinciden en el pico de primavera. En el caso de la zona sur de la Península Ibérica el segundo pico se observó en diciembre y en Valencia se registró en noviembre, mientras que en nuestros estudios se detectó en verano-otoño.

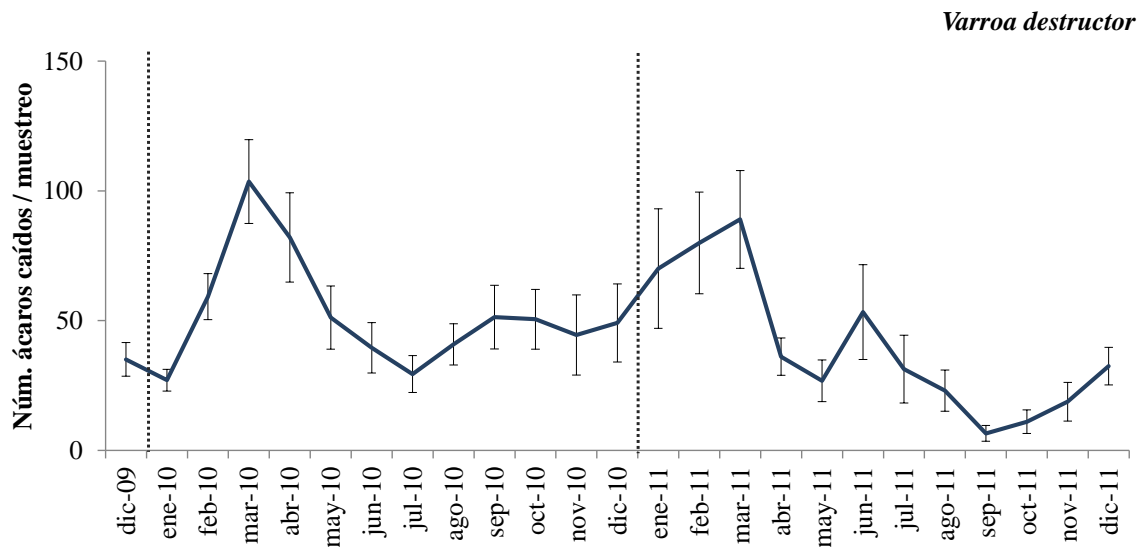


Fig. 35. Curva poblacional general de *Varroa destructor* (medias \pm error estándar), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011.

Se ha comprobado que el 33,3% de los máximos poblacionales registrados en el presente estudio, realizado mediante el muestreo en fondo de colmena, coinciden con el momento de aplicación del tratamiento acaricida. El 66,7% de la variación estacional anual de la población de *Varroa* no coincide con tratamientos acaricidas, siendo por tanto otros factores los que influyen en la dinámica, como se ha indicado en estudios anteriores citados en la revisión de Rosenkranz *et al.* (2010).

Con la finalidad de discernir el impacto de algunos factores biológicos, climáticos, paisajísticos y de manejo sobre la curva poblacional de *Varroa*, se desarrolló un Modelo Lineal Generalizado Mixto, que se describe y analiza en el siguiente apartado (3.1.2).

Referente a la **curva poblacional de las abejas**, la media del número de cuadros ocupados por abejas (NCA) se mantuvo constante durante el año (Fig. 36), excepto en los dos últimos meses de ambos años, cuando la población fue menor, con menos de 6,5 NCA. La abundancia de abejas fue también mayor en 2010 (media de NCA de $7,99 \pm 0,30$) que en 2011 (media de NCA de $7,20 \pm 0,20$), sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas.

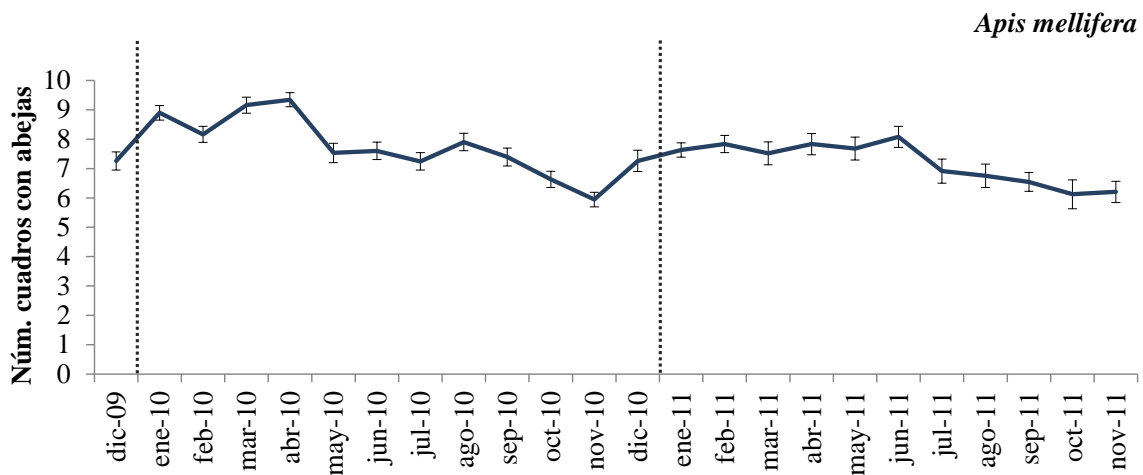


Fig. 36. Media mensual del número de cuadros ocupados por abejas en cada muestreo (medias \pm error estándar), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011.

En cuanto a las **pérdidas de colmenas**, la Figura 37 muestra que se concentraron entre otoño e invierno (de septiembre a febrero) de cada año, momento en el que ocurrieron el 77,5% de las pérdidas (31 colonias se perdieron en los dos años de estudio). La estación con menos pérdidas fue verano (de junio a agosto), registrándose sólo el 5% de las pérdidas (2 colonias en los dos años). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los años de estudio.

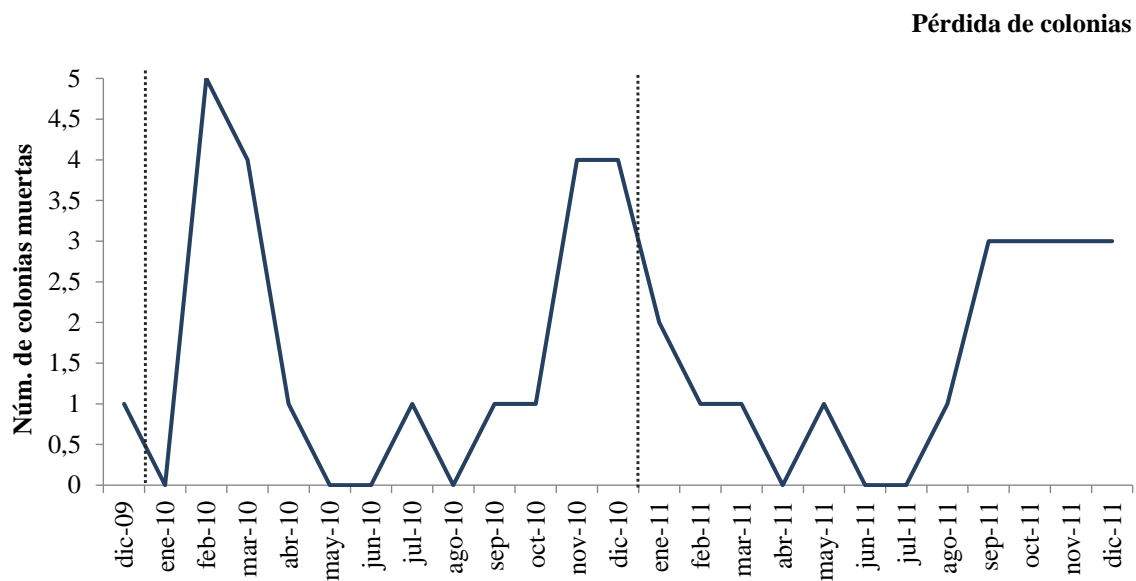


Fig. 37. Curva del número total de colonias perdidas en cada muestreo (medias \pm error estándar), registrada desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011, en el conjunto de apiarios incluidos en este trabajo.

Referente a los factores climáticos, el patrón estacional de la **temperatura mínima** absoluta mensual fue similar entre los años de estudio (Fig. 38A), disminuyendo a valores inferiores a cero durante cuatro meses en invierno de 2009/2010 y dos meses en invierno de 2010/2011, y elevándose por encima de 12°C en verano, agosto en 2010 y julio en 2011. El patrón estacional de la **temperatura máxima** absoluta mensual también fue muy similar entre los años 2010 y 2011 (Fig. 38A), registrándose valores superiores a 30°C entre los meses de mayo a septiembre de 2010 y de abril a septiembre de 2011, e inferiores a 20°C en enero de 2010 y febrero y diciembre de 2011. La **temperatura media** (Fig. 38A) presentó un máximo anual en ambos años de estudio, durante julio de 2010 (25,60°C) y agosto de 2011 (25,28°C), y los valores mínimos, inferiores a 10°C, se registraron en enero y diciembre de ambos años.

Por otro lado, el patrón estacional de la **precipitación** (Fig. 38B) del año 2010 fue anómalo, ya que se registraron dos máximos, uno en mayo y otro en octubre (superiores a 100 mm). En cambio, el patrón del año 2011 fue el típico de Baleares, registrándose

un pico en noviembre (superior a 200 mm). Además, la precipitación de 2010 fue un 27,1% superior a la de 2011. Los meses de mayor aridez fueron julio de 2010 y agosto de 2011, en los que se registró una precipitación inferior a 2 mm.

La media mensual de la **humedad relativa** fue superior al 78% en los meses de invierno (de noviembre a enero) e inferior al 70% en el periodo de mayo a agosto (Fig. 38C).

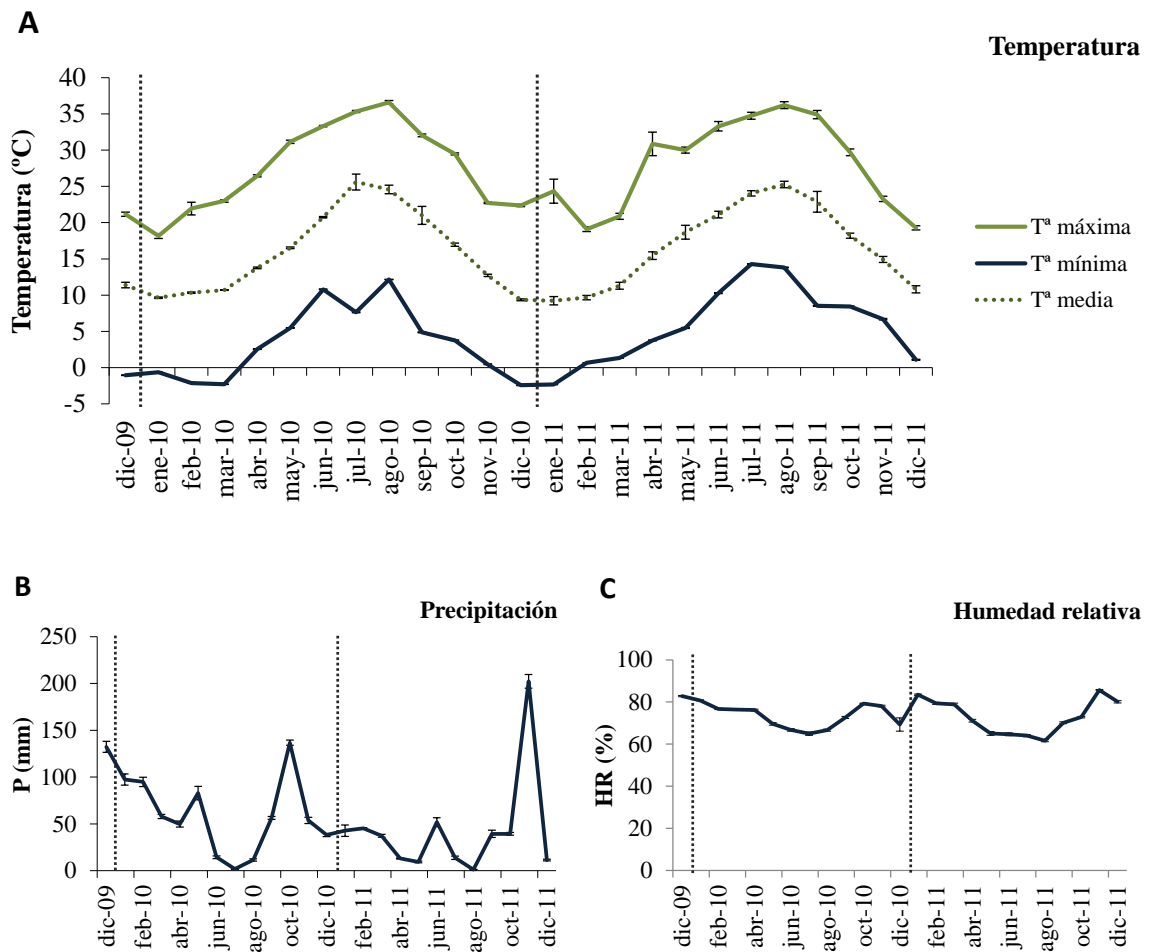


Fig. 38. A. Patrón estacional de la temperatura mínima absoluta, la temperatura máxima absoluta y la temperatura media (°C) (medias \pm error estándar). B. Patrón estacional de la precipitación (mm) (medias \pm error estándar). C. Patrón estacional de la humedad relativa media (%) (medias \pm errores estándar), registrados desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011.

Con respecto a los **tratamientos antivarroa** (Fig. 39), no hubo un patrón estacional consistente en el mes escogido por los apicultores. Diciembre de 2010 fue el momento en el que más colmenas fueron tratadas (29,41% del total de tratamientos). Durante 2011, la mayoría de tratamientos se aplicaron en Marzo y Octubre (28,57% de todos los tratamientos se aplicaron en dichos meses).

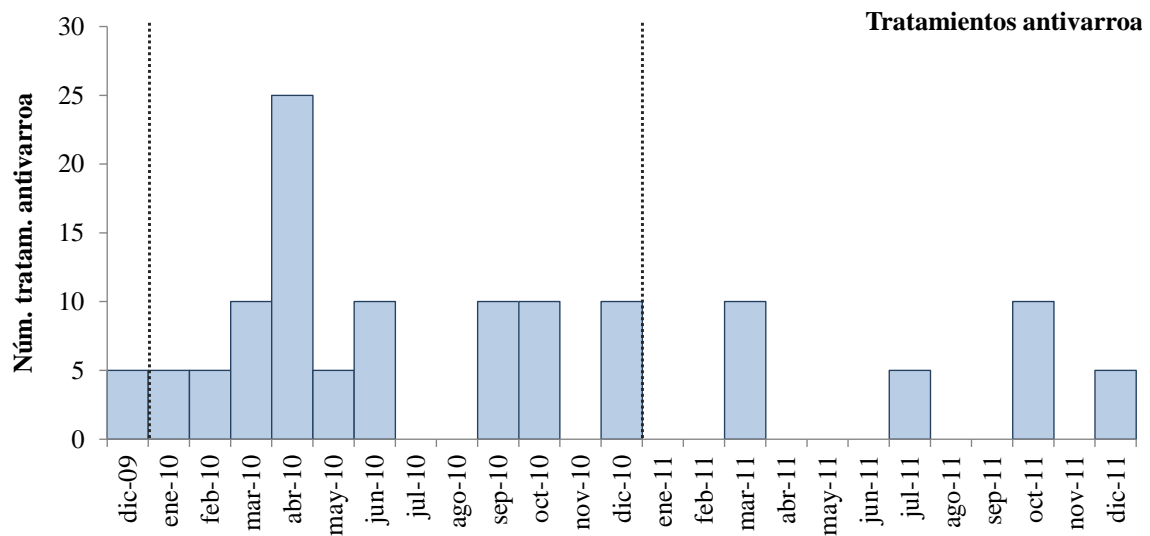


Fig. 39. Patrón estacional del número total de tratamientos antivarroa aplicados a lo largo de los años, desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011.

3.1.2.- Efectos ambientales sobre la abundancia de *Varroa*

La relación entre la abundancia de *Varroa* y los predictores ambientales fue examinada en diferentes escalas de tiempo usando Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM; Generalized Linear Mixed Models, GLMM en inglés). Estos modelos estadísticos incluyen tanto efectos fijos como efectos aleatorios.

Como puede apreciarse en la Tabla 8, la variable colmena fue el mejor efecto aleatorio para todas las variables dependientes (abundancia de *Varroa* anual, semestral y mensual). Este efecto aleatorio de la colmena se incluye en todos los modelos durante la selección de las variables.

Tabla 8. Selección de los efectos aleatorios adecuados para los modelos de abundancia de *Varroa*: Tabla de valores de AIC para los modelos globales (que contienen todos los predictores ambientales) con diferentes combinaciones de efectos aleatorios para cada variable dependiente.

Combinación de efectos aleatorios	Variable dependiente			
	Anual (n= 75)	Primer semestre (n = 75)	Segundo semestre (n = 75)	Mensual (n = 414)
Colmena	706,6	752,9	628,8	3665,1
Apiario	710,1	756,8	629,5	3668,9
Zona biogeográfica	709,8	756,8	629,5	-
Año	710,1	756,8	629,5	3666,9
Colmena + Apiario	708,6	no-convergencia	630,8	3667,1
Colmena + zona biogeo.	708,6	754,9	no-convergencia	-
Colmena + año	708,6	754,9	630,8	3665,7
Apiario + zona biogeo.	711,8	no-convergencia	no-convergencia	-
Apiario + año	712,1	758,8	631,5	3668,9
Zona biogeo. + año	711,8	758,8	631,5	-

El mejor **modelo anual** de la abundancia de *Varroa* incluye tres predictores significativos: abejas, tratamiento antivarroa y disponibilidad de recursos naturales (Tablas 9 y 10).

La abundancia anual de *Varroa* aumentó con el incremento de la abundancia de **abejas**, siendo esta el predictor más importante en el modelo final anual (ver δ AIC de la tabla 10).

La **disponibilidad de recursos naturales** tuvo un impacto negativo significativo en la abundancia anual de *Varroa*, por lo que *Varroa* fue más abundante en los apiarios que disponían de una cantidad menor de recursos naturales.

Asimismo, tanto el **tratamiento** químico como el orgánico tuvieron un impacto negativo significativo en la abundancia anual del ácaro, aunque en este caso el efecto del tratamiento fue marginal, lo que se desprende al observar la diferencia en AIC entre el modelo sin el tratamiento y el modelo con tratamiento (que fue menor que 1, ver Tabla 9) y el valor δ AIC de la Tabla 10.

Tabla 9. Mejores modelos para el modelo anual, con los predictores de cada uno de ellos y los valores de LogLik, AIC y δ AIC.

N. pred.	Predictores en modelo	LogLik	AIC	δ AIC
0	ninguno	-358,66	723,33	20,68
3	A + Trat + Rec_Nat	-344,33	702,65	-
2	A + Rec_Nat	-346,63	703,25	0,60
4	A + Trat + Rec_Nat + HM	-343,71	703,43	0,78
3	A + Rec_Nat + HM	-345,96	703,91	1,26
4	A + Rec_Nat + TMA + HM	-345,41	704,82	2,17
3	A + Rec_Nat + TMA	-346,51	705,01	2,36
1	A	-351,62	711,24	8,59
2	A + TMA	-351,14	712,28	9,63

A= abejas, Trat= tratamiento, Rec_Nat= Recursos naturales, HM= humedad relativa media, TMA= temperatura mínima absoluta.

Tabla 10. Coeficientes y valores de p para los predictores del modelo anual.

Pred. modelo final	Estimación [#]	Valor p	δ AIC*
Abejas	0,673	< 0,0001	14,48
Recursos naturales	-0,036	< 0,0005	9,66
Tratamiento químico	-0,775	0,024	0,60
Tratamiento orgánico	-0,736	0,039	

[#] El signo de la estimación indica si la relación entre la variable dependiente y el predictor es positiva o negativa.

* El estadístico δ AIC revela la importancia de cada predictor en el modelo final.

En cuanto a los modelos semestrales, para el **periodo de enero a junio**, a la abundancia de abejas, el tratamiento y la disponibilidad de recursos naturales, se añadió el efecto significativo de la **temperatura mínima absoluta**, que tuvo un impacto negativo sobre la abundancia de *Varroa*. Así, la abundancia de *Varroa* aumentó al disminuir la temperatura. En este periodo, el efecto de la temperatura y de la disponibilidad de recursos naturales fue más importante que el efecto marginal de las abejas y el tratamiento (Tablas 11 y 12, primer semestre).

Tabla 11. Mejores modelos para el modelo semestral, con los predictores de cada uno de ellos y los valores de LogLik, AIC y δ AIC.

Modelo	N. pred.	Predictores en modelo	LogLik	AIC	δ AIC
1S (n=75)	0	ninguno	-378,81	763,62	14,14
	4	A + Trat + Rec_Nat + TMA	-366,74	749,48	-
	3	Trat + Rec_Nat + TMA	-367,95	749,89	0,41
	3	A + Rec_Nat + TMA	-369,65	751,30	1,82
	2	Rec_Nat + TMA	-370,66	751,32	1,84
	5	A + Trat + Rec_Nat + TMA + HM	-366,68	751,37	1,89
	4	Trat + Rec_Nat + TMA + HM	-367,94	751,88	2,40
	4	A + Rec_Nat + TMA + HM	-369,40	752,80	3,32
	3	Rec_Nat + TMA + HM	-370,53	753,07	3,59
2S (n=75)	0	ninguno	-303,72	633,44	12,25
	4	A + Trat + Rec_Nat + HM	-314,85	645,69	-
	3	A + Trat + HM	-316,42	646,84	1,15
	5	A + Trat + Rec_Nat + TMA + HM	-314,57	647,13	1,44
	4	A + Trat + TMA + HM	-315,82	647,64	1,95
	3	A + Rec_Nat + HM	-321,88	655,76	10,07
	4	A + Rec_Nat + TMA + HM	-321,03	656,07	10,38
	3	A + TMA + HM	-323,57	659,14	13,45
	2	A + Trat	-323,70	659,40	13,71

1S= primer semestre, 2S= Segundo semestre, A= abejas, Trat= tratamiento, Rec_Nat= Recursos naturales, HM= humedad relativa media, TMA= temperatura mínima absoluta.

Tabla 12. Coeficientes y valores de p para los predictores del modelo semestral.

Modelo	Pred. modelo final	Estimación [#]	Valor p	δ AIC*
Primer semestre (n=75)	Recursos naturales	-0,048	0,003	6,51
	Temperatura mínima absoluta	-0,178	0,006	4,83
	Tratamiento químico	-0,527	0,087	1,82
	Tratamiento orgánico	0,028	0,941	
	Abejas	0,176	0,120	0,41
Segundo semestre (n=75)	Abejas	1,041	< 0,0001	23,42
	Humedad relativa media	-0,177	< 0,0001	14,32
	Tratamiento químico	-1,446	0,003	10,07
	Recursos naturales	-0,027	0,065	1,15

[#] El signo de la estimación indica si la relación entre la variable dependiente y el predictor es positiva o negativa.

* El estadístico δ AIC revela la importancia de cada predictor en el modelo final.

Por otro lado, para el **periodo de julio a diciembre** (Tablas 11 y 12, segundo semestre), se mantuvo el efecto significativo de las abejas y el tratamiento. Asimismo, la **humedad relativa media** tuvo un impacto negativo significativo en la abundancia de *Varroa*. Es decir, la abundancia de *Varroa* disminuyó en condiciones de elevada humedad (Tablas 11 y 12). Así, el impacto del tratamiento resultó más significativo asociado a la baja abundancia de *Varroa* de este periodo, teniendo el tratamiento orgánico más impacto que el químico (Tabla 12).

En el **modelo mensual** (Tablas 13 y 14), la abundancia de *Varroa* aumentó significativamente con la **abundancia** tanto de *Varroa* como de **abejas** registrada en el mes anterior (lag1). Asimismo, los **tratamientos aplicados** dos meses antes (lag2), la **disponibilidad de recursos naturales** y la **temperatura mínima absoluta** registrada en el mes anterior (lag1) tuvo un impacto negativo significativo en la abundancia de *Varroa*. El predictor más importante fue la abundancia de *Varroa* registrada el mes anterior, seguido de la temperatura mínima absoluta del mes anterior, mientras que el impacto de las abejas y el tratamiento resultó marginal en esta escala de tiempo.

Tabla 13. Mejores modelos para el modelo mensual, con los predictores de cada uno de ellos y los valores de LogLik, AIC y δ AIC.

N. pred.	Predictores en modelo	LogLik	AIC	δ AIC
0	ninguno	-1865,66	3737,32	81,82
5	V_Lag1 + A_Lag1 + TMA_Lag1 + Rec_Nat + Trat_Lag2	-1819,75	3655,50	-
5	V_Lag1 + A_Lag1 + MH + TMA_Lag1 + Rec_Nat	-1819,93	3655,86	0,36
4	V_Lag1 + TMA_Lag1 + Rec_Nat + Trat_Lag2	-1821,30	3656,60	1,10
4	V_Lag1 + A_Lag1 + TMA_Lag1 + Rec_Nat	-1821,54	3657,08	1,58
5	V_Lag1 + A_Lag1 + MH + TMA_Lag2 + Rec_Nat	-1820,59	3657,18	1,68
7	V_Lag1 + V_Lag2 + A_Lag1 + MH + TMA_Lag1 + Rec_Nat + Trat_Lag2	-1818,60	3657,20	1,70
5	V_Lag1 + TMA_Lag1 + TMA_Lag2 + Rec_Nat + Trat_Lag2	-1820,71	3657,42	1,92
5	V_Lag1 + MH + TMA_Lag1 + Rec_Nat + Trat_Lag2	-1820,72	3657,44	1,94

A= abejas, Trat= tratamiento, Rec_Nat= Recursos naturales, HM= humedad relativa media, TMA= temperatura mínima absoluta. Lag1: valor en el mes anterior, Lag2: valor dos meses antes.

Tabla 14. Coeficientes y valores de p para los predictores del modelo mensual.

Pred. modelo final	Estimación [#]	Valor p	δ AIC*
<i>Varroa</i> _Lag1	0,008	< 0,0001	46,86
Temperatura mínima absoluta_Lag1	-0,045	< 0,0005	14,48
Recursos naturales	-0,087	< 0,0001	9,28
Tratamiento_Lag2	-0,725	0,001	1,58
Abejas_Lag1	0,124	0,003	1,10

[#] El signo de la estimación indica si la relación entre la variable dependiente y el predictor es positiva o negativa.

* El estadístico δ AIC revela la importancia de cada predictor en el modelo final.

Así, estos modelos indican que los factores biológicos, climáticos y de manejo, así como la disponibilidad de recursos florísticos naturales son importantes en la variabilidad de la abundancia de *Varroa*, y que los modelos combinados son los que mejor explican el patrón de abundancia de *Varroa* en todos los periodos de tiempo estudiados. Estos resultados ilustran la complejidad de los factores que influyen en la abundancia de *Varroa* (Fries *et al.*, 1994; Calis *et al.*, 1999; Currie y Tahmasbi, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2010) y destacan la importancia de considerar estos factores simultáneamente en el marco de estudios empíricos y de modelos.

Como puede observarse en la Figura 40, la abundancia de *Varroa* se podría predecir con un alto grado de precisión (coeficiente de correlación de Pearson anual $r_p = 0,738$, $p < 0,0001$; primer semestre del año $r_p = 0,882$, $p < 0,0001$; segundo semestre del año $r_p = 0,760$, $p < 0$) en la escala anual y semestral, pero con un menor grado (r_p alrededor de 0,416, $p < 0,0001$) a nivel mensual, indicando probablemente la influencia considerable de otros factores ambientales no medidos sobre la dinámica de *Varroa* a nivel de esta última escala temporal.

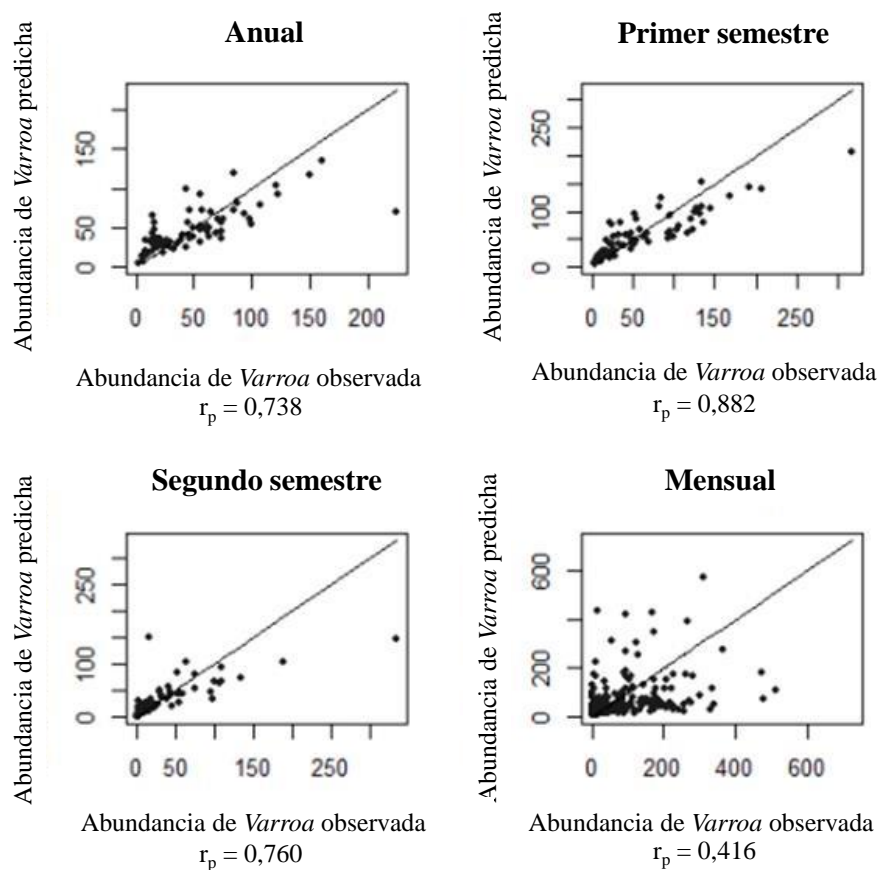


Fig. 40. Comparación entre los valores observados y predichos de la abundancia de *Varroa* a partir de los modelos ambientales ajustados a las diferentes escalas de tiempo.

Considerando los factores internos de la colmena, la abundancia de *Varroa* aumenta significativamente con la **abundancia de las abejas** a escala anual, particularmente en la segunda mitad del año, ya que la población del ácaro está limitada a la disponibilidad de cría del hospedador. Las hembras del parásito tienen una fase forética sobre las abejas adultas y una fase reproductiva en las celdas de cría de abeja cuando las celdas están disponibles, y la duración de esta fase reproductiva está restringida por la duración del desarrollo de la abeja (Donze *et al.*, 1996). Los resultados presentados aquí concuerdan con estudios anteriores que muestran que el crecimiento de la población de *Varroa* está asociado a la cantidad de cría y/o la fertilidad de los ácaros (Arechavaleta-Velasco y Guzman-Novoa, 2001; Lodesani *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2003), pero esta es la primera vez que el vínculo se ha establecido con el conjunto de la población de abejas. Durante el primer semestre del año, cuando la abundancia de

abejas tiende a ser mayor en las colmenas, la influencia de las abejas sobre la abundancia de *Varroa* fue más reducida.

Los **tratamientos antivarroa** estuvieron asociados de manera significativa con una disminución del ácaro, sin embargo su impacto fue en gran parte marginal, incluyendo la escala mensual de tiempo. Se registró un impacto significativo del tratamiento en la segunda mitad del año, periodo en el que la población de *Varroa* tiende a disminuir. El hallazgo que en este periodo el tratamiento orgánico es más efectivo que el tratamiento químico concuerda con estudios comparativos llevados a cabo por Loucif-ayad *et al.* (2010) en Algeria (Mediterráneo Occidental) durante otoño. La baja eficacia del Amitraz podría estar ligada a la aparición de resistencias desarrolladas por el ácaro a este producto debido a su continua aplicación desde hace más de 30 años (Trouiller, 1998; Elzen *et al.*, 1999a; Mathieu y Faucon, 2000; Sammataro *et al.*, 2005; Loucif-ayad *et al.*, 2010), pero que no han sido evaluadas en Baleares. Basándonos en los resultados del presente trabajo, el timol podría representar una alternativa para las estrategias de control integrado de *V. destructor*, presentando un menor riesgo de desarrollo de resistencias y una menor cantidad de residuos en los productos apícolas.

Considerando los factores externos, las colmenas situadas en una zona con una menor **proporción de recursos naturales** presentaron una mayor abundancia de *Varroa*. La disponibilidad de polen y néctar afecta a las condiciones de la colmena y a la salud de las abejas (Rosenkranz *et al.*, 2010). Por ejemplo, van Dooremalen *et al.* (2013) demostró que una disponibilidad reducida de polen, en forma de jalea real para las abejas nodrizas, resultó en una disminución del peso de los adultos y de los niveles de proteínas abdominales. El presente trabajo es uno de los primeros que relaciona la baja disponibilidad de recursos naturales (que está estrechamente relacionado con la disponibilidad de polen y néctar (Roulston y Goodell, 2011; Holzschuh *et al.*, 2012; Torne-Noguera *et al.*, 2014)) con los niveles de infestación de *Varroa*, indicando la importancia de la calidad de los recursos del área en la que está situado el apiario y por tanto, mostrando la importancia de preservar los recursos naturales a fin de mejorar la salud de las abejas y la polinización.

En cuanto a los factores climáticos, se encontró que la abundancia de *Varroa* aumentó al disminuir las **temperaturas** en el primer semestre del año, observándose como el primer máximo de la curva poblacional (Fig. 35) concuerda con las temperaturas mínimas más bajas registradas de enero a marzo. Esto concuerda con estudios anteriores que muestran la preferencia del ácaro por temperaturas más bajas, tanto de dentro de la colmena como por las regiones climáticas y las temporadas más frías (Le Conte y Arnold, 1987; Le Conte y Arnold, 1988; Patzold y Ritter, 1989; Moretto *et al.*, 1991; Rosenkranz y Engels, 1994; Bruce *et al.*, 1997; Kraus y Velthuis, 1997; Harris *et al.*, 2003). Los mecanismos concretos de dicha preferencia son poco conocidos pero podrían estar ligados al hecho de que temperaturas más bajas implican un aumento de la duración del periodo de post-operculación de la cría de obreras lo que supone un aumento del tiempo de la fase reproductiva del ácaro (Rosenkranz y Engels, 1994).

En el presente trabajo se ha observado que la abundancia de *Varroa* disminuye con el aumento de la **humedad relativa** en el periodo de julio a diciembre, lo que concuerda con estudios previos que establecen una relación entre la elevada humedad relativa ambiental y un bajo ratio de crecimiento de la población de *Varroa* (Kraus y Velthuis, 1997). Estos autores observaron que las hembras de *Varroa* reducen su capacidad reproductiva a niveles superiores a un 80% de HR. Además indicaron que en condiciones de elevadas temperatura y humedad relativa las abejas no son capaces de controlar las condiciones de la colmena y no crían, lo que implica una baja abundancia de *Varroa*. Asimismo, otros estudios señalan que el óptimo de reproducción de los ácaros es mayor con HR del 70% (Le Conte *et al.*, 1990). Por otra parte, las tasas de crecimiento reducidas observadas por Harris *et al.* (2003) fueron probablemente el resultado de una disminución de la tasa de reproducción de los ácaros durante los periodos de clima caliente y seco. Serían necesarios más estudios para comprender mejor estos efectos climáticos. Se podría plantear un futuro experimento en el que se midiera la tasa de crecimiento de la población de *Varroa*, simultáneamente a la medida de la temperatura y la humedad relativa tanto en el interior como en el exterior de la colmena, con el fin de observar cómo influyen estos parámetros en la tasa de crecimiento de la población del ácaro.

Finalmente, se ha observado que las **pérdidas de colonias** se concentran en otoño e invierno (el periodo de septiembre a febrero contiene el 77,5% de pérdidas) de cada año, lo que es consistente con estudios previos realizados en Europa (Crailsheim *et al.*, 2009), EEUU (vanEngelsdorp *et al.*, 2009; 2010), Oriente Medio y Japón. En estos trabajos se relacionaron las pérdidas con el efecto producido por *Varroa* (Neumann y Carreck, 2010). Durante otoño e invierno la población de abejas se ve disminuida y se produce un aumento relativo de la parasitación y en consecuencia, las abejas que sobreviven al invierno se encuentran más afectadas (Amdam *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta estos datos sobre la estacionalidad de las pérdidas de colmenas, junto con los resultados del impacto significativo del tratamiento en el segundo semestre del año, se podría recomendar un tratamiento antivarroa en otoño con el fin de eliminar los ácaros foréticos y reducir así la parasitación.

3.2.- Estudio epidemiológico de la varroosis en las colonias de abejas en las Islas Baleares

3.2.1.- Encuesta sobre la caracterización de la apicultura balear

En otoño de 2010 se muestrearon un total de 49 apiarios, de los cuales 39 procedían de Mallorca, 6 de Ibiza y 4 de Formentera. En primavera de 2011 se muestrearon un número menor de apiarios, en total 31, siendo 21 de Mallorca y 10 de Menorca, completando así la totalidad de islas mayores del archipiélago. Los apicultores de cada uno de los apiarios muestreados contestaron a la encuesta realizada, excepto en cinco casos, por lo que la información desglosada a continuación se extrae de las encuestas de 75 apicultores de Baleares, los cuales en algunos casos no contestaron a todas las preguntas realizadas.

Como puede apreciarse en la Figura 41, la mayoría de los **apiarios muestreados** presentaban un **número de colmenas** menor a 20 (61% de los apiarios), mientras que los apiarios semiprofesionales (con más de 50 colmenas) representaban el 10%, repartidos entre Mallorca y Menorca (Fig. 42).

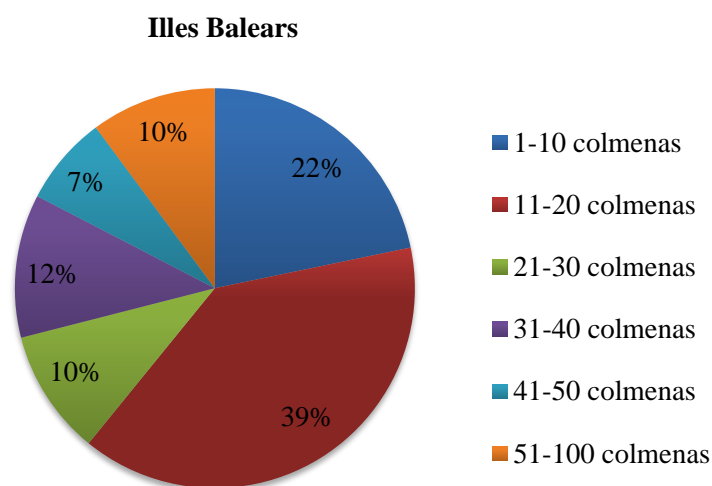


Fig. 41. Cantidad de colmenas presentes en los apiarios muestreados (%) en las Illes Balears. N= 69.

Estas proporciones varían en función de la isla muestreada (Fig. 42). Así, tanto en Mallorca como en Formentera aumenta el porcentaje de apiarios con un número de colmenas menor a 20, siendo del 100% en el caso de Formentera. Por otro lado, Menorca es la que presenta una mayor proporción de apiarios semiprofesionales, seguido de Mallorca.

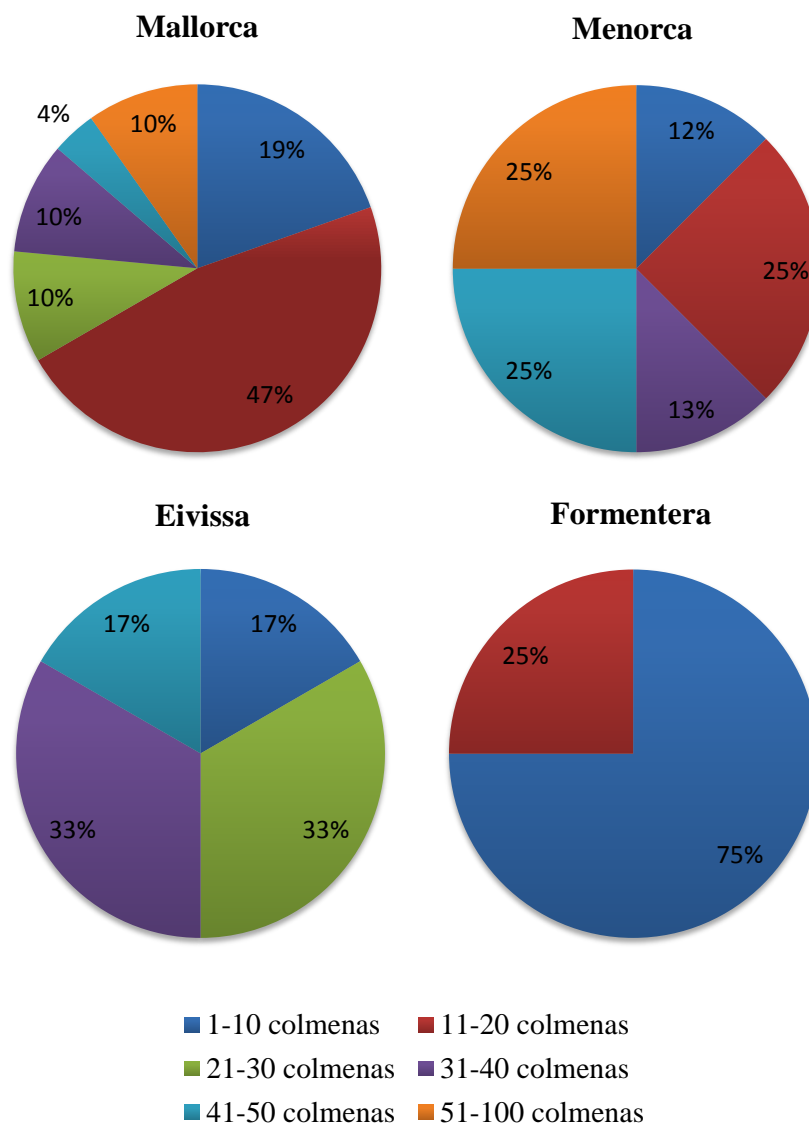


Fig. 42. Cantidad de colmenas presentes en los apiarios muestreados (%), representado por islas. Mallorca: n= 51; Menorca: n= 8; Eivissa: n= 6; Formentera: n= 4.

En las siguientes figuras se detalla la profesionalización del sector (Fig. 43 y 44). Como puede observarse en la Figura 43, la mayoría de los **apicultores** encuestados tenía menos de 50 colmenas (aficionados), un 32% tenía entre 51 y 150 colmenas (semiprofesional) y un 9% era profesional (con más 150 colmenas).

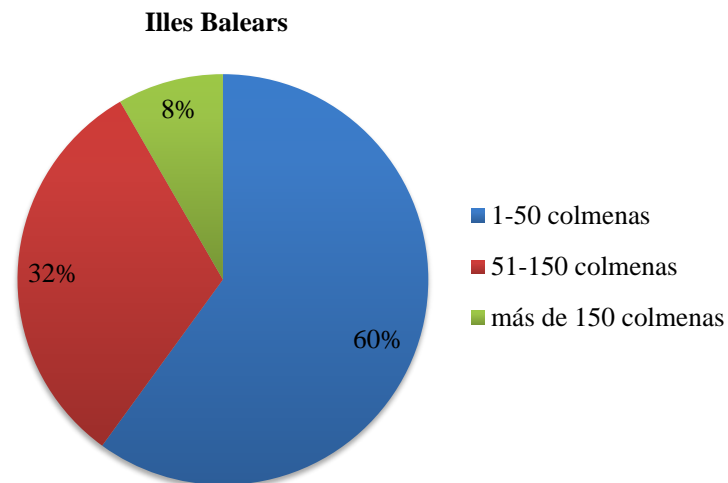


Fig. 43. Proporción de apicultores aficionados (1-50 colmenas), semiprofesionales (51-150 colmenas) y profesionales (más de 150 colmenas) en el conjunto de las Islas Baleares. N= 60.

En el caso de Menorca, la mayoría de los apicultores encuestados eran profesionales (62,5%), seguidos de los de Eivissa, cuya proporción era menor (40%), y los de Mallorca, donde resultaron ser minoritarios (representaban un 2% del total) (Fig. 44).

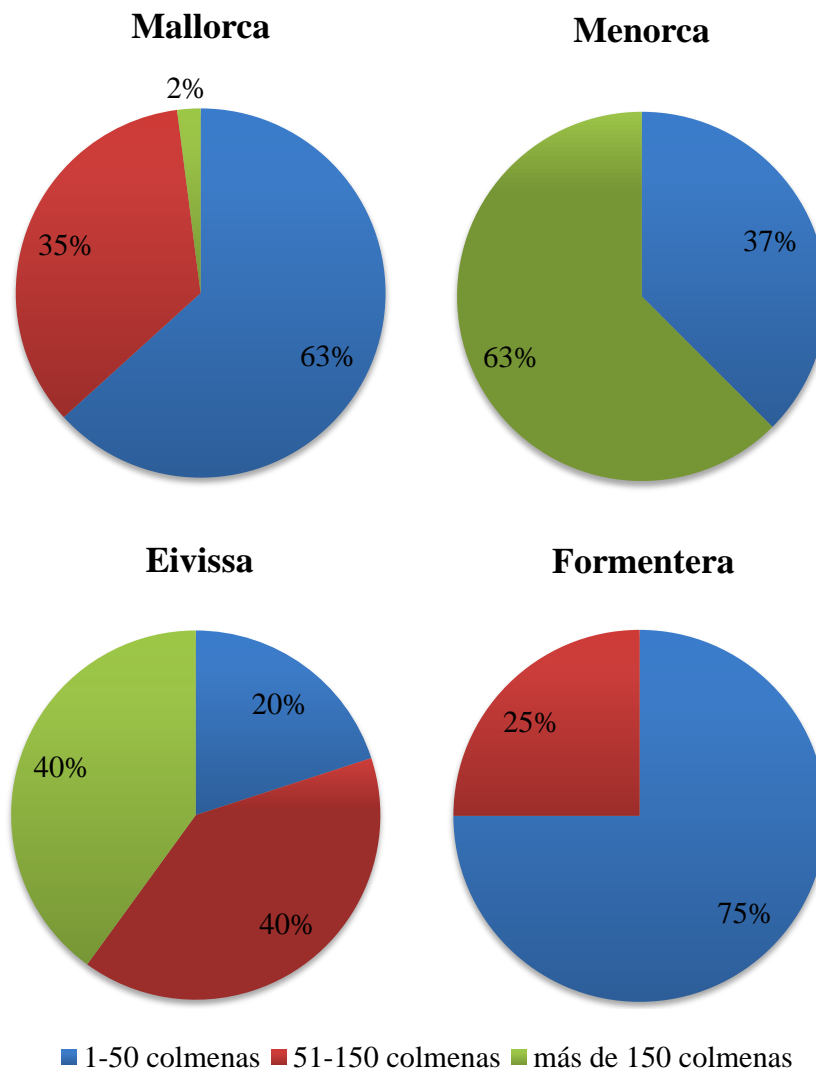


Fig. 44. Proporción de apicultores aficionados (1-50 colmenas), semiprofesionales (51-150 colmenas) y profesionales (más de 150 colmenas), representado por islas. Mallorca: n= 49; Menorca: n= 8; Eivissa: n= 5; Formentera: n= 4.

El 95,9% de los apiarios muestreados estaban formados mayoritariamente por **colmenas verticales (tipo Perfección y Dadant)** en las que el crecimiento a lo largo de la temporada apícola es vertical y se añaden alzas en la parte superior destinadas a la miel. En cambio, sólo el 22,9% de los apiarios muestreados presentaban al menos una **colmena horizontal (tipo Layens)**, que son aquellas en las que el crecimiento de la colmena a lo largo de la temporada apícola es horizontal, y son los cuadros de los extremos de la colmena los que se destinan a la miel. El 82,4% de los apiarios

presentaban colmenas tipo Perfección, que en algunos casos se combinaban con colmenas Dadant o Layens. Únicamente el 4% de los apiarios estaban formados exclusivamente por colmenas Layens (Fig. 45).

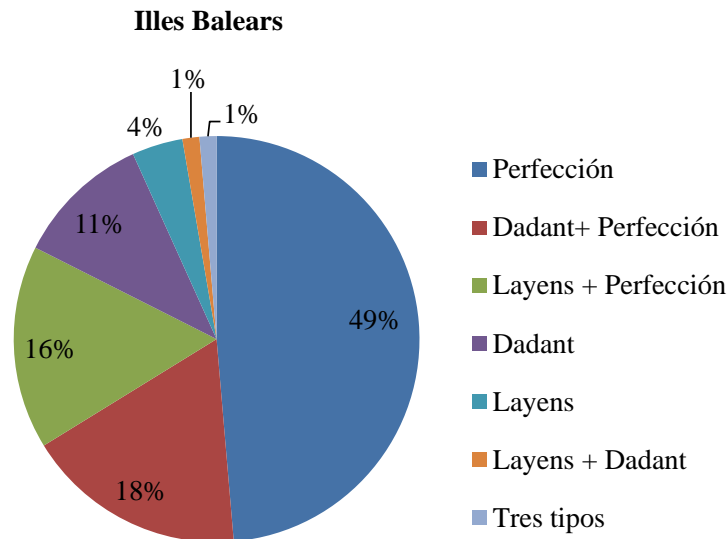


Fig. 45. Tipo de colmenas presentes en los apiarios muestreados (%) en las Illes Balears. N= 74.

Estas proporciones también se ven modificadas al desglosar la información por islas, excepto para Mallorca cuyas proporciones se mantienen similares a las globales (Fig. 46). Se observa una mayor inclinación por la colmena tipo Dadant en Menorca y Eivissa, mientras que en el caso de Formentera el 100% de las colmenas muestreadas fueron tipo Perfección.

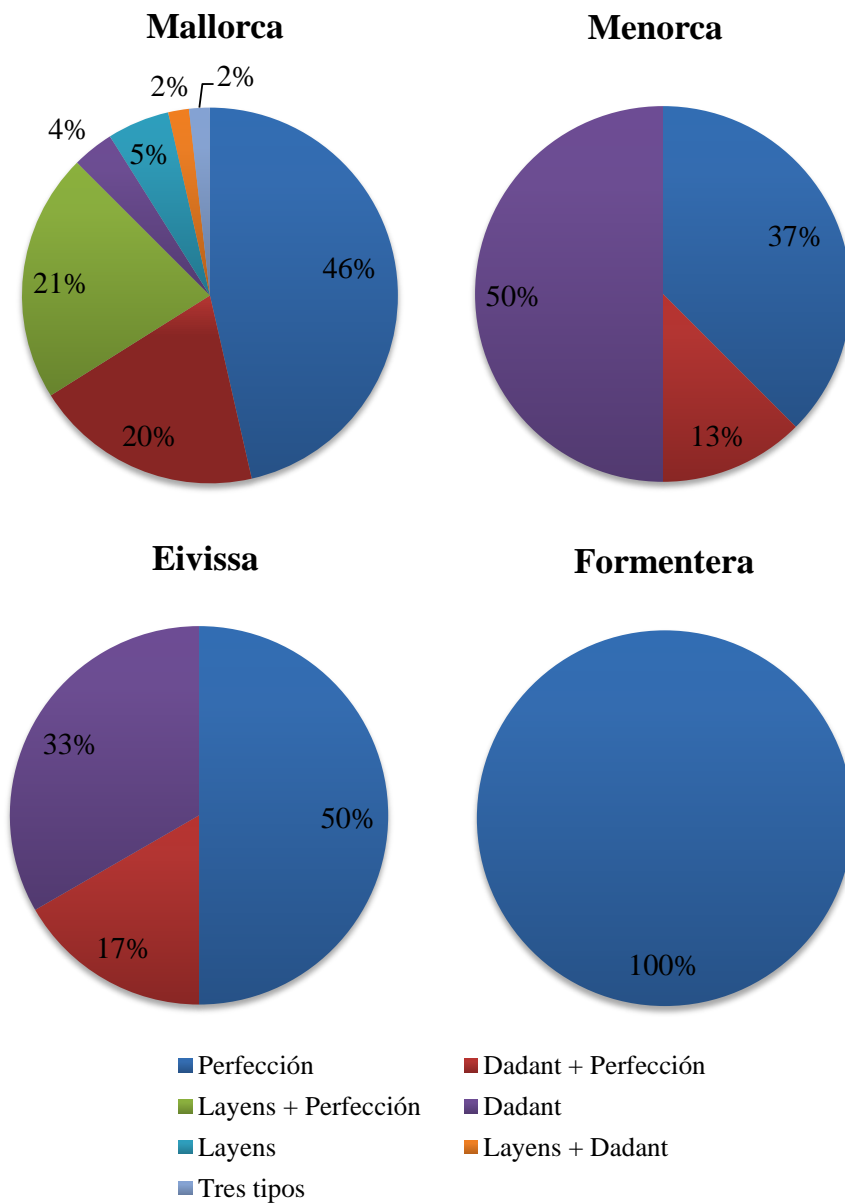


Fig. 46. Tipo de colmenas presentes en los apiarios muestreados (%), representado por islas. Mallorca: n= 56; Menorca: n= 8; Eivissa: n= 6; Formentera: n= 4.

Por otro lado, de entre los datos de **tratamientos antivarroa** aplicados (Fig. 47), destaca que el 10% de los apiarios no recibieron ningún tratamiento, mientras que el 57% fueron tratados una vez y el 33% dos veces al año.

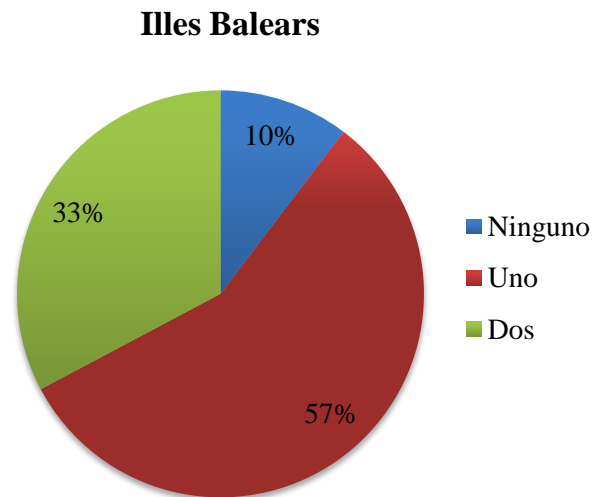


Fig. 47. Número de tratamientos antivarroa al año (%) en las Illes Balears. N= 58.

La Figura 48 revela que Mallorca es la única isla en la que hubo apicultores que no realizaron ningún tratamiento. Por otra parte, la proporción de apicultores que aplicó dos tratamientos al año fue mayor en Menorca (100%) con respecto al resto de islas.

Referente al **primer tratamiento anual** (Fig. 49), los productos veterinarios más usados fueron el Apivar (amitraz) usado en un 41% de los casos, el Apistán (fluvalinato) empleado en un 25% de los casos, y el Apiguard (timol) con un porcentaje del 20%. Otros productos aplicados en menor proporción fueron el ácido fórmico, Checkmite (usado únicamente en Menorca), humo de tabaco (usado exclusivamente en Mallorca) y Bayvarol (Flumetrina, solo en Menorca).

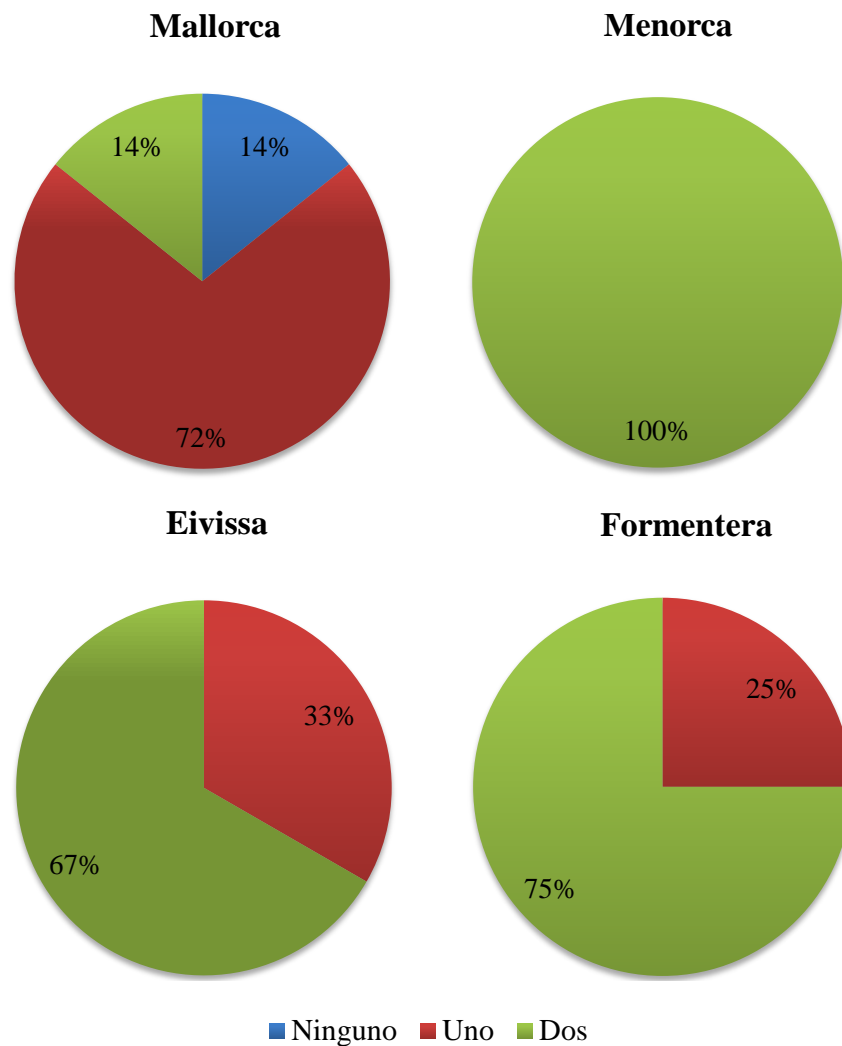


Fig. 48. Número de tratamientos antivarroa al año (%), representado por islas. Mallorca: n= 42; Menorca: n= 6; Eivissa: n= 6; Formentera: n= 4.

En referencia al **segundo tratamiento** anual, los productos mayoritarios se mantuvieron, pero las proporciones cambiaron (Fig. 50). La aplicación de Apiguard como segundo tratamiento aumentó (38%) en proporción al primer tratamiento anual, posicionándose como tratamiento mayoritario. En cambio, los tratamientos con Apivar y Apistán disminuyeron (31% y 23%, respectivamente). De la variedad de productos minoritarios usados en el primer tratamiento anual (ácido fórmico, Checkmite, tabaco y Bayvarol), sólo apareció el ácido fórmico en el segundo tratamiento anual.

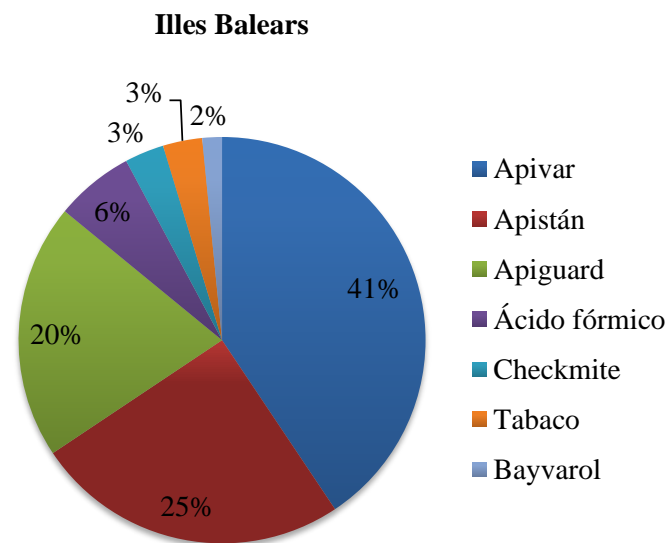


Fig. 49. Productos antivarroa usados durante el primer tratamiento anual en las Illes Balears. N= 64.

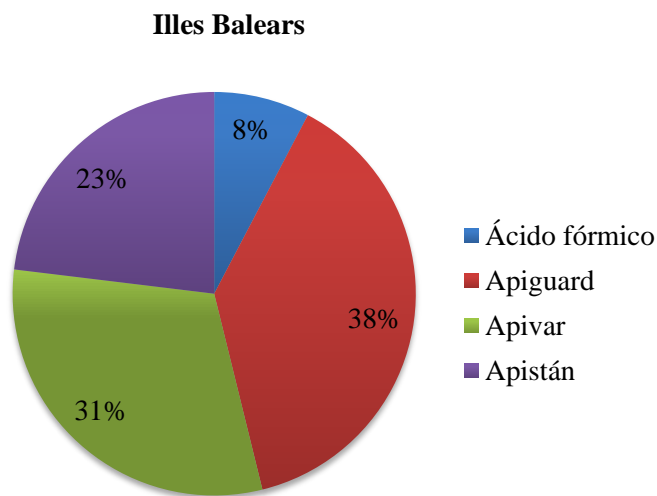


Fig. 50. Productos antivarroa usados durante el segundo tratamiento anual en las Illes Balears. N= 26.

En la Figura 51, puede apreciarse que de los tres tratamientos mayoritarios (Apivar, Apistán y Apiguard) el producto de origen orgánico (Apiguard, timol) únicamente se utilizó en Mallorca y Menorca (34,54% y 14,28% respectivamente). El uso de tabaco se limitó a Mallorca, mientras que el uso de ácido fórmico, Checkmite y

Bayvarol se restringió a Menorca. En Eivissa i Formentera se aplicaron exclusivamente tratamientos con productos químicos de síntesis (Apivar y Apistán).

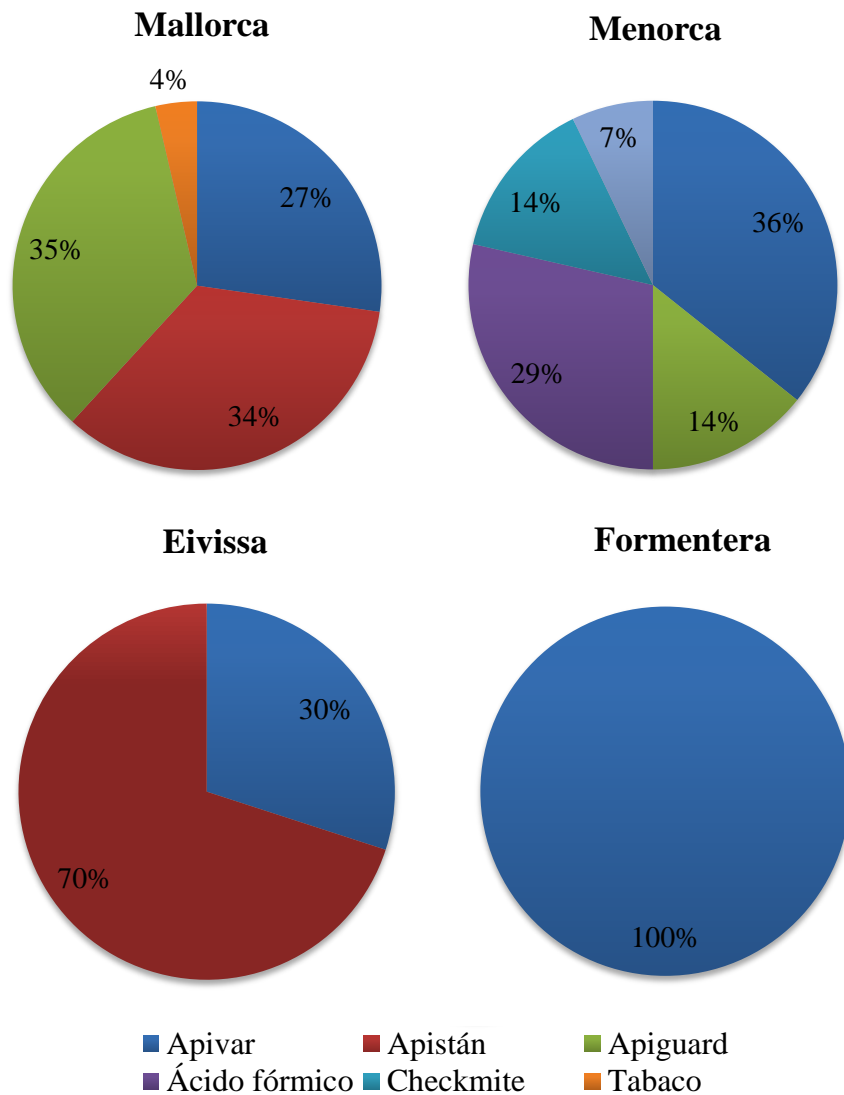


Fig. 51. Productos antivarroa usados en cada isla. Mallorca: n= 55; Menorca: n= 14; Eivissa: n= 10; Formentera: n= 6.

Las casas comerciales de estos productos antivarroa establecen la dosis y duración de los mismos. Así, en el caso de Apivar y Apistán se establece el uso de dos tiras del producto durante 6 semanas, mientras que para Apiguard se establece el uso de dos dosis del producto en un periodo de 4 semanas (si el producto no se ha evaporado

correctamente debe dejarse hasta su completa evaporación). En el caso de Bayvarol se usan 4 tiras del producto durante 6 semanas. Considerando estas prescripciones, el 76% de los tratamientos se aplicaron **correctamente**, frente al 24% de errores en la aplicación. Caso por caso, el 95% de los tratamientos con Apiguard se realizó correctamente, pero solo un 67,7% se aplicó correctamente en el caso del Apivar y un 70% en Apistán.

El análisis comparativo entre islas revela que Formentera es la isla con un mayor porcentaje de aplicaciones correctas, seguida de Mallorca (Tabla 15).

Tabla 15. Proporción de la aplicación correcta e incorrecta de los productos antivarroa en cada isla.

	Mallorca (n= 52 tratam.)	Menorca (n= 7 tratam.)	Eivissa (n= 10 tratam.)	Formentera (n= 6 tratam.)
Aplicación correcta	78,8	57,1	60	83,3
Aplicación incorrecta	21,2	42,9	40	16,7

Como puede apreciarse en la Figura 52, los apicultores que solo realizan un tratamiento escogen el **mes** de agosto para realizarlo (19% de los casos), seguido de los meses de febrero (14%), marzo (14%) y abril (14%). No hay por tanto ni una temporada ni un mes fijo para los tratamientos, lo que aumenta las posibilidades de un control ineficaz y/o desarrollo de resistencias. Este estudio revela asimismo que el 77,8% de los tratamientos antivarroa aplicados incumplen el anexo II del RD 608/06 por el que se establece que el tratamiento contra la varroosis se realizará en el período septiembre-noviembre.

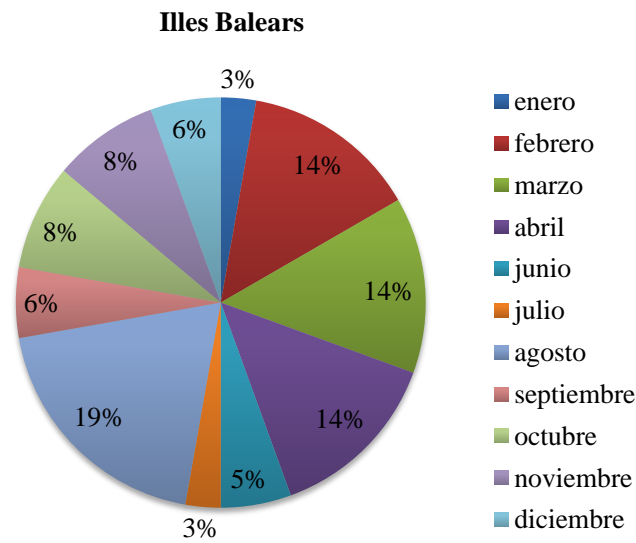


Fig. 52. Mes en el que se realiza la aplicación del tratamiento antivarroa en los casos en los que solo se efectúa una aplicación, en las Illes Balears. N= 36.

En el caso de que se apliquen dos tratamientos al año (Fig. 53), para el primer tratamiento anual se escogen los meses de agosto (26% de los casos) y octubre (26%), mientras que para el segundo tratamiento predomina febrero (20% de los casos), seguido de marzo (16%) y septiembre (16%).

De entre todos los apicultores encuestados, sólo tres de ellos indicaron que realizan **trashumancia** entre municipios, y siempre dentro de la isla de Mallorca.

Finalmente, en referencia a tratamientos para **otras enfermedades**, ningún apicultor trató para *Nosema* ni para ascosferosis, y tres apicultores de Mallorca detectaron la presencia de loque. Uno de ellos procedió a la eliminación de la colmena afectada y los dos restantes trataron con antibióticos (Terramicina, cuyo principio activo es la Oxitetraciclina, y Eritromicina. En ningún caso estos tratamientos aseguran la eliminación de la infección, ya que no tiene efecto sobre las esporas, y además supone un riesgo de residuos en la miel).

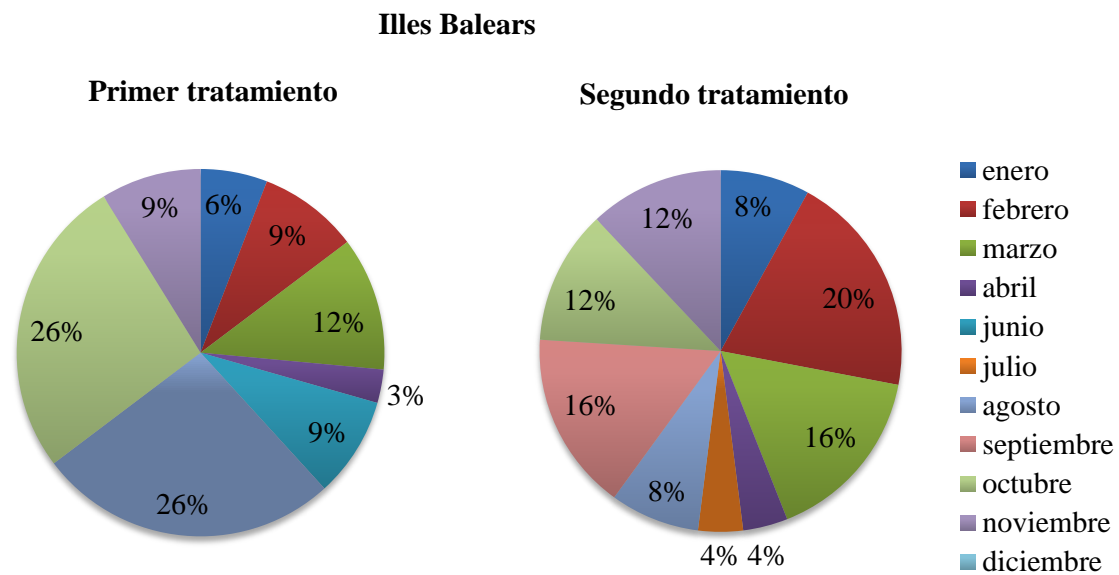


Fig. 53. Mes en el que se realiza la aplicación del tratamiento antivarroa en los casos en los que se efectúan dos aplicaciones, en las Illes Balears. Primer tratamiento: n= 34; segundo tratamiento: n= 25.

A modo de resumen, estos resultados indican la escasa presencia de apicultores profesionales en Baleares (sólo un 9% de los apicultores encuestados son profesionales, con más de 150 colmenas), que se caracteriza por un alto porcentaje de apicultores aficionados, pequeños o de autoconsumo (59% de los encuestados, con menos de 50 colmenas). Esto contrasta con el resto de España que presenta un 22,51% de apicultores profesionales y se sitúa como segundo país de la UE con más profesionalización del sector (MAGRAMA, 2014). Además cabe remarcar la baja proporción de apicultores que practican trashumancia, solo un 4% de los encuestados, a diferencia de las prácticas habituales de la zona centro y sur/sureste de España (MAGRAMA, 2014).

Por otro lado, destaca el hecho de que los tratamientos antivarroa no se ajusten a las indicaciones legales, lo que probablemente sea un reflejo del escaso nivel de profesionalización del sector. El 8% de los apicultores encuestados no realizó tratamiento antivarroa y de los que lo realizaron, el 24% lo aplicó incorrectamente (en dosis o tiempo de aplicación). Más del 30% de los tratamientos con Apivar y Apistán se aplicaron incorrectamente, dato a tener en cuenta a la hora de valorar una posible aparición de resistencias a dichos productos. Además, el 77,8% de los tratamientos se

aplicaron fuera del periodo establecido en el RD 608/06 por el que se establece y regula el Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel.

3.2.2.- Prevalencia y nivel de infestación

Los datos presentados a continuación se extraen del análisis de las muestras de **abejas adultas** obtenidas de 276 colmenas (216 de Mallorca, 36 de Eivissa y 24 de Formentera) en otoño de 2010 y 186 colmenas (126 de Mallorca y 60 de Menorca) en primavera de 2011. Los resultados se presentan en base al cálculo de los siguientes índices parasitarios:

- **Porcentaje de prevalencia (%P)** = (número de colmenas parasitadas / número total de colmenas muestreadas) * 100.

- **Porcentaje de tasa de infestación (%I)** = (número de ácaros / abeja) * 100.

- **Porcentaje de focalidad (%F)** = (número de apiarios parasitados / número total de apiarios muestreados) * 100.

Como puede observarse en la Tabla 16, el porcentaje de **prevalencia** fue más elevado en primavera que en otoño, mientras que el porcentaje de la **tasa de infestación** fue más bajo. Asimismo, este patrón se repite en las muestras de ambas temporadas de Mallorca (Tabla 17). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las temporadas de estudio.

Si se desglosan los resultados por **islas** (Tabla 17), los valores de cada uno de los parámetros calculados resultaron más elevados en Mallorca tanto en 2010 como en 2011, seguido de Menorca, que en primavera presentaba una prevalencia similar a la registrada en otoño en Mallorca. Por el contrario, los valores más reducidos de dichos parámetros se registraron en Formentera. Así, las Gimnesias fueron las islas con mayor prevalencia del parásito. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las islas en referencia a los datos de prevalencia. En cambio, la tasa de infestación de primavera de 2011 resultó estadísticamente diferente entre Mallorca y Menorca.

Tabla 16. Media y error estándar de los porcentajes de prevalencia (%P) y de la tasa de infestación (%I) en las muestras de abejas adultas, en otoño de 2010, primavera de 2011 y para el conjunto de las muestras (total). n= número de colmenas muestreadas.

	%P	%I
Otoño 2010 (n= 276)	34,78 ± 4,31	0,94 ± 0,21
Primavera 2011 (n= 186)	44,09 ± 5,42	0,77 ± 0,15
Total (n= 462)	38,53 ± 3,35	0,87 ± 0,14

Tabla 17. Media y error estándar de los porcentajes de prevalencia (%P) y de la tasa de infestación (%I) en las muestras de abejas adultas, en otoño de 2010 y primavera de 2011, por islas. n= número de colmenas muestreadas.

	%P	%I
Mallorca '10 (n= 216)	39,72 ± 4,91	1,13 ± 0,26
Eivissa '10 (n= 36)	19,44 ± 7,95	0,24 ± 0,12
Formentera '10 (n= 24)	13,00 ± 12,50	0,24 ± 0,24
Mallorca '11 (n= 126)	47,06 ± 6,08	0,61 ± 0,16
Menorca '11 (n= 60)	38,33 ± 10,26	1,11 ± 0,30

En cuanto a la distribución de la prevalencia e infestación del parásito por **regiones biogeográficas** de Mallorca (Tabla 18), en **otoño de 2010** cabe destacar que los valores más elevados de prevalencia se registraron en Llevant, seguido de la Serra de Tramuntana, Raiguer, Palma y Migjorn, mientras que los más reducidos se observaron en el Pla, siendo la mitad del valor máximo registrado en Llevant. Por otro lado, las tasas de infestación media más elevadas se observaron en Palma, mientras que las tasas de infestación media más bajas se registraron en Migjorn. Referente a las muestras de Eivissa, la zona de la Serra Grossa presenta una menor presencia del parásito. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 18. Media y error estándar de los porcentajes de prevalencia (%P) y de la tasa de infestación (%I) en las muestras de abejas adultas de otoño de 2010, por regiones biogeográficas. n= número de colmenas muestreadas.

		%P	%I
Mallorca '10	Serra Tramuntana (n= 72)	46,94 ± 9,27	1,18 ± 0,32
	Raiguer (n= 42)	45,23 ± 12,45	1,41 ± 0,89
	Pla de Mallorca (n= 24)	25,00 ± 0,76	0,52 ± 0,22
	Migjorn (n= 36)	30,55 ± 7,95	0,38 ± 0,20
	Llevant (n= 12)	50,00 ± 0	1,12 ± 0,23
	Palma (n= 30)	33,33 ± 18,26	2,05 ± 1,20
Eivissa '10	Serra Grossa (n= 6)	16,66	0,04
	Pla d'Eivissa (n= 30)	20,00 ± 9,72	0,28 ± 0,14

En las Figuras 54 y 55 se muestran los promedios de la prevalencia y de la tasa de infestación media distribuidos por **municipios**, observados en **otoño de 2010**, lo que permite detectar las diferencias existentes dentro de las zonas biogeográficas.

De este modo, aunque la zona de Llevant sea la que presentó el valor promedio de prevalencia más elevado (50%, Tabla 18), fue en el municipio de Escorca (Serra de Tramuntana, Mallorca) en el que se observó un valor de prevalencia más elevado (el 100% de las colmenas estaban parasitadas por *Varroa*, Fig. 54). Los valores más bajos se detectaron en Sant Antoni de Eivissa y en las localidades de Andratx (Tramuntana) y Petra (Pla).

El valor promedio de la tasa de infestación más elevado se observó en el municipio de Santa Maria (es Raiguer) (Fig. 55), en donde uno de los apiarios muestreados registró una tasa de infestación media del 6,49%.

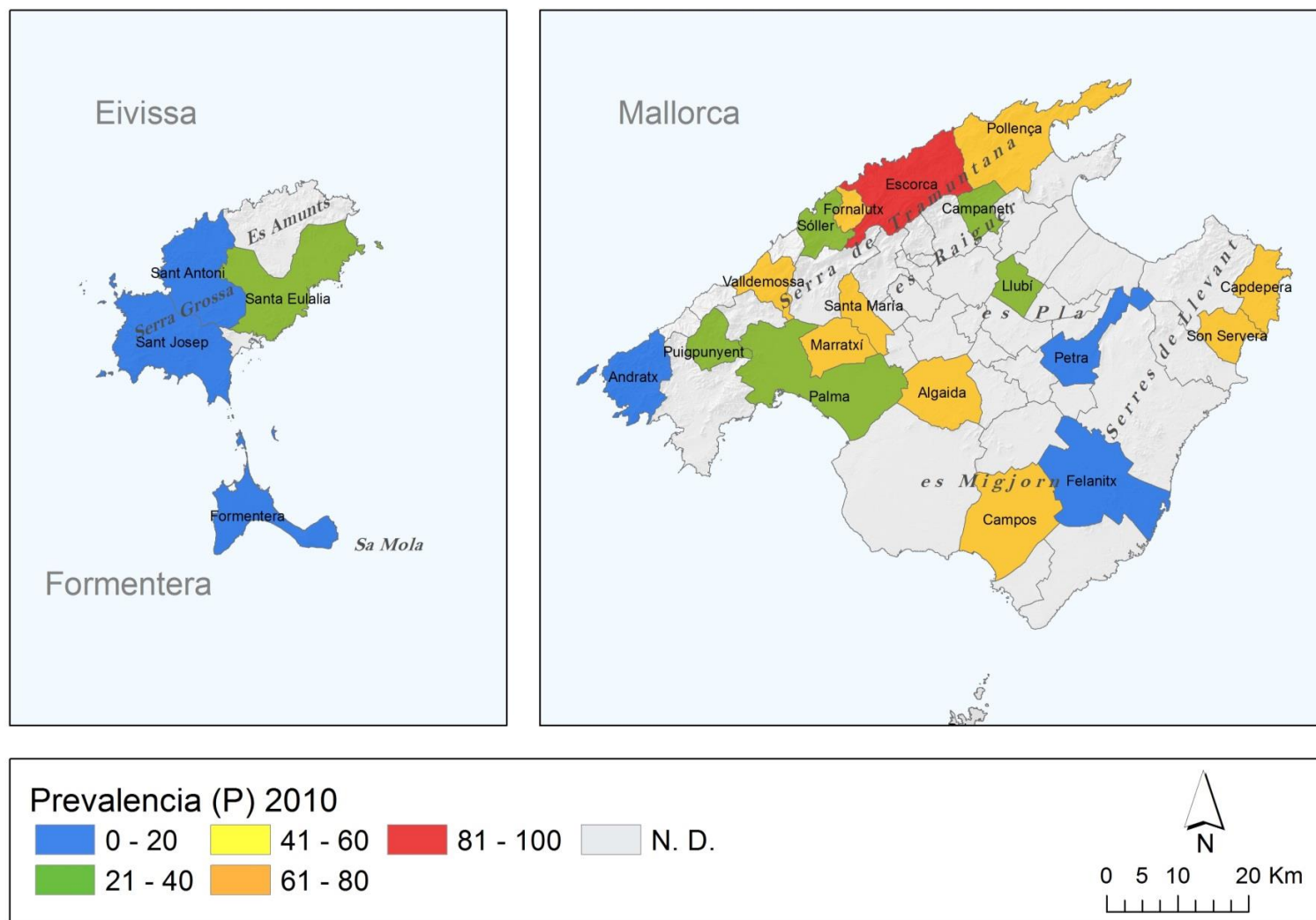


Fig. 54. Mapa de distribución del promedio de la prevalencia de *Varroa* (%) por municipios, en otoño de 2010, en Mallorca, Eivissa y Formentera.

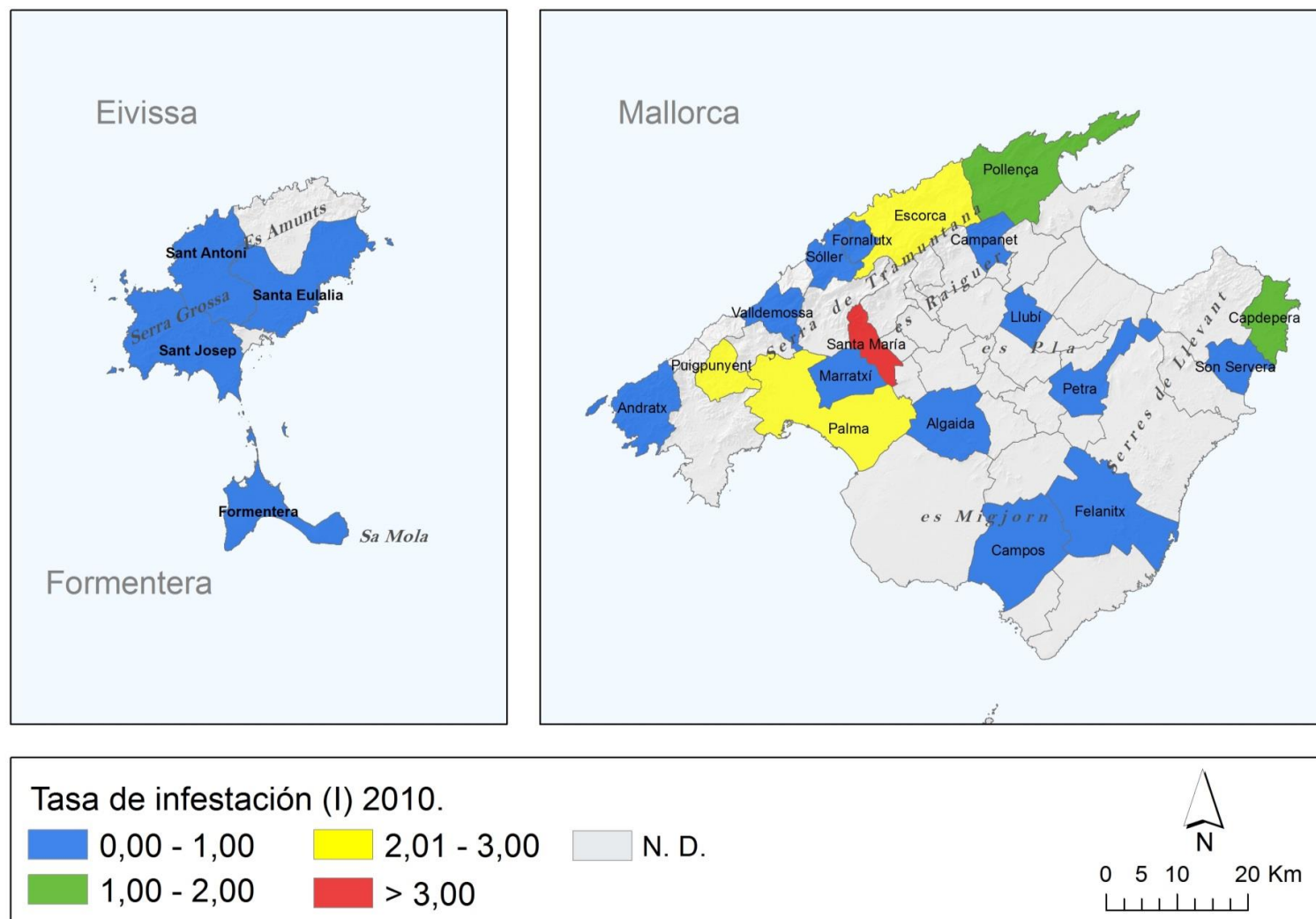


Fig. 55. Mapa de distribución del promedio de la tasa de infestación de *Varroa* (%) por municipios, en otoño de 2010, en Mallorca, Eivissa y Formentera.

La distribución por **regiones** de los resultados obtenidos en **primavera de 2011** se presenta a continuación (Tabla 19). La zona del Pla volvió a ser la que presentó una menor prevalencia, en cambio el valor más elevado tanto de prevalencia como de infestación se observó en el Raiguer. El valor más bajo de infestación media se observó en el Pla. Aunque únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el parámetro de prevalencia entre la zona de la Serra de Tramuntana y el Raiguer ($p=0,024$). Además, en el 100% de los apiarios muestreados en Raiguer y Palma se detectó el ácaro.

Tabla 19. Media y error estándar de los porcentajes de prevalencia (%P) y de la tasa de infestación (%I) en las muestras de abejas adultas de primavera de 2011, por regiones biogeográficas. n= número de colmenas muestreadas.

		%P	%I
Mallorca '11	Serra Tramuntana (n= 54)	34,81 ± 10,35	0,40 ± 0,15
	Raiguer (n= 48)	65,63 ± 6,76	0,94 ± 0,36
	Pla (n= 6)	16,67	0,12
	Migjorn (n= 6)	50,00	0,42
	Palma (n= 12)	41,67 ± 8,33	0,58 ± 0,29

Asimismo, en las Figuras 56 y 57 se muestran los promedios de la prevalencia y de la tasa de infestación media distribuidos por **municipios**, observados en **primavera de 2011**, permitiendo así detectar las diferencias existentes dentro de las zonas biogeográficas. En cuanto a la prevalencia por municipios (Fig. 56), el valor promedio más elevado se detectó en Campanet (83,33%, Raiguer), mientras que los más bajos se registraron en Puigpunyent (16,67%, Serra de Tramuntana) y Llubí (16,67%, Pla) de Mallorca, y en Maó de Menorca (en ninguna colmena muestreada se detectó el parásito). Además observa que los valores promedio de la tasa de infestación más elevados se observaron en Menorca (Fig. 57). En el municipio de Alaior se observó un valor promedio de infestación más elevado (2,10%).

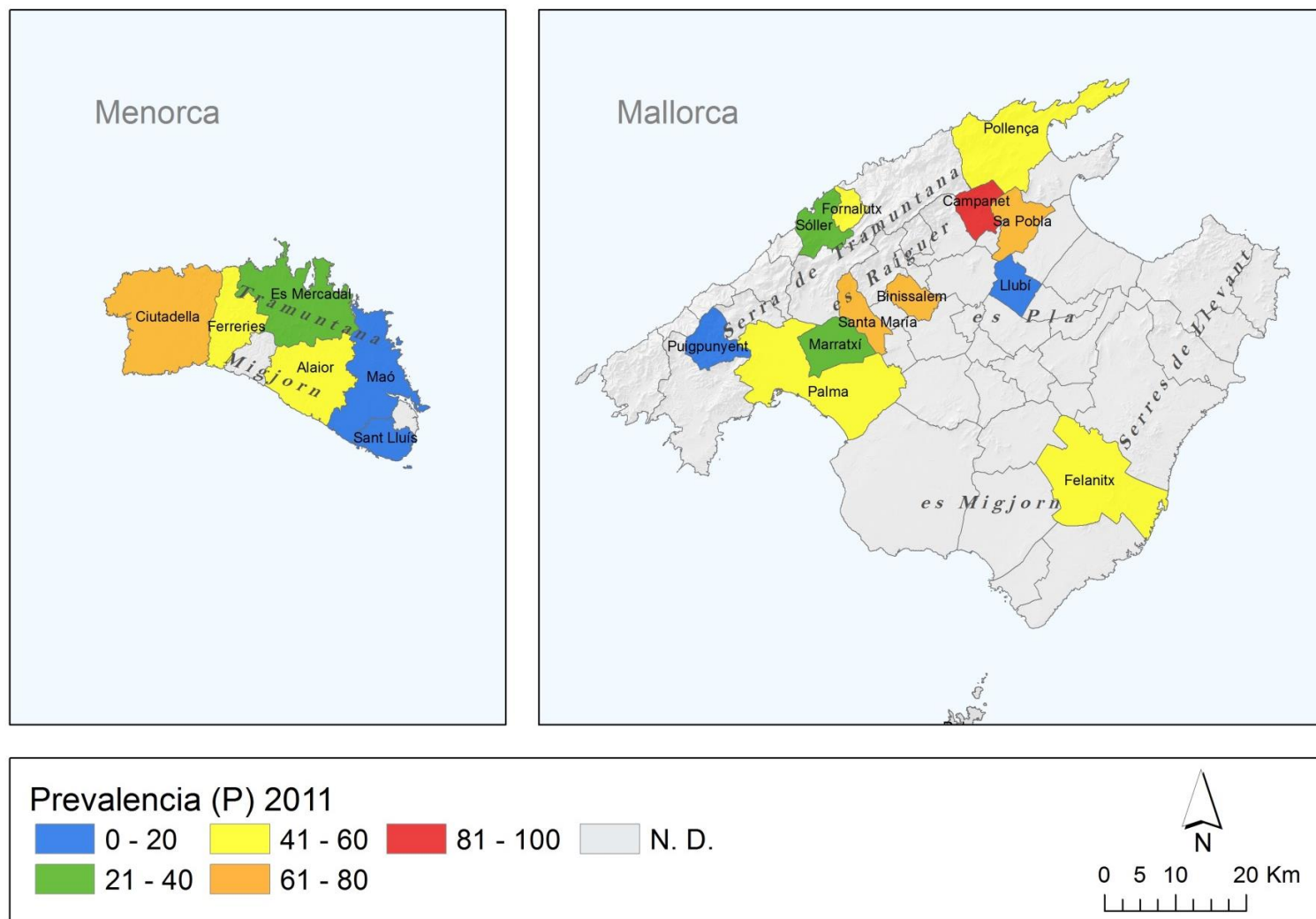


Fig. 56. Mapa de distribución del promedio de la prevalencia de *Varroa* (%) por municipios, en primavera de 2011, en Mallorca y Menorca.

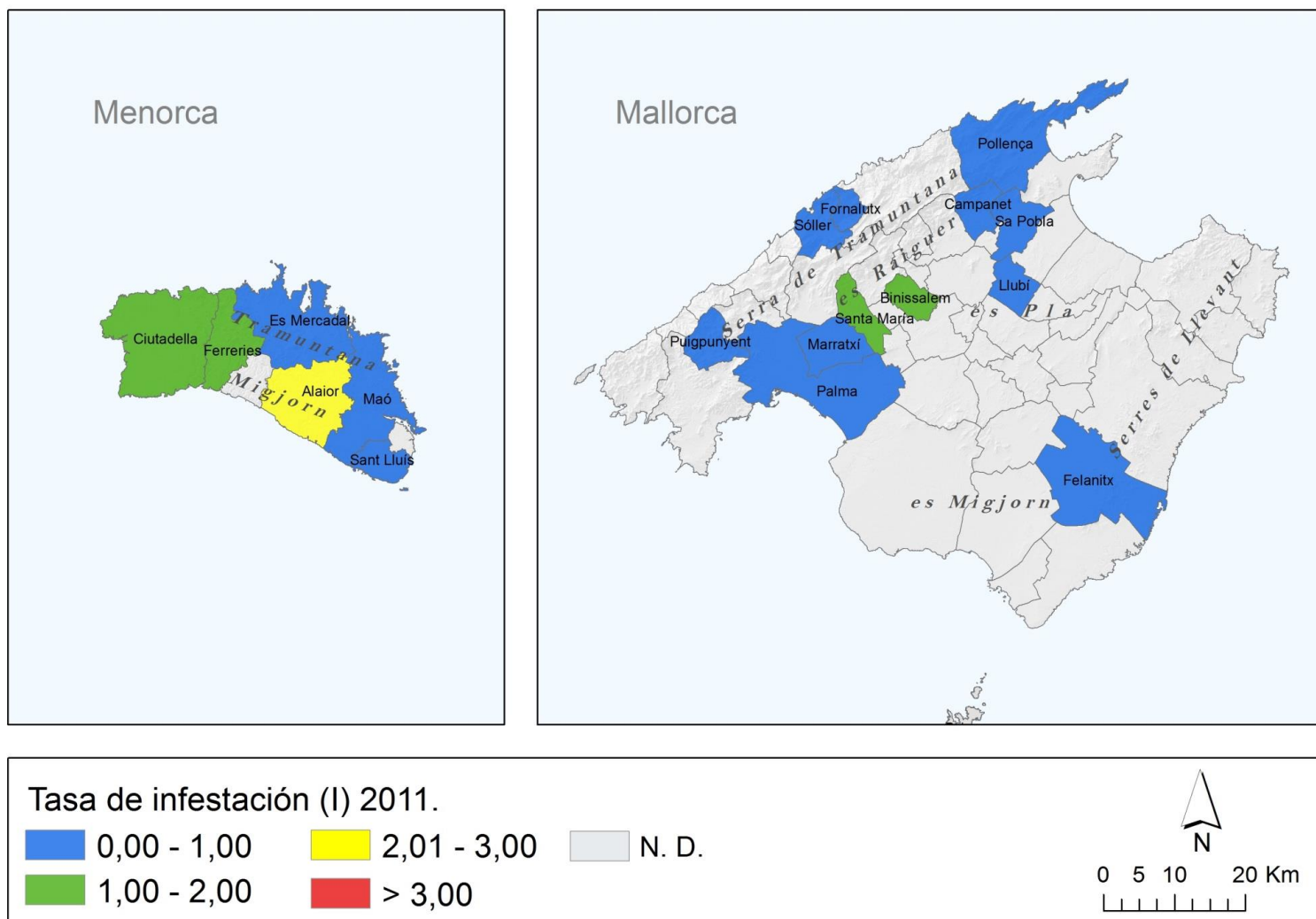


Fig. 57. Mapa de distribución del promedio de la tasa de infestación de *Varroa* (%) por municipios, en primavera de 2011, en Mallorca y Menorca.

Al compilar la información de la **prevalencia** de las cuatro islas, promediando los datos de las dos temporadas muestreadas en Mallorca, se obtiene el siguiente mapa (Fig. 58), en el cual se observa la prevalencia por municipios. Se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de Mallorca y Formentera ($p= 0,047$), y entre las regiones del Raiguer i el Pla de Mallorca ($p= 0,030$), evidenciando la marcada distancia entre las prevalencias de estas zonas, lo que ya se había sido comentado anteriormente.

Por otro lado, atendiendo a la **prevalencia** de las muestras, se han clasificado los valores obtenidos en 7 **niveles** (Tabla 20). El nivel 1 se caracteriza por presentar 1 colmena parasitada por *Varroa* de las 6 muestreadas por apiario. El nivel 2 presenta 2 colmenas parasitadas, y así sucesivamente. En el nivel 6 todas las colmenas presentes en el apiario estaban parasitadas, mientras que en el nivel 0 ninguna de las colmenas estaba parasitada. El 80,4% de los apiarios muestreados en otoño de 2010 presentaban la mitad o menos de las colmenas parasitadas (niveles entre 0 y 3), aproximadamente un 15% más que en primavera de 2011.

Tabla 20. Número de apiarios con todas las colmenas negativas a *Varroa* (Nivel 0), con nivel 1 (1 colmena de las 6 muestreadas por apiario parasitada por *Varroa*), nivel 2 (2 colmenas parasitadas de 6), nivel 3 (3/6), nivel 4 (4/6), nivel 5 (5/6) y nivel 6 (todas las colmenas del apiario parasitadas por *Varroa*), en otoño de 2010 y primavera de 2011.

	Otoño 2010	Primavera 2011
Nivel 0 (0/6)	11	5
Nivel 1 (1/6)	8	4
Nivel 2 (2/6)	10	4
Nivel 3 (3/6)	8	8
Nivel 4 (4/6)	3	4
Nivel 5 (5/6)	4	5
Nivel 6(6/6)	2	1

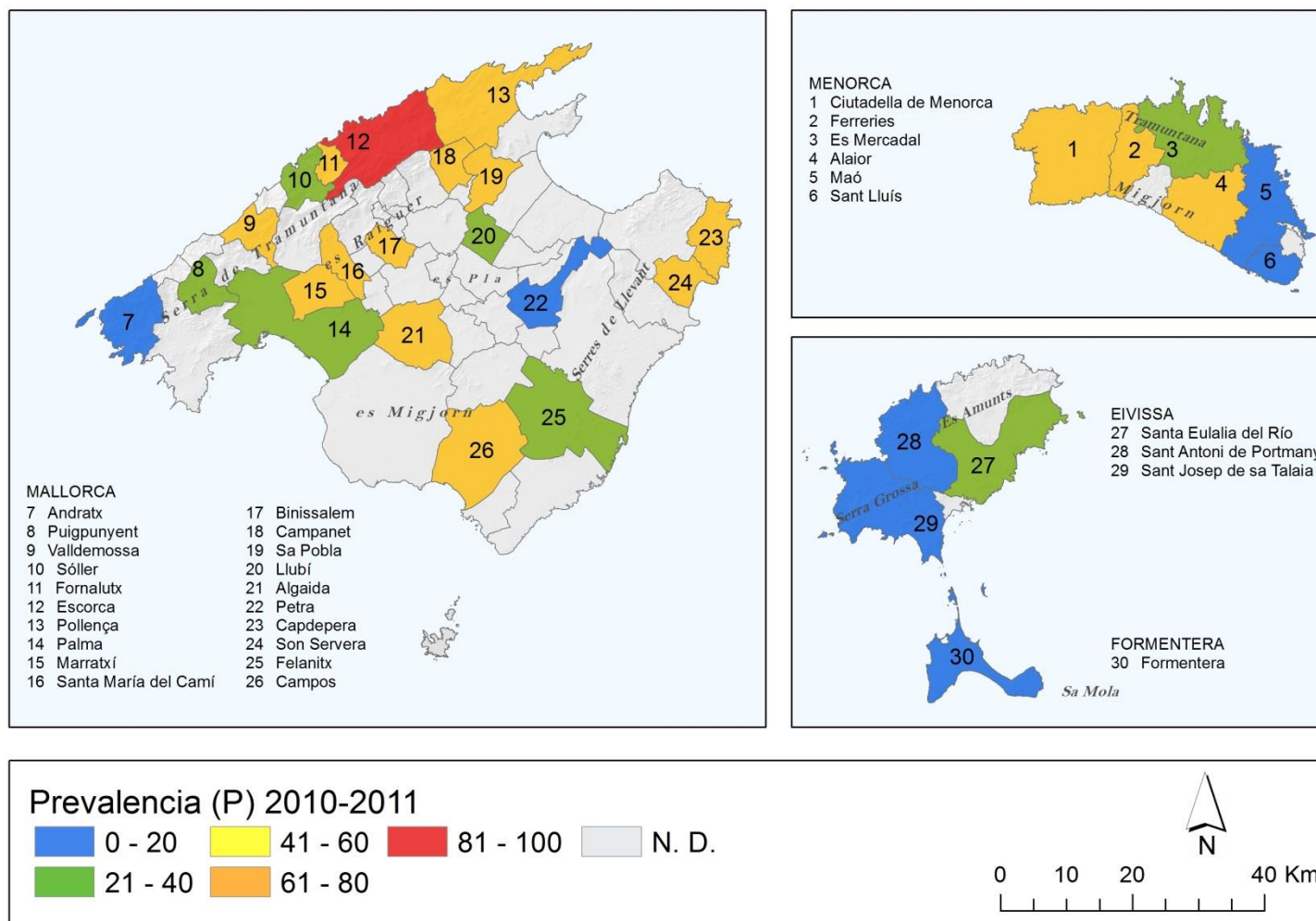


Fig. 58. Mapa de distribución del promedio de la prevalencia de *Varroa* (%) por municipios, de los años 2010 y 2011, en el conjunto de Baleares.

Al compilar la información de la **tasa de infestación** de *Varroa* de las cuatro islas, promediando los datos de las dos temporadas muestreadas en Mallorca, se obtiene el mapa que puede apreciarse en la Fig. 59, en el cual se observa la tasa de infestación por municipios. No se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de las islas, ni entre las regiones de Mallorca, mostrando únicamente tres municipios de las Gimnesias en los que la tasa de infestación fue superior al 2% (Escorca y Sta. María en Mallorca y Alaior en Menorca).

Siguiendo la clasificación elaborada por Calatayud (2008), y que es la usada por el MAGRAMA, sobre el **grado de infestación** de las colmenas (Tabla 21), el promedio de las tasas de infestación fue muy ligero (0-1% I) en ambas temporadas. El promedio de la MI de otoño se catalogaría como una infestación media (3-8% I), mientras que el promedio de la MI de primavera sería ligero (0-3% I). Hay que tener en cuenta que Calatayud y Verdú, (1992) describieron que en condiciones mediterráneas una tasa de infestación mayor al 10% en febrero-marzo en colonias no tratadas supone una pérdida irreversible de la colonia.

Tabla 21. Número de apiarios cuyas colmenas presentan porcentajes de tasas de infestación media (%I) e infestación máxima (%MI) muy ligeros, ligeros, medios, moderados o graves, en otoño de 2010 y primavera de 2011.

	Otoño 2010		Primavera 2011	
	%I	%MI	%I	%MI
Muy ligero (I entre 0-1%)	35	17	23	13
Ligero (I entre 1,01-3%)	7	14	8	9
Medio (I entre 3,01-8%)	4	10	0	6
Moderado (I entre 8,01-15%)	0	2	0	3
Grave (I > 15%)	0	3	0	0

De este modo, en otoño de 2010 el 91,3% de los apiarios presentaban una tasa de infestación media muy ligera o ligera, frente al 100% de los apiarios muestreados en

2011. Por otra parte, en otoño de 2010 se contabilizaron 3 apiarios de Mallorca con una tasa máxima de infestación grave, frente a ningún apiario en esa situación en primavera de 2011. El grado mayor de %MI en primavera de 2011 fue moderado, presentándose en 3 apiarios (1 localizado en Mallorca y 2 en Menorca).

Asimismo, durante el periodo de otoño de 2010, el valor absoluto más elevado de infestación máxima fue 21,73% (calificado como grave), observado en el municipio de Palma (Mallorca), mientras que en primavera de 2011 el valor máximo fue 10% (moderado) en Alaior (Menorca).

De los resultados obtenidos sobre la prevalencia y las tasas de infestación se extrae que la prevalencia fue mayor en primavera, en comparación con otoño. Sin embargo las tasas de infestación fueron menores, presumiblemente debido a que la población de abejas incrementó durante la primavera, disminuyendo así el ratio ácaro/abeja (que es el %I). Nuestros datos concordarían con los obtenidos por Marcangeli *et al.* (1992), cuyos estudios mostraron que durante los meses de otoño el número de ácaros disminuye, pero aumenta la tasa de infestación.

Las prevalencias observadas concuerdan con los resultados obtenidos por Higes *et al.* (2010) en la Península Ibérica, que registraron una prevalencia de 32,70% en otoño (frente al 34,78% de Baleares). Por otro lado, estos resultados son más bajos que los observados en climas más fríos, como Polonia (Pohorecka *et al.*, 2011), Canadá (Guzman-Novoa *et al.*, 2010) y Finlandia (Varis *et al.*, 1992). Esos resultados corroboran los estudios de Moretto *et al.* (1991), que muestran que los ratios de infestación son mayores en regiones más frías. Asimismo, la tasa de infestación del ácaro obtenida en Baleares es más elevada que la encontrada en regiones tropicales, lo que coincide con los estudios que muestran que el crecimiento poblacional es menor en esas regiones (Moretto *et al.*, 1991; Eguaras *et al.*, 1994; Rosenkranz *et al.*, 2010).

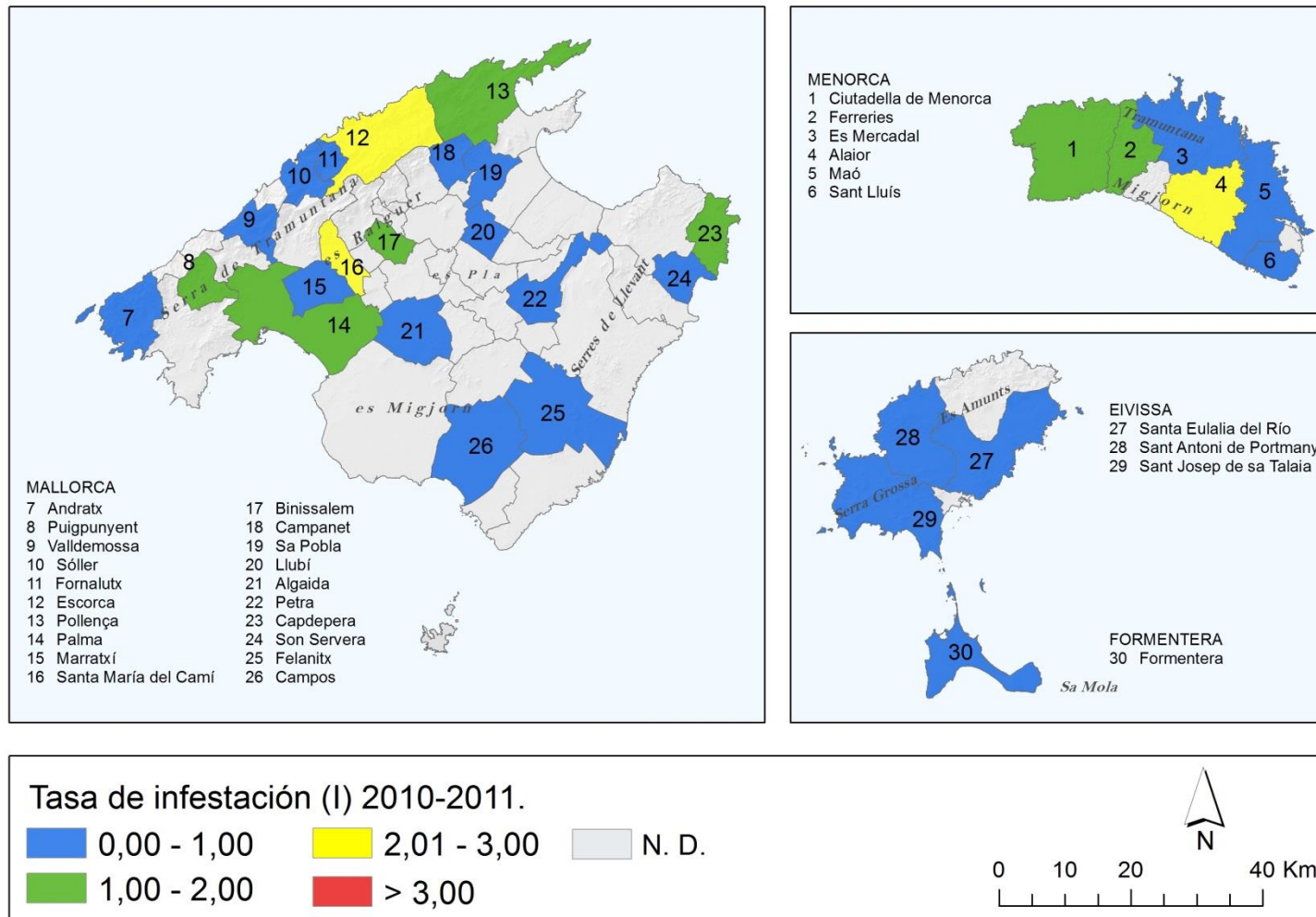


Fig. 59. Mapa de distribución del promedio de la tasa de infestación de *Varroa* (%) por municipios, de los años 2010 y 2011, en el conjunto de Baleares.

El porcentaje de **focalidad**, que nos indica el porcentaje de apiarios parasitados respecto al total de apiarios muestreados, se pudo calcular a partir del análisis conjunto de las **muestras de abejas adultas y de cría** (Tabla 22). El porcentaje de focalidad fue más elevado en primavera que en otoño. Este patrón se repite en las muestras de ambas temporadas de Mallorca (Tabla 23).

Tabla 22. Porcentaje de focalidad (%F) en las muestras de abejas adultas y de cría, en otoño de 2010, primavera de 2011 y para el conjunto de las muestras (total). n= número de apiarios muestreados.

	%F
Otoño 2010 (n= 46)	82,61
Primavera 2011 (n= 31)	87,10
Total (n= 77)	84,41

Si se desglosan los resultados por islas (Tabla 23), los valores resultaron más elevados en Mallorca tanto en 2010 como en 2011, seguido de Eivissa y Menorca. Los valores más reducidos se registraron en Formentera.

En el muestreo de 2010, en el 100% de los apiarios muestreados en Raiguer, Migjorn y Llevant se detectó la presencia del ácaro. La zona que presentó una menor focalidad del ácaro fue Palma, seguida del Pla y de la Serra de Tramuntana.

En el muestreo de 2011, el Raiguer se mantuvo con el 100% de focalidad, la zona de Palma aumentó hasta el 100%. En este caso, la Serra de Tramuntana fue la que mostró una focalidad más reducida.

Tabla 23. Porcentaje de focalidad (%F) en las muestras de abejas adultas y de cría de otoño de 2010 y primavera de 2011, por islas y regiones biogeográficas. n= número de apiarios muestreados.

		%F
Mallorca '10	Serra de Tramuntana (n= 12)	83,30
	Raiguer (n= 7)	100,00
	Pla, Mallorca (n= 4)	75,00
	Migjorn (n= 6)	100,00
	Llevant (n= 2)	100,00
	Palma (n= 5)	60,00
Mallorca '10 (n= 36)		86,11
Eivissa '10 (n= 6)		83,33
Formentera '10 (n= 4)		50,00
Mallorca '11	Serra de Tramuntana (n= 9)	88,88
	Raiguer (n= 8)	100,00
	Pla, Mallorca (n= 1)	- *
	Migjorn (n= 1)	- *
	Palma (n= 2)	100,00
Mallorca '11 (n= 21)		95,24
Menorca '11 (n= 10)		70,00

* Solo hay un apiario en la zona, por lo que no se puede calcular la focalidad.

La distribución estadística del número de colonias por apiario parasitadas por *Varroa* se comparó con una **distribución Poisson**, para determinar si la presencia del ácaro en un apiario ocurre independiente y uniformemente entre las colmenas o si, por el contrario, se ve influida por el estado de las otras colmenas del apiario como consecuencia de la proximidad entre ellas. En este último caso se observaría una distribución por grupos, es decir, un grupo de apiarios presentaría una elevada incidencia y otro grupo no presentaría el parásito en su apiario.

Si procesamos los resultados obtenidos en Mallorca, a partir del valor de la media (2,5 colmenas con *Varroa* por apiario) se pueden calcular los valores de la distribución Poisson esperados y compararlos con los valores observados (Fig. 60). Al ajustar los resultados obtenidos de la distribución del número de colonias con *Varroa* por apiario con los esperados se observa que se ajusta a una distribución Poisson, siendo el coeficiente de correlación entre los valores esperados y observados 0,88.

Por otro lado, en el caso de Baleares el número de colonias parasitadas por *Varroa* no se ajusta tan claramente a una Poisson (el coeficiente de correlación entre los valores esperados y observados es 0,63). En esta distribución destaca el pico de apiarios cuyas colonias no están parasitadas (Fig. 60). Once de los dieciséis apiarios que no están parasitados por el ácaro están localizados en las islas pequeñas (Menorca, Ibiza y Formentera) y en el valle de Sóller (Mallorca).

Los resultados obtenidos en Mallorca concuerdan con los resultados obtenidos en los apiarios de Turquía por Cakmak *et al.* (2003), quienes concluyeron que este patrón de distribución es el esperado de una enfermedad endémica típica de un hospedador generalizado, más que de una enfermedad epidémica típica de un parásito altamente contagioso, lo que se había descrito anteriormente (Finley *et al.*, 1996).

Algunos factores que podrían haber contribuido al desarrollo de una situación epidemiológica endémica podrían ser el aislamiento de las poblaciones (más acusado en las islas pequeñas), el bajo número de colmenas que maneja cada apicultor (el 60% de apicultores encuestados tiene menos de 20 colmenas) y el hecho de que la mayoría de apicultores incrementen el número de colonias en base a enjambres naturales (en lugar de obtener las colonias procedentes de otros lugares). Estos factores citados junto con la influencia de los factores climáticos de temperatura y humedad (Le Conte y Arnold, 1987; Le Conte y Arnold, 1988; Patzold y Ritter, 1989; Moretto *et al.*, 1991; Rosenkranz y Engels, 1994; Kraus y Velthuis, 1997; Harris *et al.*, 2003) podría contribuir a la baja incidencia del parásito en Baleares, pudiendo explicar el pico de apiarios en los que no se encuentra el ácaro y el elevado porcentaje de colmenas no parasitadas (65,22% en otoño y 55,91% en primavera).

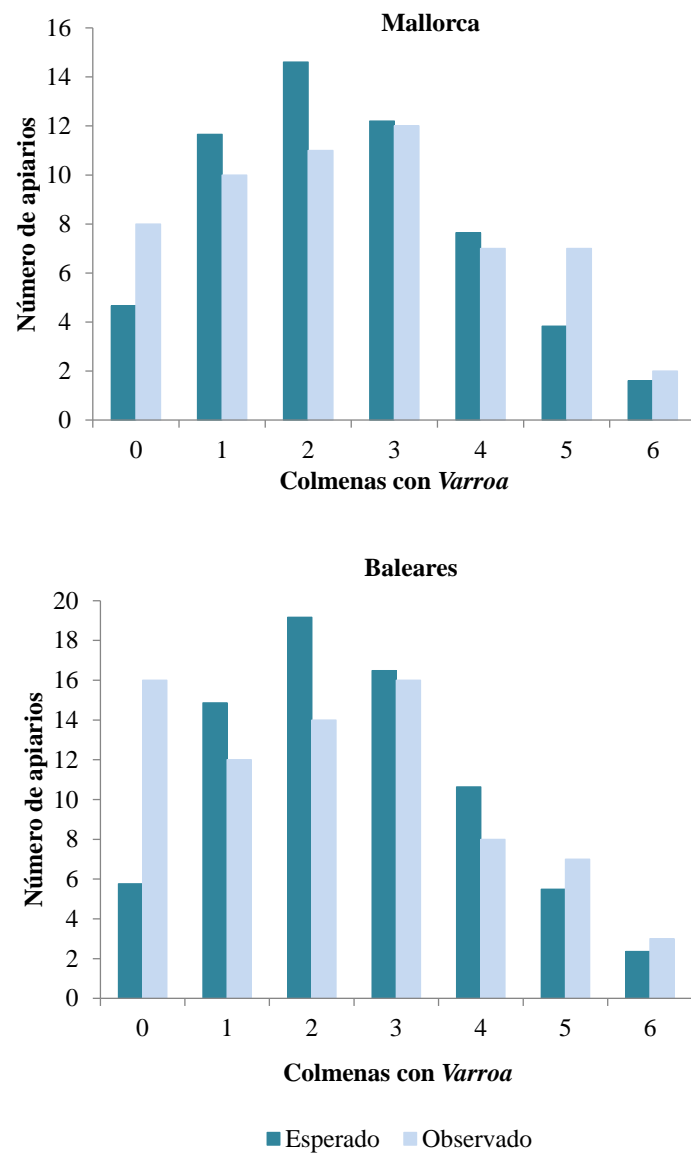


Fig. 60. Número de colmenas con *Varroa* por apiario en las muestras de Mallorca y Baleares.

3.3.- Evaluación de la eficacia de acaricidas en el control de *V. destructor*⁵

En este apartado se analizan los resultados obtenidos de los ensayos sobre la eficacia acaricida de tres productos antivarroa: Apivar (AV), Apiguard (AG) y BeeVital (BV). Apivar y Apiguard se encuentran entre los tres productos más usados en Baleares (el tercero es Apistán), en cambio BeeVital es un producto de uso minoritario en las islas.

Cabe destacar que el presente trabajo es el primero que se lleva a cabo en Baleares con la finalidad de evaluar la eficacia de tratamientos antivarroa usados comúnmente en diferentes momentos del año.

3.3.1.- Primer ensayo: primavera 2010

En la Tabla 24 se muestran las medias y errores estándar de los **ácaros caídos al fondo de la colmena** en cada una de las semanas estudiadas para cada grupo del ensayo realizado en primavera de 2010. El número total de ácaros muestreados fue de 4710 (2089 en el grupo control, 1082 en el grupo tratado con Apivar y 1539 en grupo tratado con Apiguard). Aunque el grado de infestación entre las colonias estudiadas era diferente al inicio del experimento, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. En la semana posterior a la finalización del tratamiento el número de ácaros muestreados en el grupo control se mantuvo muy similar al obtenido al inicio del experimento, por el contrario el número de ácaros de los grupos tratados fue inferior, lo que refleja el impacto de ambos tratamientos sobre la población de *Varroa* en las colmenas.

⁵ La versión en inglés en formato artículo se puede consultar en el anexo. En vías de publicación.

Tabla 24. Número de ácaros caídos al fondo de la colmena (media \pm error estándar) obtenidos en las colmenas tratadas (Apivar y Apiguard) y control, desde el inicio del estudio (semana anterior al tratamiento) hasta la finalización del mismo (semana posterior a la finalización del tratamiento), llevado a cabo en primavera de 2010.

	Apivar	Apiguard	Control
Semana anterior al tratamiento	37,4 \pm 27,7	46,2 \pm 21,6	52,8 \pm 39,7
1ª semana de tratam.	45,5 \pm 9,2	138,5 \pm 73,8	119 \pm 55,0
2ª semana de tratam.	51,2 \pm 40,0	51,4 \pm 22,9	77,2 \pm 51,7
3ª semana de tratam.	51,2 \pm 44,0	84,2 \pm 42,1	78 \pm 55,5
4ª semana de tratam.	22,8 \pm 18,3	7,6 \pm 3,4	13,8 \pm 12,3
5ª semana de tratam.	8,4 \pm 3,2	- $^{\alpha}$	22,8 \pm 15,7
6ª semana de tratam.	5,8 \pm 1,8	- $^{\alpha}$	13,5 \pm 3,7
Semana posterior al tratam.	3,2 \pm 1,0	2,8 \pm 1,4	54,3 \pm 38,6

$^{\alpha}$ En el caso del AG el tratamiento finaliza a las 4 semanas.

Se ha representado la **evolución** de cada grupo de colmenas en relación a los datos del inicio del experimento, los cuales se han fijado en 100% (Fig. 61). Así se puede observar cómo ha evolucionado cada grupo respecto a sí mismo y además se puede establecer una comparación entre grupos, evitando las diferencias iniciales (al haberse fijado en 100% el tiempo cero, en los tres grupos).

El grupo de colmenas tratado con Apivar mostró un solo pico en la primera semana de tratamiento, multiplicándose el porcentaje de ácaros caídos en esa semana por 4,8 respecto a la semana inicial. En cambio, el grupo tratado con Apiguard mostró dos picos, uno la primera semana, en la que el porcentaje de ácaros se multiplicó por 2,4, y otra la tercera semana, multiplicándose por 2,2 y que coincidió con el reemplazo del tratamiento. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la semana 4 entre el grupo control y el grupo tratado con Apivar ($p= 0,035$), y en la semana posterior al tratamiento entre el grupo control y el grupo tratado con Apiguard ($p=0,034$).

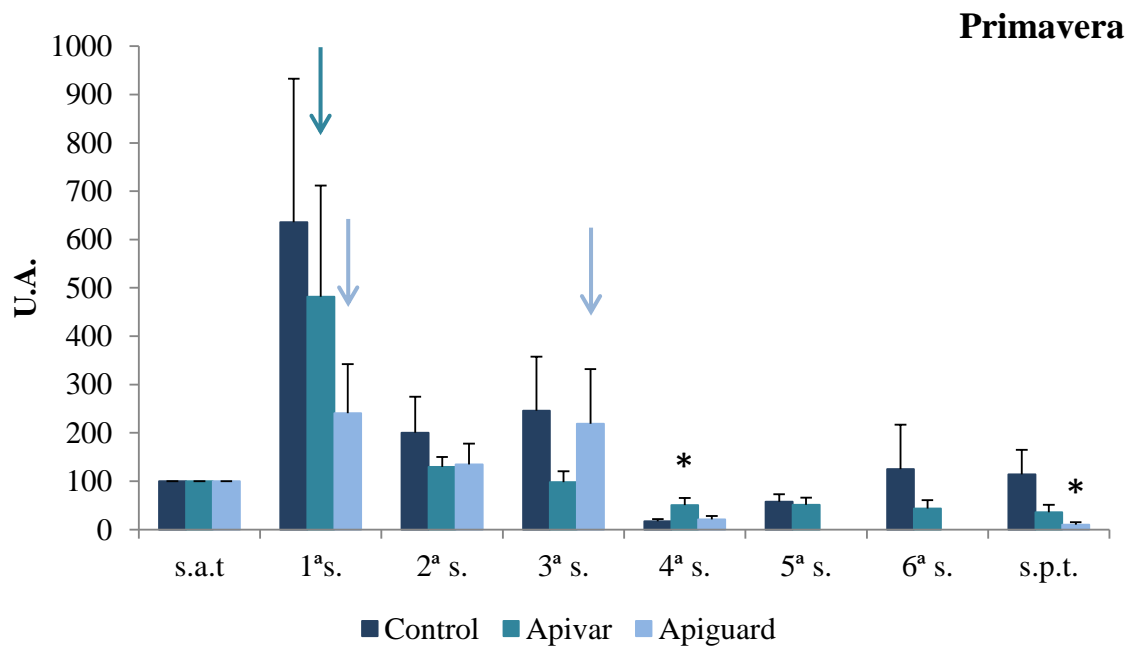


Fig. 61. Media del número de ácaros caídos \pm error estándar de antes, durante y después del tratamiento, en unidades arbitrarias (U.A.), durante primavera de 2010. s.a.t.= semana anterior al tratamiento; s.= semana; s.p.t.= semana posterior al tratamiento.

* indica la existencia de diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$ con respecto al grupo control.

En cuanto a los valores del **porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos (%R)** y del **porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos (%CNAC)** (Tabla 25), éstos fueron muy similares entre ellos (65,2% y 64,3% en AV, y 77% y 76,4% en AG), si bien se observó una elevada variabilidad entre las colmenas. En todas las colmenas el tratamiento fue eficaz, quedando tras el tratamiento con un número menor de ácaros. Tanto el %R como el %CNAC fueron mayores para Apiguard que para Apivar, con una diferencia media de más del 10%, aunque los valores no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$).

Estos resultados muestran la eficacia de los tratamientos con AV y AG observada en primavera, siendo el tratamiento orgánico (AG) más eficaz.

Tabla 25. Porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos (%R) y porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos (%CNAC) en las colmenas tratadas con Apivar y Apiguard, en primavera de 2010. M: media; EE: error estándar.

Colmena	%R		%CNAC	
	Apivar	Apiguard	Apivar	Apiguard
1	85,0	91,9	84,6	91,7
2	75,7	75,7	75,0	75,0
3	14,8	98,0	12,5	98,0
4	51,3	24,9 ^β	50,0	22,9 ^β
5	99,3	94,6	99,3	94,5
M ± EE	65,2 ± 14,8	90,1 ± 5,0	64,3 ± 15,2	89,8 ± 5,1

^β Valores atípicos. No se han tenido en cuenta en el cálculo de la media y los errores estándar, ni en el análisis estadístico de los datos.

3.3.2.- Segundo ensayo: otoño 2011

En la Tabla 26 se muestran las medias y errores estándar del **número de ácaros caídos al fondo** de la colmena en el ensayo realizado en otoño de 2011. El número de ácaros muestreados durante esta temporada fue muy superior a la registrada durante primavera, con un total de 17078 ácaros (4840 en el grupo control, 6157 en el grupo tratado con Apivar y 6081 en el grupo tratado con Apiguard). Aunque el grado de infestación entre las colonias estudiadas era diferente al inicio del experimento, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. En la semana posterior a la finalización del tratamiento el número de ácaros muestreados en el grupo control se mantuvo muy similar al obtenido al inicio del experimento, por el contrario el número de ácaros de los grupos tratados fue muy inferior, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 26. Número de ácaros caídos al fondo de la colmena (media \pm error estándar) obtenidos en las colmenas tratadas (Apivar y Apiguard) y control, desde el inicio del estudio (semana anterior al tratamiento) hasta la finalización del mismo (semana posterior a la finalización del tratamiento), llevado a cabo en otoño de 2011.

	Apivar	Apiguard	Control
Semana anterior al tratamiento	111,6 \pm 44,3	86,4 \pm 20,8	112 \pm 41,1
1ª semana de tratam.	514,8 \pm 215,7	437,4 \pm 82,0	194 \pm 62,5
2ª semana de tratam.	109,2 \pm 39,9	197 \pm 92,1	81,8 \pm 38,8
3ª semana de tratam.	112,4 \pm 34,1	264 \pm 103,3	173 \pm 76,6
4ª semana de tratam.	100,6 \pm 21,2	165,2 \pm 78,9	106,8 \pm 32,8
5ª semana de tratam.	127,6 \pm 33,5	- $^{\alpha}$	113,6 \pm 43,4
6ª semana de tratam.	84,6 \pm 23,2	- $^{\alpha}$	105 \pm 38,4
Semana posterior al tratam.	70,6 \pm 25,2	66,2 \pm 23,2	120,6 \pm 44,2

$^{\alpha}$ En el caso del AG el tratamiento finaliza a las 4 semanas.

Al igual que en apartado anterior, también se ha representado la **evolución** de cada grupo de colmenas en relación a los datos del inicio del experimento, los cuales se han fijado en 100% (Fig. 62).

La evolución de ambos grupos de colmenas tratadas siguió el mismo patrón que en el ensayo anterior, aunque en esta estación los picos fueron más acusados. Así el patrón del grupo tratado con Apivar mostró un solo pico en la primera semana de tratamiento, multiplicándose el porcentaje de ácaros caídos en esa semana por 6,2 respecto a la semana inicial. El grupo tratado con Apiguard mostró dos picos, uno la primera semana, en la que el porcentaje de ácaros se multiplicó por 5,8, y otra la tercera semana, multiplicándose por 2,9 y que coincidió con el reemplazo del tratamiento. En este caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de colmenas.

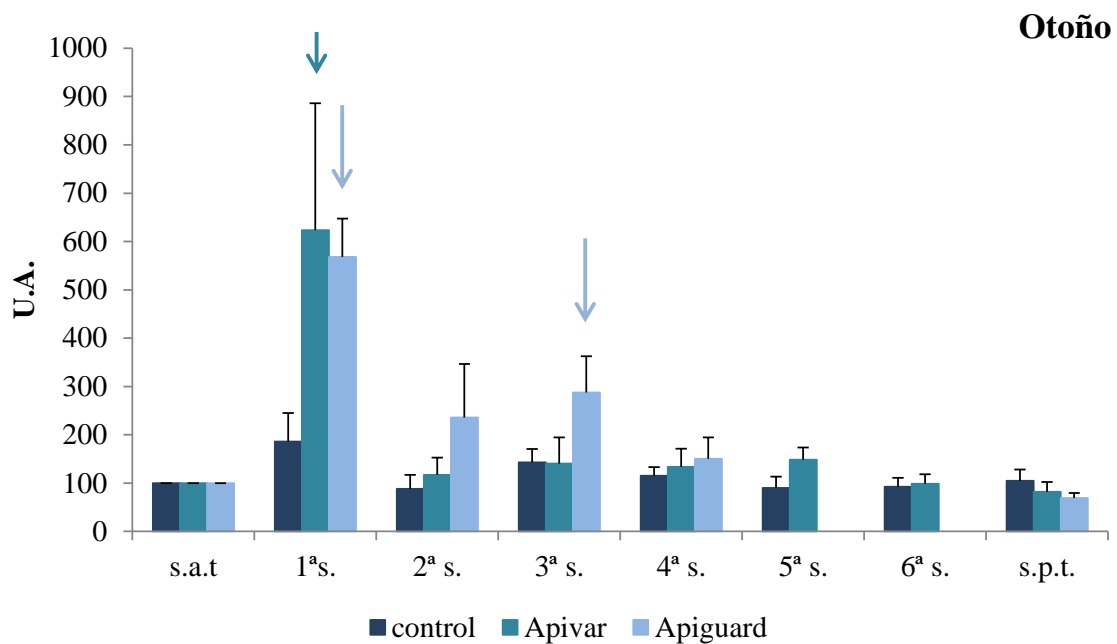


Fig. 62. Media del número de ácaros caídos \pm error estándar de antes, durante y después del tratamiento, en unidades arbitrarias (U.A.), en otoño de 2011. s.a.t.= semana anterior al tratamiento; s.= semana; s.p.t.= semana posterior al tratamiento.

A diferencia del ensayo anterior, los valores obtenidos del %R y del %CNAC no fueron tan similares entre ellos (Tabla 27), observando una diferencia del 5%. En este caso también se observó una elevada variabilidad entre las colmenas en ambos parámetros. En una de las colmenas tratadas con AV se obtuvieron más ácaros de los iniciales posteriormente a la realización del tratamiento. Como en el ensayo anterior, tanto el %R como el %CNAC fue mayor en el Apiguard que en el Apivar, con una diferencia de más del 10%, aunque sin presentar valores estadísticamente diferentes ni el %R ni %CNAC.

Estos resultados muestran la baja eficacia o nula eficacia en algunos casos de los tratamientos con AV y AG realizados a finales de otoño.

Tabla 27. Porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos (%R) y porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos (%CNAC) en las colmenas tratadas con Apivar y Apiguard, en otoño de 2011. M: media; EE: error estándar.

Colmena	%R		%CNAC	
	Apivar	Apiguard	Apivar	Apiguard
1	71,8	53,6	69,6	50,0
2	-36,0	27,6	-46,4	22,0
3	57,1	24,7	53,8	19,0
4	14,7	10,3	8,2	3,4
5	10,9	62,6	4,1	59,7
M ± EE	23,7 ± 19,0	35,8 ± 21,6	17,9 ± 20,5	30,8 ± 10,4

3.3.3.- Tercer ensayo: primavera-verano 2013

En la Tabla 28 se muestran las medias y errores estándar de los **ácaros caídos al fondo de la colmena** en cada una de las semanas estudiadas para cada grupo del ensayo realizado en primavera de 2013. El número total de ácaros muestreados fue de 7075 (1602 en el grupo control, 1977 en el grupo tratado con Apivar, 1641 en grupo tratado con Apiguard y 1855 en el grupo tratado con BeeVital), valores muy similares a los obtenidos en el primer ensayo de primavera de 2010. Aunque el grado de infestación entre las colonias estudiadas era diferente al inicio del experimento, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. En la semana posterior a la finalización del tratamiento el número de ácaros muestreados en el grupo control se mantuvo muy similar al obtenido al inicio del experimento, por el contrario el número de ácaros de los grupos tratados fue inferior, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo tratado con Apiguard ($p=0,017$) y entre el grupo control y el grupo tratado con Apivar ($p= 0,035$), lo que refleja el impacto de Apiguard y Apivar sobre la población de *Varroa* de las colmenas.

Tabla 28. Número de ácaros caídos al fondo de la colmena (media \pm error estándar) obtenidos en las colmenas tratadas (Apivar, Apiguard y BeeVital) y control, desde el inicio del estudio (semana anterior al tratamiento) hasta la finalización del mismo (semana posterior a la finalización del tratamiento), llevado a cabo en primavera de 2013.

	Apivar	Apiguard	BeeVital	Control
s.a.t.	32,4 \pm 26,0	42,2 \pm 14,9	45,8 \pm 22,3	41,2 \pm 19,2
1 ^a s.	215,5 \pm 204,2	184,8 \pm 75,7	34,6 \pm 12,1	33,0 \pm 14,7
2 ^a s.	100,6 \pm 70,6	69,8 \pm 17,6	100,8 \pm 49,1	39,0 \pm 13,8
3 ^a s.	35,0 \pm 12,2	27,8 \pm 10,0	64,0 \pm 27,3	52,0 \pm 20,9
4 ^a s.	20,4 \pm 8,1	1,8 \pm 1,0	63,2 \pm 35,7	69,4 \pm 44,5
5 ^a s.	17,2 \pm 8,7	- $^{\alpha}$	36,2 \pm 22,1	24,6 \pm 10,4
6 ^a s.	11,6 \pm 6,3	- $^{\alpha}$	25,6 \pm 12,8	30,4 \pm 11,1
s.p.t.	5,8 \pm 2,7 *	1,8 \pm 1,6 *	21,0 \pm 8,8	30,8 \pm 12,2

$^{\alpha}$ En el caso del AG el tratamiento finaliza a las 4 semanas.

* indica la existencia de diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$ con respecto al grupo control en la misma semana de muestreo.

Al igual que en apartados anteriores, se ha representado la **evolución** de cada grupo de colmenas en relación a los datos del inicio del experimento, los cuales se han fijado en 100% (Fig. 63). Los patrones de la evolución de las colmenas tratadas con Apivar y Apiguard resultaron diferentes a los observados en los ensayos anteriores. En el caso de Apivar se observó el pico en la tercera semana, y en el de Apiguard se observó el pico de la primera semana, que multiplicó el porcentaje de ácaro en un 6,3, pero no se registró el pico de la tercera semana. El patrón del grupo tratado con BeeVital presentó un pico en la tercera semana de tratamiento, justo al aplicar la tercera dosis del tratamiento. El análisis de estos datos mostró que no aparecen diferencias estadísticamente significativas en la semana posterior al tratamiento.

Los valores obtenidos del %R y del %CNAC fueron diferentes entre ellos (Tabla 29). En este caso también se observó una elevada variabilidad entre las colmenas en ambos parámetros, excepto en el caso del tratamiento con Apiguard, que resulta más homogéneo entre colmenas. En el caso de AV hay tres colmenas en las que el

tratamiento no ha funcionado, frente a una de BV. En los valores de %R se muestran diferencias significativas entre Apivar y Apiguard, $p=0,019$. En el caso del %CNAC es más elevado en Apiguard, seguido de BeeVital y Apivar, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre Apiguard y Apivar ($p=0,019$).

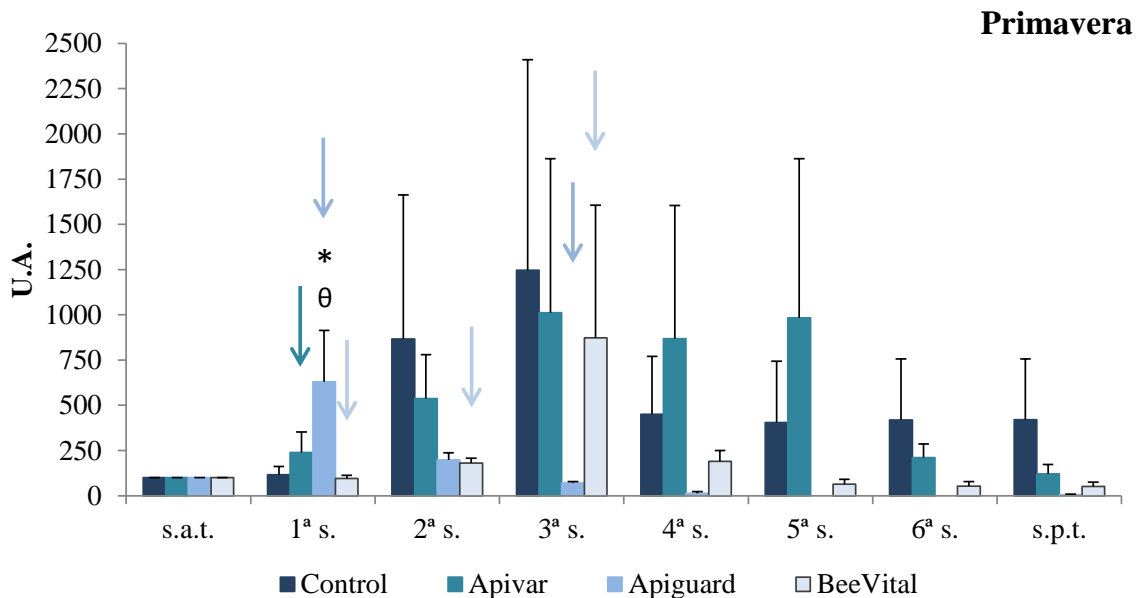


Fig. 63. Media del número de ácaros caídos \pm error estándar de antes, durante y después del tratamiento, en unidades arbitrarias (U.A.), obtenidas en primavera de 2013. s.a.t.= semana anterior al tratamiento; s.= semana; s.p.t.= semana posterior al tratamiento.

* indica la existencia de diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$ con respecto al grupo control.

θ indica la existencia de diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$ con respecto al grupo tratado con BeeVital.

Estos resultados confirman la eficacia del tratamiento con Apiguard en primavera. Además, revelan que el tratamiento llevado a cabo con el producto de origen orgánico BeeVital presenta una eficacia menor que el otro producto de origen orgánico (AG). Se confirma asimismo la baja o nula eficacia del tratamiento con Apivar.

Tabla 29. Porcentaje de reducción de la media diaria de ácaros caídos (%R) y porcentaje del cambio producido en el número de ácaros caídos (%CNAC) en las colmenas tratadas con Apivar, Apiguard y BeeVital, en primavera de 2013. M: media; EE: error estándar.

Colmena	%R			%CNAC		
	Apivar	Apiguard	BeeVital	Apivar	Apiguard	BeeVital
1	-100,6	100,0	48,2	-50,0	100,0	61,2
2	-33,8	77,7	73,8	0,0	83,3	80,4
3	100,0	100,0	-88,5 ^β	100,0	100,0	-40,9 ^β
4	-301,3 ^β	88,7	100,0	-200 ^β	91,6	100,0
5	28,0	100,0	28,0	46,2	100,0	46,2
M ± EE	-1,6 ± 42,9	93,29 ± 4,5 #	62,5 ± 15,6	24,0 ± 32,0	94,98 ± 3,3 #	71,9 ± 11,7

^β Valores atípicos. No se han tenido en cuenta en el cálculo de la media y los errores estándar, ni en el análisis estadístico de los datos.

indica la existencia de diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$ con respecto al grupo tratado con AV en la misma semana de muestreo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con Timol (AG), tanto en primavera como en otoño, concuerdan con los trabajos publicados anteriormente por otros autores, que muestran eficacias que varían desde un 40% a más de un 90% (Marchetti y Barbattini, 1984; Chiesa, 1991; Imdorf *et al.*, 1995; Gregorc y Planinc, 2005; Loucif-ayad *et al.*, 2010). En nuestros estudios se ha detectado una disminución de la eficacia del Timol cuando el tratamiento se aplica a finales de otoño (noviembre-diciembre) probablemente debido a las bajas temperaturas externas (13°C de temperatura media diaria) que obstaculizan la volatilización óptima del producto. Esta observación también fue comunicada por Ellis (2001), mostrando que AG tuvo un buen rendimiento a 15-20°C, y que perdió eficacia cuando las temperaturas fueron menores. En relación al Amitraz (AV), los resultados obtenidos en el presente trabajo en primavera son similares a los publicados por Floris *et al.* (2001) y Pohorecka *et al.* (2011), quienes obtuvieron una eficacia en torno al 70%. Otros autores han obtenido eficacias mayores que van del 82% (Chuda-Mickiewicz *et al.*, 2007; Loucif-ayad *et al.*, 2010) al 99,5% (Faucon *et al.*, 2007). No tenemos una explicación clara para esta baja eficacia del Amitraz obtenida en este periodo. Una explicación que tiene que ser

probada en futuros trabajos es la posibilidad de que las poblaciones de *V. destructor* en las Islas Baleares sean resistentes a Amitraz debido a la aplicación continua de este producto durante los últimos 30 años (los primeros años se aplicaba con madera impregnada con Amitraz). Referente al tratamiento realizado con BeeVital, son pocos los estudios que hemos encontrado. Los valores sobre la eficacia obtenidos en el presente ensayo son marcadamente más reducidos a los obtenidos por Howis y Nowakowski (2009) que registró una eficacia del 91,6% durante la temporada de otoño. En el caso de un estudio llevado a cabo con ácido oxálico por Mutinelli *et al.* (1997) obtuvo una eficacia media del 95%, aunque una de las colmenas estudiadas presentó una eficacia inferior al 30%.

Nuestros resultados también mostraron una elevada variabilidad en la eficacia de los tratamientos entre las colonias. Este hecho también fue observado por otros autores en Italia, Suiza y Polonia (Marchetti y Barbattini, 1984; Imdorf *et al.*, 1995; Mutinelli *et al.*, 1997; Colombo y Spreafico, 1999; Floris *et al.*, 2004; Chuda-Mickiewicz *et al.*, 2007). En el caso del Apiguard y del BeeVital, esta eficacia variable entre las colonias podría ser debida a las condiciones microclimáticas relacionadas con cada colonia que provoca una diferente tasa de volatilización y por lo tanto de dispersión del producto dentro de la colonia. Con respecto a Apivar, su reducida eficacia podría estar vinculada a la aparición de resistencias de *V. destructor* a este producto (Trouiller, 1998; Elzen *et al.*, 1999a), como se ha comentado anteriormente.

Los productos antivarroa han sido ampliamente utilizados en todo el mundo durante los últimos 35 años (Hollingworth, 1976). Actualmente resulta preocupante la utilización de productos con Amitraz, debido al desarrollo de resistencias químicas en las poblaciones de *V. destructor*, a los efectos adversos de los tratamientos sobre las abejas y a la acumulación de residuos en los productos de la colmena. Por lo tanto, se necesitan con urgencia métodos más respetuosos y alternativos a los basados en Amitraz. Basándose en los resultados del presente estudio, el Timol podría representar una alternativa en las estrategias de control integrado contra *V. destructor*, ya que tiene un bajo riesgo de residuos y de resistencias. Nuestros resultados también señalaron que primavera es el momento más adecuado para aplicar este tratamiento con Timol en colonias localizadas en clima mediterráneo, mientras que a finales de otoño (noviembre-

diciembre) parece no ser adecuado. El objetivo de próximos estudios debería centrarse en comprobar la eficacia del tratamiento orgánico BeeVital en otra temporada, intentando buscar un momento más adecuado para su aplicación, además de la realización de ensayos centrados en estudiar la resistencia a productos ampliamente usados, como el Amitraz, en las poblaciones de *V. destructor* de Baleares.

3.4.- Efecto de la aplicación aérea en campo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) sobre las colonias de abejas⁶

Este estudio se llevó a cabo para determinar el efecto de la aplicación aérea del insecticida *Btk* (aplicado para combatir la procesionaria del pino, *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller 1775) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae), de los pinares de Ibiza) sobre las colmenas de abejas en condiciones de campo reales. Cabe destacar que es el primer estudio realizado en campo y que no se ha encontrado información previa acerca del efecto de la aplicación aérea del mismo en condiciones naturales. Para evaluar el impacto se calculó el porcentaje de celdas ocupadas por cría, que es un indicador de la salud de la reina y del desarrollo de la cría y, por tanto, de la salud de la colonia.

Los resultados obtenidos mostraron un estrecho paralelismo a lo largo del experimento en ambos grupos de colmenas (tratadas y control), como puede observarse en la Figura 64. El análisis estadístico de los datos mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el grupo control, tanto a nivel global ($p=0,159$) como en cada uno de los momentos temporales muestreados.

Como puede observarse en la Tabla 30, al inicio del experimento (25 de agosto) el valor obtenido en el grupo tratado fue ligeramente menor al del grupo control, aunque no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

⁶ La versión en inglés en formato artículo se puede consultar en el anexo. Publicado en *Spanish Journal of Agricultural Research*, **12**, 405-408.

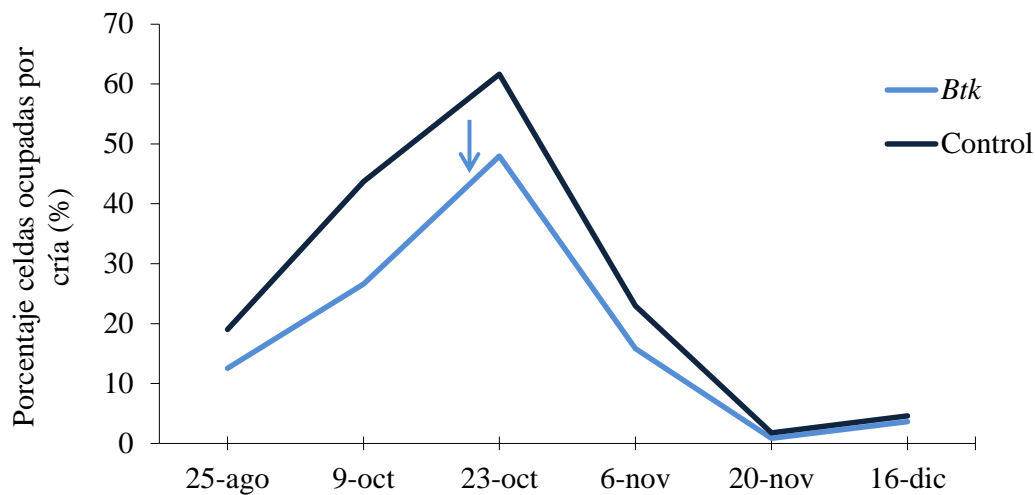


Fig. 64. Evolución del porcentaje de celdas ocupadas por cría de los núcleos Control (línea continua) y los núcleos tratados con *Btk* (línea discontinua). La flecha señala el momento de la aplicación del insecticida.

Tabla 30. Porcentaje de celdas ocupadas por cría, de cada núcleo analizado durante el periodo de muestreo. *Btk*: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*; C: control (núcleos no tratados); M: media; EE: error estándar.

Núcleo	Cantidad de cría (%)					
	Antes del tratamiento		Después del tratamiento			
	25 Ago.	9 Oct.	23 Oct.	6 Nov.	20 Nov.	16 Dic.
<i>Btk</i> 1	8,08	8,20	13,31	11,78	0,45	1,18
<i>Btk</i> 2	16,95	53,94	79,93	6,45	0,00	0,00
<i>Btk</i> 3	6,83	12,12	27,82	29,59	2,92	5,12
<i>Btk</i> 4	18,36	32,13	70,89	15,38	0,00	8,30
<i>Btk</i> M±EE	12,56±2,97	26,60±10,51	47,99±16,21	15,80±4,95	0,84±0,70	3,65±1,90
C 1	22,12	55,39	77,60	25,48	0,00	1,20
C 2	21,39	47,11	60,39	15,98	0,00	0,00
C 3	12,23	33,11	55,39	38,98	6,97	8,80
C 4	20,39	39,17	53,21	11,40	0,00	8,35
C M±EE	19,03±2,30	43,70±4,84	61,65±5,53	22,96±6,09	1,74±1,74	4,59±2,32
Ratio <i>Btk</i> /C	0,66	0,61	0,78	0,69	0,48	0,79

Durante los tres primeros muestreos la cantidad de cría se incrementó en todas las

colmenas. En el tercer muestreo (23 de octubre, justo después de la aplicación del tratamiento aéreo con *Btk*) el porcentaje de cría se había triplicado respecto al inicio en los dos grupos de colmenas, multiplicándose por 3,8 en las colonias tratadas y por 3,2 en las control.

En el cuarto muestreo (6 de noviembre), la cantidad de cría disminuyó en tres colonias del grupo tratado (*Btk 1*, *Btk 2* and *Btk 4*) y en todas las colmenas del grupo control (Tabla 30). Ya en el quinto muestreo (20 de noviembre) la cría fue inexistente en dos colmenas tratadas (*Btk 2* y *Btk 4*) y tres colmenas control (C 1, C 2 y C 4), y muy reducida en *Btk 1* (Tabla 30). El pequeño porcentaje de cría que se observó estaba en estado de pupa, no había cría en estadio larvario, lo que indica que no era una puesta reciente. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el cuarto y quinto muestreo en ambos grupos ($p=0,020$ en el grupo control, y $p=0,040$ en el grupo tratado).

Aparte de este drástico descenso de la cantidad de cría, se observaron por un lado celdas reales en estos núcleos (*Btk 1*, *Btk 2* y *Btk 4*, C 1, C 2 y C 4), y por otro la presencia de enjambres en los árboles de alrededor de las colmenas (Fig. 65). Estos indicadores sugieren que estos núcleos perdieron la reina al producirse un proceso de enjambrazón natural. Este comportamiento se desencadenó probablemente debido a que la reina no pudiera poner más huevos porque casi todas las celdillas de los panales de las colonias estaban ocupadas (cría, miel, polen) y continuaba entrando néctar en los núcleos. Esto se conoce como bloqueo del área de cría, y se encuentra entre las causas naturales que ayudan a desencadenar la enjambrazón y significa que estos núcleos estaban en pleno crecimiento, probablemente más acusado al tratarse de núcleos con reducido espacio disponible.

En el último muestreo (16 de diciembre), cuatro de los seis núcleos que perdieron la reina se recuperaron y las reinas iniciaron de nuevo la puesta. Entre los núcleos recuperados, dos estaban en la zona tratada (*Btk 1* y *Btk 4*) y dos en la control (C 1 y C 4). Estos núcleos presentaron cantidades de cría muy similares: 1,18% y 8,30% en núcleos tratados, frente a 1,20% y 8,35% en núcleos control. Por otra parte, los núcleos *Btk 3* y C 3 se mantuvieron con un crecimiento normal (Tabla 30). Al final del

experimento los valores de cría de ambos grupos tampoco presentaron diferencias significativas entre ellos.

Los reducidos valores del porcentaje de cría observada en ambos grupos de colmenas durante los meses de invierno responden también a la bajada que se produce en esta época en las colmenas que están en estas condiciones. En ambientes mediterráneos no se da una parada invernal de la puesta de la reina, pero sí que se reduce (Murilhas, 2002). Cabe resaltar que durante el experimento no se observó ninguna enfermedad en los núcleos estudiados y las reservas de polen y miel fueron suficientes para el desarrollo de las colonias.

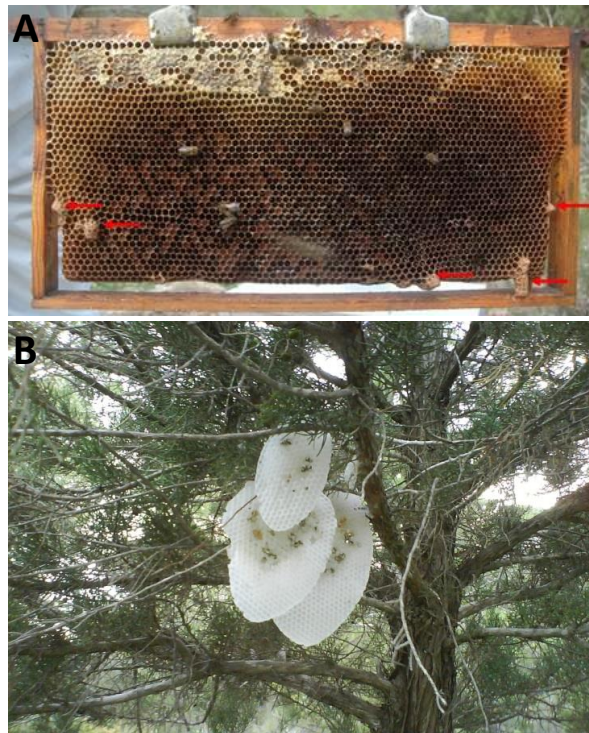


Fig. 65. A. Cuadro de una colmena muestreada, en el que pueden observarse hasta 5 celdas reales, señaladas con una flecha. **B.** Enjambre natural en un árbol localizado en la zona de estudio.

En la Tabla 30 puede observarse asimismo el ratio Btk/C obtenido a lo largo del experimento. Este ratio aumentó de un valor inicial de 0,66 (12,56/19,03) a un valor

final de 0,79 (3,65/4,59), lo que indica que la media de cría del grupo tratado incrementó comparativamente con la cría del grupo control.

En este sentido, también se ha representado la evolución de cada grupo de colmenas en relación a los datos del inicio del experimento, los cuales se han fijado en 100% (Fig. 66). Así se puede observar cómo ha evolucionado cada grupo respecto a sí mismo y además se puede establecer una comparación entre grupos, evitando las diferencias iniciales (al haberse fijado en 100% el tiempo cero, en ambos grupos). Durante dos muestreos (el segundo y el penúltimo) las colmenas control tuvieron una cantidad de cría mayor en comparación con las colmenas tratadas. En cambio, durante el tercer, cuarto y último muestreo la cantidad de cría fue mayor en las colmenas tratadas, mostrando una recuperación mayor que la observada en las control.

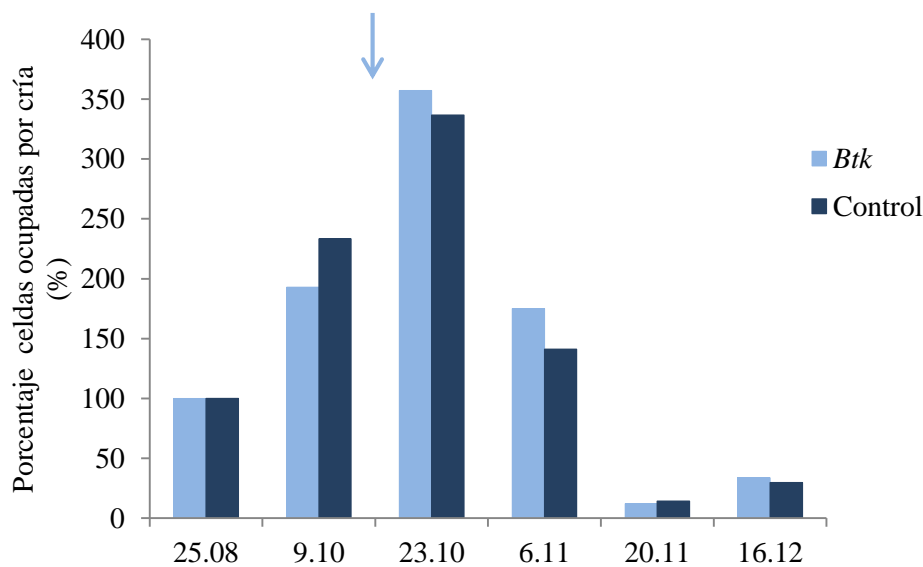


Fig. 66. Los datos representan las medias del porcentaje de celdas ocupadas por cría a lo largo del experimento en ambos grupos de colmenas. Los valores a t_0 fueron fijados en 100, y los valores obtenidos en los siguientes muestreos fueron representados como el porcentaje del valor de t_0 .

Aunque las toxinas derivadas del *Bt* (proteínas Cry y Cyt) actúan selectivamente contra los organismos diana, las abejas quedan expuestas a éstas, vía contacto directo o

por la ingestión de polen y néctar contaminado. No se ha encontrado ningún estudio anterior acerca del efecto sobre las abejas de la aplicación aérea del *Btk* en condiciones de campo. Sin embargo, sí que hay estudios sobre el efecto de la pulverización directa o la contaminación alimentaria con *Btk* en condiciones de laboratorio.

Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan otras investigaciones llevadas a cabo en condiciones de laboratorio que muestran que este pesticida no induce la mortalidad de las abejas (Malone *et al.*, 2004; Babendreier *et al.*, 2005; O'Callaghan *et al.*, 2005; Porcar *et al.*, 2008). Asimismo nuestros resultados son consistentes con los obtenidos en campo por Dai *et al.* (2012), que mostraron que el porcentaje de celdas de cría no difería entre colmenas tratadas y control en cultivos de maíz modificado genéticamente. Además concuerdan también con otro estudio de campo llevado a cabo en EEUU, en el que no se detectaron diferencias significativas en la exposición al polen *Bt* en el rendimiento de la colonia (Rose *et al.*, 2007). Por el contrario, nuestros resultados difieren de algunos ensayos de laboratorio en los que se pulveriza directamente con el insecticida o se contamina el alimento de las abejas, y que muestran efectos sub-letales, como efectos negativos en el pecoreo (Ramirez-Romero *et al.*, 2005; Ramirez-Romero *et al.*, 2008) o cierta toxicidad sobre las abejas adultas (Brighenti *et al.*, 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que es difícil extrapolar el impacto sobre las colonias de los resultados obtenidos en estudios de laboratorio, básicamente porque en laboratorio no se pueden modelar con precisión las características ecológicas de las colmenas, y se eliminan por ejemplo las interacciones sociales. Por lo tanto, estos estudios tienen una utilidad limitada en la predicción del impacto en colonias bajo condiciones reales de campo.

En resumen, la evolución de la cría entre los grupos de colonias fue muy similar, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas a lo largo del experimento entre los grupos. Del mismo modo, el ratio de cría *Btk*/Control aumentó a lo largo del experimento, mostrando que la cría del grupo tratado se incrementó comparativamente con la del grupo control. En base a dichos resultados, obtenidos durante una única temporada de fumigaciones aéreas con *Btk*, no se ha podido observar ningún efecto perjudicial notable sobre la cría de abejas. En consecuencia, el uso de *Btk* para el control de plagas forestales resultaría adecuado al no afectar el ciclo de producción de las abejas

de la miel. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen trabajos parecidos en los que se evalúe el efecto en campo de aplicaciones aéreas de *Btk* en el ciclo de cría de las abejas, por lo que serían necesarios más estudios de campo para obtener más información sobre los posibles efectos a largo plazo de dicho plaguicida.

Capítulo 4: Discusión general

Capítulo 4: Discusión general

Actualmente el estado sanitario de las colonias de abejas melíferas es un tema relevante debido a la elevada tasa de pérdida de colmenas observada alrededor del mundo, lo que supone un riesgo para la conservación de ecosistemas y la producción alimentaria. Entre los principales factores implicados en estas pérdidas destacan los siguientes: la presencia de parásitos como *Varroa* y *Nosema*, patógenos como virus, el estado nutricional de las abejas y la exposición a pesticidas (Smith *et al.*, 2013; Goulson *et al.*, 2015). El eje central de la presente tesis ha sido el estudio de dos de los factores citados: el ácaro *V. destructor* y el insecticida *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

En este trabajo se ha caracterizado la curva poblacional de *V. destructor* por primera vez en Baleares y se ha observado que presenta un patrón bimodal, con un máximo en primavera y otro en verano/otoño. Estos máximos coinciden con las dos floraciones características de Baleares, una en primavera y otra a finales de verano-otoño (floración del algarrobo). Así, en estas dos épocas aumentan los recursos disponibles para las abejas y por tanto la cantidad de cría; en consecuencia, la reproducción del *Varroa* también se ve incrementada. Esto concuerda con estudios anteriores que muestran que el crecimiento de la población de *Varroa* está asociado a la cantidad de cría y/o la fertilidad de los ácaros (Arechavaleta-Velasco y Guzman-Novoa, 2001; Lodesani *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2003). El máximo de primavera observado en la curva poblacional del presente estudio es más elevado que el de verano/otoño, al igual que la prevalencia y la focalidad del parásito. Sin embargo, al aumentar la cantidad de abejas en primavera, el ratio ácaro/abeja disminuye, encontrando valores de infestación más reducidos en esta época en relación al otoño, lo que también se ha observado en otros estudios llevados a cabo en zonas de clima tropical (Marcangeli *et al.*, 1992).

Por los resultados obtenidos en este trabajo, la aplicación de dos tratamientos (primavera y otoño) con productos de origen orgánico como el Timol, aparecen como la mejor alternativa para controlar el parásito de manera adecuada y con un bajo riesgo de

acumulación de residuos y de resistencias (Bogdanov, 2006; Rosenkranz *et al.*, 2010). Por otra parte, la reducida profesionalización del sector de la apicultura en Baleares, junto con la inadecuada aplicación de acaricidas como el Amitraz (Apivar), podría condicionar que estos productos resulten escasamente eficaces, bien por un uso incorrecto en tiempo y/o forma o bien por la aparición de resistencias en las poblaciones del ácaro. De hecho, uno de los principales aspectos de estudio en futuros trabajos debería ser la determinación del nivel de resistencia a productos como el Amitraz en las poblaciones de *Varroa* de Baleares.

Según los resultados obtenidos, la tasa de infestación en Baleares es ligera (menor al 3%), no tanto debido a los tratamientos antivarroa, que como ya se ha comentado no se aplican en forma y tiempo incorrectos, como por la situación epidemiológica endémica de este parásito en Baleares. Entre los factores que pueden haber contribuido al desarrollo de esta situación destaca el aislamiento de las poblaciones, el incremento del número de colonias en base a enjambres naturales y el reducido número de colmenas que maneja cada apicultor, que ya se ha mencionado anteriormente. Esta situación endémica se caracteriza, según hemos podido comprobar aplicando Modelos Lineales Generalizados Mixtos, por una primavera en la que el ratio de parasitismo es reducido y las poblaciones de abejas se ven poco afectadas por el parásito debido a que la población de abejas y los recursos florísticos disponibles son máximos. Así, y condicionado por temperaturas elevadas de nuestra zona, el ratio ácaro/abeja se mantiene ligero. Por el contrario, en otoño/invierno, cuando los recursos florísticos disminuyen, la población de abejas se reduce y la humedad relativa del ambiente aumenta, el ratio de parasitismo aumenta y si los tratamientos no se realizan de forma correcta se pasa a una situación irreversible de pérdida de la colonia de abejas. Además se ha podido comprobar, independientemente de la estación del año, como las colmenas localizadas en zonas con mayor proporción de recursos naturales disponibles se han visto menos afectadas por *Varroa*, lo que indica la importancia de la disponibilidad de nutrientes para la preservación de la salud de las colonias de abejas, factor a tener en cuenta en su manejo.

Por otra parte, se realizó por primera vez un ensayo en campo para poder conocer el impacto de la aplicación aérea de *Bt* subsp. *kurstaki* (realizada para controlar la

procesionaria del pino) sobre las colonias de *Apis mellifera*, mostrando que al menos durante la temporada de estudio, este insecticida no mostró un efecto perjudicial a corto plazo en el desarrollo de las abejas.

En conjunto, los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis muestran cómo factores como el parásito *V. destructor*, la disponibilidad de recursos naturales para las abejas, el clima y el uso de acaricidas interfieren en la salud de las colonias de abejas. Los resultados obtenidos muestran la particularidad de la apicultura en Baleares, caracterizada, como ya se ha mencionado, por un amplio porcentaje de apicultores aficionados y una falta de adecuación en el manejo de productos veterinarios, por lo que se recomendaría la elaboración de un Libro blanco cuyo objetivo se centrara en servir de guía estratégica de acciones futuras para afrontar esta problemática. En el citado libro de buenas prácticas, elaborado de manera conjunta entre la administración, los apicultores y los científicos, se explicaría la problemática actual y se recomendarían pautas de actuación para afrontarla y resolverla (calendario de aplicación y rotación de acaricidas, alternativas a los tratamientos químicos, uso del fondo de colmena modificado para conocer el estado de la parasitosis, análisis de otras enfermedades, formación). Asimismo, en futuros estudios nos planteamos profundizar en el conocimiento de la resistencia de *Varroa* adquirida a ciertos acaricidas, desarrollar o testar nuevos productos, así como detectar la presencia de virus transmitidos por el parásito, para, a partir de ese conocimiento, diseñar nuevas estrategias para el manejo y control de *V. destructor*.

Capítulo 5: Conclusiones

Capítulo 5: Conclusiones

1.- La curva poblacional anual de *Varroa destructor* en Baleares resultó ser bimodal, con dos máximos, uno mayor durante primavera y otro en verano/otoño.

2.- A partir del desarrollo de un Modelo Lineal Generalizado Mixto, se ha observado que la abundancia de *V. destructor* aumentó significativamente con la abundancia de las abejas a escala anual, particularmente en la segunda mitad del año.

3.- Se ha descrito por primera vez a partir de un Modelo Lineal Generalizado Mixto que las colmenas con una menor proporción de recursos naturales disponibles presentaron una mayor abundancia de *V. destructor*.

4.- El modelo de la abundancia de *V. destructor* indicó que la temperatura y la humedad relativa ambiental fueron predictores relevantes en el primer y segundo semestre del año, respectivamente.

5.- La infestación media del ácaro en Baleares fue ligera (menor al 1%) y la prevalencia media detectada fue de entre el 34,78% y el 44,09%. Más del 80% de los apiarios muestreados en Baleares presentaban *V. destructor*.

6.- La distribución del número de colonias con *Varroa* por apiario en Mallorca se ajustó a una distribución Poisson, lo que refleja una situación epidemiológica endémica de este parásito en Baleares.

7.- Los resultados sobre la eficacia evaluada en campo de los tratamientos con Apivar (Amitraz), Apiguard (Timol) y BeeVital (aceites esenciales) mostraron que el Timol podría representar una alternativa en las estrategias de control integrado contra *V. destructor*, ya que tiene un bajo riesgo de residuos y de resistencias.

8.- En el estudio realizado no se han detectado efectos nocivos en la cría de *Apis mellifera* debidos a la aplicación aérea del *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* realizada para controlar la procesionaria del pino .

9.- Las encuestas realizadas a apicultores de Baleares muestran el bajo nivel de profesionalización del sector apícola y un manejo inadecuado de los tratamientos acaricidas.

Conclusions

Conclusions

1.- The annual pattern of abundance of *Varroa destructor* in the Balearic Islands was bimodal, with two peaks, one higher in spring and other in summer/autumn.

2.- Using a Generalized Linear Mixed Models, *Varroa* annual abundance was found to increase as bee abundance, particularly in the second half of the year.

3.- We has described for the first time using a Generalized Linear Mixed Models that low availability of natural flowering resources lead to high levels of infestation of *Varroa*

4.- The model of the abundance of *V. destructor* revealed that environmental temperature and relative humidity were significant predictors in the first and second half of the year, respectively.

5.- We found a low infestation (less than 1%), the prevalence detected was between 34.78% during autumn and 44.09% during spring, and more than 80% of the apiaries sampled in the Balearic Islands were positive to *Varroa*.

6.- The statistical distribution of the number of colonies per apiary with *Varroa* in Mallorca was fitted to a Poisson distribution, showing an endemic epidemiological situation of this parasite in the Balearic Islands.

7.- Field trials of the efficacy of miticides Apivar (Amitraz), Apiguard (Thymol) and BeeVital (essential oils) showed that Thymol could represent an alternative in integrated control strategies against *V. destructor*, having a low risk of residues and resistance.

8.- Aerial treatments of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against processionary caterpillar did not show any effect on the brood development of *A. mellifera*.

9.- The survey carried out on beekeepers showed a low-level of professionalization of the apiculture in the Balearic Islands. Accordingly, the survey also showed a low-level of accuracy when miticides are applied to bee colonies.

Bibliografía

Bibliografía

- AEAT, 2013. DataComex, Estadísticas del comercio exterior español
- Aizen, M. A. y Harder, L. D., 2009. Geographic variation in the growth of domesticated honey bee stocks: disease or economics? *Commun Integr Biol*, **2**, 464-466.
- Akaike, H., 1973. Maximum Likelihood Identification of Gaussian Autoregressive Moving Average Models. *Biometrika*, **60**, 255-265.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. y Le Conte, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett*, **6**, 562-565.
- Alberti, G. y Hänel, H., 1986. Fine structure of the genital system in the bee parasite, *Varroa jacobsoni* (Gamasida: Dermanyssina) with remarks on spermiogenesis, spermatozoa and capacitation. *Experimental and Applied Acarology*, **2**, 63-104.
- Alquisira-Ramirez, E., Paredes-Gonzalez, J. R., Hernandez-Velazquez, V. M., Ramirez-Trujillo, J. A. y Pena-Chora, G., 2014. In vitro susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie*, **45**, 707-718.
- Allen, M. F., Ball, B. V., White, R. F. y Antoniw, J. F., 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa-jacobsoni* by the use of a simple indirect Elisa. *Journal of Apicultural Research*, **25**, 100-105.
- Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A. y Omholt, S. W., 2004. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera : Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari : Varroidae): A factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology*, **97**, 741-747.
- Anderson, D. y East, I. J., 2008. The latest buzz about colony collapse disorder. *Science*, **319**, 724-725.
- Anderson, D. L. y Trueman, J. W. H., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, **24**, 165-189.
- Arechavaleta-Velasco, M. E. y Guzman-Novoa, E., 2001. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, **32**, 157-174.

- Babendreier, D., Kalberer, N. M., Romeis, J., Fluri, P., Mulligan, E. y Bigler, F., 2005. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie*, **36**, 585-594.
- Ball, B. V., 1985. Acute paralysis virus isolates from honeybee colonies infested with *Varroa-jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, **24**, 115-119.
- Bernal, J., Garrido-Bailon, E., del Nozal, M. J., Gonzalez-Porto, A. V., Martin-Hernandez, R., Diego, J. C., Jimenez, J. J., Bernal, J. L. y Higes, M., 2010. Overview of Pesticide Residues in Stored Pollen and Their Potential Effect on Bee Colony (*Apis mellifera*) Losses in Spain. *Journal of Economic Entomology*, **103**, 1964-1971.
- Boecking, O. y Genersch, E., 2008. Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, **3**, 221-228.
- Bogdanov, S., 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie*, **37**, 1-18.
- Boi, M., Lladó, G. y Llorens, L., 2008. *Estudio de la flora melífera, mieles y producción polínica de Mallorca*.
- Boot, W. J., Schoenmaker, J., Calis, J. N. M. y Beetsma, J., 1995. Invasion of *Varroa-jacobsoni* into drone brood cells of the honey-bee, *Apis-mellifera*. *Apidologie*, **26**, 109-118.
- Botias, C., Martin-Hernandez, R., Barrios, L., Meana, A. y Higes, M., 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*, **44**, 14.
- Botias, C., Martin-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A., Martinez-Salvador, A., De La Rúa, P., Meana, A. y Higes, M., 2012. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science*, **93**, 150-155.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J. y Gunn, A., 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology*, **73**, 101-106.
- Branco, M. R., Kidd, N. A. C. y Pickard, R. S., 1999. Development of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis mellifera iberica* in a Mediterranean climate. *Apidologie*, **30**, 491-503.

- Branco, M. R., Kidd, N. A. C. y Pickard, R. S., 2006. A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari : Varroidae) population estimation. *Apidologie*, **37**, 452-461.
- Brighenti, D. M., Carvalho, C. F., Carvalho, G. A., Brighenti, C. R. G. y Carvalho, S. M., 2007. Bioactivity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) to adults of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera : Apidae). *Ciencia E Agrotecnologia*, **31**, 279-289.
- Brodtschneider, R. y Crailsheim, K., 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, **41**, 278-294.
- Brodsgaard, C. J., Ritter, W., Hansen, H. y Brodsgaard, H. F., 2000. Interactions among *Varroa jacobsoni* mites, acute paralysis virus, and *Paenibacillus larvae larvae* and their influence on mortality of larval honeybees in vitro. *Apidologie*, **31**, 543-554.
- Bruce, W. A., Needham, G. R. y Potts, W. J. E., 1997. The effects of temperature and water vapor activity on water loss by *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae). *American Bee Journal*, **137**, 461-463.
- Buchler, R., 1994. Varroa Tolerance in Honey-Bees - Occurrence, Characters and Breeding. *Bee World*, **75**, 54-70.
- Cakmak, I., Aydin, L., Gulegen, E. y Wells, H., 2003. Varroa (*Varroa destructor*) and tracheal mite (*Acarapis woodi*) incidence in the Republic of Turkey. *Journal of Apicultural Research*, **42**, 57-60.
- Calatayud, F. y Verdu, M. J., 1995. Number of adult female mites *Varroa-jacobsoni* Oud on hive debris from honey-bee colonies artificially infested to monitor mite population increase (Mesostigmata, Varroidae). *Experimental & Applied Acarology*, **19**, 181-188.
- Calatayud, F. y Verdú, M. J., 1992. Evolución anual de parámetros poblacionales de colonias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) parasitadas por *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, **18**, 777-788.
- Calderone, N. W. y Kuenen, L. P. S., 2001. Effects of western honey bee (Hymenoptera : Apidae) colony, cell, type, and larval sex on host acquisition by female *Varroa destructor* (Acari : Varroidae). *Journal of Economic Entomology*, **94**, 1022-1030.

- Calis, J. N. M., Fries, I. y Ryrie, S. C., 1999. Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **30**, 111-124.
- Colombo, M. y Spreafico, M., 1999. Esperienze di lotta a *Varroa jacobsoni* Oud con un nuovo formulato a base di timolo. *Selezione Veterinaria*, **7**, 473-474-478.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J. H., Cui, L. W., Hutchison, S. K., Simons, J. F., Egholm, M., Pettis, J. S. y Lipkin, W. I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, **318**, 283-287.
- Crailsheim, K., Brodschneider, R. y Neumann, P., 2009. The COLOSS puzzle: filling in the gaps. *Proceedings of the 4th COLOSS Conference*, 46-47.
- Cresswell, J. E., 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, **20**, 149-157.
- Currie, R. W., Pernal, S. F. y Guzman-Novoa, E., 2010. Honey bee colony losses in Canada. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 104-106.
- Currie, R. W. y Tahmasbi, G. H., 2008. The ability of high- and low-grooming lines of honey bees to remove the parasitic mite *Varroa destructor* is affected by environmental conditions. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, **86**, 1059-1067.
- Chauzat, M.-P., Carpentier, P., Martel, A.-C., Bougeard, S., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Madec, F., Aubert, M. y Faucon, J.-P., 2009. Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. *Environmental Entomology*, **38**.
- Chauzat, M. P., Laurent, M., Riviere, M. P., Saugeon, C., Hendrikx, P. y Ribiere-Chabert, M., 2014. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2013. In: E. U. R. L. f. h. health, France.
- Chauzat, M. P., Martel, A. C., Zeggane, S., Drajnudel, P., Schurr, F., Clement, M. C., Ribiere-Chabert, M., Aubert, M. y Faucon, J. P., 2010. A case control study and a survey on mortalities of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in France during the winter of 2005-6. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 40-51.
- Chiesa, F., 1991. Effective Control of Varroaosis using Powdered Thymol. *Apidologie*, **22**.

- Chuda-Mickiewicz, B., Prabucki, J. y Jerzy Samborski, P. R., 2007. Evaluation of varroacidal efficacy of biowar preparation. *Journal of Apicultural Science*, **51**, No. 2, 47-48-53.
- Dai, P. L., Zhou, W., Zhang, J., Cui, H. J., Wang, Q., Jiang, W. Y., Sun, J. H., Wu, Y. Y. y Zhou, T., 2012. Field assessment of Bt cry1Ah corn pollen on the survival, development and behavior of *Apis mellifera ligustica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **79**, 232-237.
- de D'Aubeterre, J. P., Myrold, D. D., Royce, L. A. y Rossignol, P. A., 1999. A scientific note of an application of isotope ratio mass spectrometry to feeding by the mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans, on the honeybee, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, **30**, 351-352.
- de Guzman, L. I. y Rinderer, T. E., 1999. Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees. *Apidologie*, **30**, 85-95.
- de Miranda, J. R., Cordoni, G. y Budge, G., 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S30-S47.
- De Ruijter, A. y Kaas, J. P., 1983. The anatomy of the *Varroa* mite. . In: R. Cavalloro (ed.), *Varroa jacobsoni Oud Affecting Honey Bees: Present Status and Needs*. Rotterdam.
- DeJong, D., 1996. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. *Bee World*, **77**, 67-70.
- Dejong, D., Goncalves, L. S. y Morse, R. A., 1984. Dependence on Climate of the Virulence of *Varroa-jacobsoni*. *Bee World*, **65**, 117-121.
- Dejong, D., Roma, D. D. y Goncalves, L. S., 1982. A Comparative-Analysis of Shaking Solutions for the Detection of *Varroa-jacobsoni* on Adult Honeybees. *Apidologie*, **13**, 297-306.
- Delaplane, K. S. y Hood, W. M., 1999. Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA. *Apidologie*, **30**.
- Delfinado-Baker, M., 1984. The nymphal stages and male of *Varroa jacobsoni* Oudemans, a parasite of honeybees. *International Journal of Acarology*, **10**, 75-80.
- Delfinado-Baker, M. y Aggarwal, K., 1987. A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). *International Journal of Acarology*, **13**, 233-237.

- Desneux, N., Decourtye, A. y Delpuech, J. M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol*, **52**, 81-106.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P. y Ellis, J. D., 2013. Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 52.51.09-52.51.09.
- Donze, G. y Guerin, P. M., 1994. Behavioral-attributes and parental care of varroa mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **34**, 305-319.
- Donze, G., Herrmann, M., Bachofen, B. y Guerin, P. M., 1996. Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Ecological Entomology*, **21**, 17-26.
- Downey, D. L. y Winston, M. L., 2001. Honey bee colony mortality and productivity with single and dual infestations of parasitic mite species. *Apidologie*, **32**, 567-575.
- Duay, P., De Jong, D. y Engels, W., 2002. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and molecular research : GMR*, **1**, 227-232.
- Duay, P., De Jong, D. y Engels, W., 2003. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, **34**, 61-65.
- Eguaras, M., Marcangeli, J. y Fernandez, N. A., 1994. Influence of Parasitic Intensity on *Varroa-jacobsoni* Oud Reproduction. *Journal of Apicultural Research*, **33**, 155-159.
- Elzen, P. J., Baxter, J. R., Spivak, M. y Wilson, W. T., 1999a. Amitraz resistance in varroa: New discovery in North America. *American Bee Journal*, **139**.
- Elzen, P. J., Eischen, F. A., Baxter, J. R., Elzen, G. W. y Wilson, W. T., 1999b. Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata : Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie*, **30**.
- Ellis, J. D., 2001. The future of Varroa control: Integrating current treatments with the latest advancements. *American Bee Journal*, **141**.
- Ellis, J. D., Graham, J. R. y Mortensen, A., 2013. Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 17.

- Emsen, B. y Dodologlu, A., 2009. The Effects of Using Different Organic Compounds against Honey Bee Mite (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) on Colony Developments of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) and Residue Levels in Honey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **8**, 1004-1009.
- Emsen, B. y Dodologlu, A., 2015. The Efficacy of Thymol and Oxalic Acid in Bee Cake Against Bee Mite (*Varroa destructor* Anderson&Trueman) in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Colonies. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, **21**, 45-48.
- Engels, W., Rosenkranz, P., Hertl, F. y Staemmler, G., 1984. Effect of drone brood removal on varroa infested honey bee colonies. *Apidologie*, **15**, 246-248.
- Faucon, J. P., Drajnudel, P., Chauzat, M. P. y Aubert, M., 2007. Control of the efficacy of APIVAR ND against *Varroa destructor*, a parasite of *Apis mellifera*. *Revue de Medecine Veterinaire*, **158**, 283-290.
- Faucon, P. J.-P. y Chauzat, M.-P., 2008. Varroosis and others honey bee diseases: Major causes for colony mortality in France. *Bulletin De L Academie Veterinaire De France*, **161**, 257-263.
- Fernandez, N., Eguaras, M. y Hernandez, D., 1993. Distribution patterns of *Varroa-jacobsoni* Oud on *Apis-mellifera* L. during winter in Argentina. *Apidologie*, **24**, 397-401.
- Finley, J., Camazine, S. y Frazier, M., 1996. The epidemic of honey bee colony losses during the 1995-1996 season. *American Bee Journal*, **136**, 805-808.
- Flores, J. M., Ruíz, J. A. y Afonso, S. M., 2002. Accessment of the popularion of *Varroa destructor* based on its collection from boards at the bottoms of hives of *Apis mellifera iberica*. *Revista portuguesa de ciencias veterinarias*.
- Flores, J. M., Ruíz, J. A., Ruz, J. M., Puerta, F., Campano, F., F., P. y Bustos, M., 1998. Cría controlada de abejas reinas de *Apis mellifera iberica*. *Archivos de Zootecnia*, **47**, 347-350.
- Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V. L. y Angioni, A., 2004. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: Effectiveness, persistence, and residues. *Journal of Economic Entomology*, **97**.
- Floris, I., Satta, A., Garau, V. L., Melis, M., Cabras, P. y Aloul, N., 2001. Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*. *Apidologie*, **32**.

- Fournier, D. A., Skaug, H. J., Ancheta, J., Ianelli, J., Magnusson, A., Maunder, M. N., Nielsen, A. y Sibert, J., 2012. AD Model Builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optimization Methods & Software*, **27**, 233-249.
- Frazier, M., Mullin, C., Frazier, J. y Ashcraft, S., 2008. What have pesticides got to do with it? *American Bee Journal*, **148**, 521-523.
- Fries, I., Camazine, S. y Sneyd, J., 1994. Population-Dynamics of *Varroa-jacobsoni* - a Model and a Review. *Bee World*, **75**, 5-28.
- Fries, I., Hansen, H., Imdorf, A. y Rosenkranz, P., 2003. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie*, **34**, 389-397.
- Fuchs, S., 1990. Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis-mellifera-carnica*. *Apidologie*, **21**, 193-199.
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J. y Vaissiere, B. E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, **68**, 810-821.
- García-Fernández, R., Benítez Rodríguez, P. y Orantes-Bermejo, F. J., 1995. Influence of climate on the evolution of the population dynamics of the *Varroa mite* on honeybees in the south of Spain. 371-380.
- García Fernández, P., 1997. Influence of the environment and the host on parasitization by *Varroa jacobsoni* Oud. *The varroosis in the Mediterranean region*. Zaragoza.
- Garedew, A., Schmolz, E. y Lamprecht, I., 2004. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, **35**, 419-430.
- Garrido, C. y 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.
- Garrido, C., Rosenkranz, P., Sturmer, M., Rubsam, R. y Buning, J., 2000. Toluidine blue staining as a rapid measure for initiation of oocyte growth and fertility in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **31**, 559-566.
- Genersch, E. y Aubert, M., 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet Res*, **41**, 54.
- Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Buchler, R., Berg, S., Ritter, W., Muhlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G. y 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.
- Gisder, S., Aumeier, P. y Genersch, E., 2009. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, **90**, 463-467.
- Gisder, S., Hedtke, K., Mockel, N., Frielitz, M. C., Linde, A. y Genersch, E., 2010. Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 3032-3038.
- Goodwin, R. M., Taylor, M. A., McBrydie, H. M. y Cox, H. M., 2006. Drift of *Varroa destructor*-infested worker honey bees to neighbouring colonies. *Journal of Apicultural Research*, **45**, 155-156.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C. y Rotheray, E. L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*.
- Greatti, M., Milani, N. y Nazzi, F., 1992. Reinfestation of an acaricide-treated apiary by *Varroa-jacobsoni* Oud. *Experimental & Applied Acarology*, **16**, 279-286.
- Green, R. H., 1979. *Sampling Design and Statistical Methods for Environmental Biologists*, p. 272. New York.
- Gregorc, A. y Planinc, I., 2005. The control of *Varroa destructor* in honey bee colonies using the thymol-based acaricide - Apiguard. *American Bee Journal*, **145**, 672-675.
- Grimalt, M., Rodríguez, A., Servera, J. y Rodríguez, R., 1991. *Libro-Guía de las Excursiones de las VII Jornadas de Campo de Geografía Física*, p. 253. Mallorca, España.
- Guzman-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P. G. y Correa-Benitez, 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**.
- Hanley, A. V., Huang, Z. Y. y Pett, W. L., 2003. Effects of dietary transgenic *Bt* corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *Journal of Apicultural Research*, **42**, 77-81.

- Hanley, N., Breeze, T. D., Ellis, C. y Goulson, D., 2014. Measuring the economic value of pollination services: Principles, evidence and knowledge gaps. *Ecosystem Services*.
- Harris, J. W., Harbo, J. R., Villa, J. D. y Danka, R. G., 2003. Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata : Varroidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera : Apidae) during a 10-year period. *Environmental Entomology*, **32**, 1305-1312.
- Henderson, C. E., Steiner, J. y Alexander, B., 1986. *Varroa jacobsoni* life-cycle. *American Bee Journal*, **126**, 117-119.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. y Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, **336**, 348-350.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R. y Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol*, **94**, 211-217.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E. G., Gonzalez-Porto, A. V., Barrios, L., del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jimenez, J. J., Palencia, P. G. y Meana, A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, **10**, 2659-2669.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Martinez-Salvador, A., Garrido-Bailon, E., Virginia Gonzalez-Porto, A., Meana, A., Luis Bernal, J., Jesus del Nozal, M. y Bernal, J., 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports*, **2**, 243-250.
- Higes, M., Meana, A., Bartolome, C., Botias, C. y Martin-Hernandez, R., 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*, **5**, 17-29.
- Higes, M., Meana, A., Suarez, M. y Llorente, J., 1999. Negative long-term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **30**, 289-292.
- Holden, C., 2006. Ecology: Report warns of looming pollination crisis in North America. *Science*, **314**, 397-397.
- Holzschuh, A., Dudenhoffer, J. H. y Tschardtke, T., 2012. Landscapes with wild bee habitats enhance pollination, fruit set and yield of sweet cherry. *Biological Conservation*, **153**, 101-107.

- Hoppe, H. y Ritter, W., 1987. Experiments using combined heat therapy to control varroa disease. *Apidologie*, **18**, 384-384.
- Howis, M. y Nowakowski, P., 2009. *Varroa destructor* removal efficiency using beevital hive clean preparation. *Journal of Apicultural Science*, **53**, 15-20.
- Ifantidis, M. D., 1983. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honey bee brood cells. *Journal of Apicultural Research*, **22**, 200–206.
- Ifantidis, M. D., 1988. Some aspects of the process of *Varroa-jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis-mellifera*) brood cells. *Apidologie*, **19**, 387-396.
- Ifantidis, M. D., 1990. Re-examination of some parameters concerning reproduction of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. .
- Indorf, A., Bogdanov, S., Kilchenmann, V. y Maquelin, C., 1995. Apilife Var - a New Varroacide with Thymol as the Main Ingredient. *Bee World*, **76**, 77-83.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M. D., Andrew, R., Murillo, J., Ferre, J. y Caballero, P., 1998. Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Syst Appl Microbiol*, **21**, 97-106.
- Jeffree, E. P., 1955. Observations on the decline and growth of honey bee colonies. *Journal of Economic Entomology*, **48**, 723-726.
- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A. y Frazier, M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity - USA. *Apidologie*, **41**, 312-331.
- Johnson, R. M., Pollock, H. S. y Berenbaum, M. R., 2009. Synergistic Interactions Between In-Hive Miticides in *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology*, **102**.
- Kanbar, G. y Engels, W., 2003. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research*, **90**, 349-354.
- Kearns, C. A., Inouye, D. W. y Waser, N. M., 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**, 83-112.
- Korpela, S., Aarhus, A., Fries, I. y Hansen, H., 1992. *Varroa-jacobsoni* Oud in cold climates - population-growth, winter mortality and influence on the survival of honey-bee colonies. *Journal of Apicultural Research*, **31**, 157-164.

- Kralj, J., Brockmann, A., Fuchs, S. y Tautz, J., 2007. The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, **193**, 363-370.
- Kralj, J. y Fuchs, S., 2006. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*, **37**, 577-587.
- Kraus, B. y Velthuis, H. H. W., 1997. High humidity in the honey bee (*Apis mellifera* L) brood nest limits reproduction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Naturwissenschaften*, **84**, 217-218.
- Kremen, C. y Ricketts, T., 2000. Global perspectives on pollination disruptions. *Conservation Biology*, **14**, 1226-1228.
- Kuenen, L. P. S. y Calderone, N. W., 1997. Transfers of Varroa mites from newly emerged bees: Preferences for age- and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, **10**, 213-228.
- Laurent, J. C. y Santas, L., 1987. Study of the larval development of *Varroa-jacobsoni*. *Apidologie*, **18**, 53-60.
- Le Conte, Y. y Arnold, G., 1987. The Effects of Bee Age and of Heat on the Parasite Behavior of *Varroa-jacobsoni*. *Apidologie*, **18**, 305-320.
- Le Conte, Y. y Arnold, G., 1988. A Study of the Thermopreferendum of *Varroa-jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **19**, 155-164.
- Le Conte, Y., Arnold, G. y Desenfant, P., 1990. Influence of brood temperature and hygrometry variations on the development of the honey-bee ectoparasite *Varroa-jacobsoni* (Mesostigmata, Varroidae). *Environmental Entomology*, **19**, 1780-1785.
- Le Conte, Y., Ellis, M. y Ritter, W., 2010. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, **41**, 353-363.
- Le Conte, Y. y Navajas, M., 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, **27**, 499-510.
- Lindquist, E. E., Krantz, G. W. y Walter, D. E., 2009. Classification. In: Krantz&Walter (ed.), *A Manual of Acarology, Third Edition*. Texas Tech University Press, Lubbock.

- Lodesani, M., Colombo, M. y Spreafico, M., 1995. Ineffectiveness of Apistan(r) Treatment Against the Mite *Varroa-jacobsoni* Oud in several Districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*, **26**.
- Lodesani, M., Costa, C., Serra, G., Colombo, R. y Sabatini, A. G., 2008. Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, **39**.
- Lodesani, M., Crailsheim, K. y Moritz, R. F. A., 2002. Effect of some characters on the population growth of mite *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* L colonies and results of a bi-directional selection. *Journal of Applied Entomology*, **126**, 130-137.
- Loucif-ayad, W., Aribi, N., Smagghe, G. y Soltani, N., 2010. Comparative effectiveness of some acaricides used to control *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Algeria. *African Entomology*, **18**, 259-266.
- Llorens, L., Gil, L. y Tébar, F. J., 2007. *La vegetació de l'illa de Mallorca. Bases per a la interpretació i gestió d'hàbitats.*, p. 261.
- Llorente, J., 2003. *Principales enfermedades de las abejas*, p. 158.
- Maggi, D. M., Ruffinengo, R. S., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I. y Eguaras, J. M., 2011. Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa* mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*, **108**, 815-821.
- MAGRAMA, 2012. Caracterización del sector apícola español.
- MAGRAMA, S. G. d. P. G. d., 2014. El sector de la miel en cifras principales indicadores económicos en 2013.
- Malone, L. A., Todd, J. H., Burgess, E. P. J. y Christeller, J. T., 2004. Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie*, **35**, 655-664.
- Marcangeli, J. A., Eguaras, M. J. y Fernandez, N. A., 1992. Reproduction of *Varroa-jacobsoni* (Acari, Mesostigmata, Varroidae) in Temperate Climates of Argentina. *Apidologie*, **23**.
- Marchetti, S. y Barbattini, R., 1984. Comparative Effectiveness of Treatments used to Control *Varroa-jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **15**.

- Martel, A.-C., Zeggane, S., Aurieres, C., Drajnudel, P., Faucon, J.-P. y Aubert, M., 2007. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar (R) or Asuntol (R) 50. *Apidologie*, **38**.
- Martin, S. J., 1994. Ontogeny of the mite *Varroa-jacobsoni* Oud in worker brood of the honeybee *Apis-mellifera* L under natural conditions. *Experimental & Applied Acarology*, **18**, 87-100.
- Martin, S. J., 1995. Ontogeny of the mite *Varroa-jacobsoni* Oud in drone brood of the honeybee *Apis-mellifera* L under natural conditions. *Experimental & Applied Acarology*, **19**, 199-210.
- Mason, R., Tennekes, H. A., Sanchez-Bayo, F. y Epsen, P. U., 2013. Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. *J Environ Immunol Toxicol*, **1**, 3-12.
- Mathieu, L. y Faucon, J. P., 2000. Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. *Journal of Apicultural Research*, **39**, 155-158.
- Maul, V., Klepsch, A. y Assmannwerthmuller, U., 1988. The trapping comb technique as part of bee management under strong infestation by *Varroa-jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **19**, 139-154.
- Milani, N., 1995. The resistance of *Varroa-jacobsoni* Oud to pyrethroids - a laboratory assay. *Apidologie*, **26**, 415-429.
- Milani, N. y Nannelli, R., 1988. The tarsal sense organ in *Varroa jacobsoni* Oud.: SEM observations. In Conference Name|, Conference Location|, Year of Conference|, p. Pages|.
- Mommaerts, V., Jans, K. y Smagghe, G., 2010. Impact of *Bacillus thuringiensis* strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Manag Sci*, **66**, 520-525.
- Moretto, G., Goncalves, L. S. y DeJong, D., 1997. Relationship between food availability and the reproductive ability of the mite *Varroa jacobsoni* in Africanized bee colonies. *American Bee Journal*, **137**, 67-69.
- Moretto, G., Goncalves, L. S., Dejong, D. y Bichuette, M. Z., 1991. The Effects of Climate and Bee Race on *Varroa-jacobsoni* Oud Infestations in Brazil. *Apidologie*, **22**, 197-203.
- Morse, R. A. y Calderone, N. W., 2000. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. Report Cornell University., Ithaca, New York.

- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., Vanengelsdorp, D. y Pettis, J. S., 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One*, **5**, e9754.
- Muñoz, I., Garrido-Bailon, E., Martin-Hernandez, R., Meana, A., Higes, M. y De la Rúa, P., 2008. Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies. *Journal of Apicultural Research*, **47**, 310-313.
- Murilhas, A. M., 2002. *Varroa destructor* infestation impact on *Apis mellifera carnica* capped worker brood production, bee population and honey storage in a Mediterranean climate. *Apidologie*, **33**, 271-281.
- Mutinelli, F., Baggio, A., Capolongo, F., Piro, R., Prandin, L. y Biasion, L., 1997. A scientific note on oxalic acid by topical application for the control of varroosis. *Apidologie*, **28**, 461-462.
- Nannelli, R., 1985. Ulteriori conoscenze sulla morfologia e lo sviluppo, della larva e delle ninfe di *Varroa jacobsoni* Oud (Mesostigmata: Varroidae). *Estratto da REDIA*, **LXVII**, 287-303.
- Nasr, M. E., Thorp, R. W., Tyler, T. L. y Briggs, D. L., 1990. Estimating Honey-Bee (Hymenoptera, Apidae) Colony Strength by a Simple Method - Measuring Cluster Size. *Journal of Economic Entomology*, **83**, 748-754.
- Nazzi, F., Brown, S. P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E. y Pennacchio, F., 2012. Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. *Plos Pathogens*, **8**.
- Neumann, P. y Carreck, N. L., 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 1-6.
- Neumann, P., Evans, J. D., Pettis, J. S., Pirk, C. W. W., Schafer, M. O., Tanner, G. y Ellis, J. D., 2013. Standard methods for small hive beetle research. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 32.
- Nguyen, B. K., Saegerman, C., Pirard, C., Mignon, J., Widart, J., Tuirionet, B., Verheggen, F. J., Berkvens, D., De Pauw, E. y Haubruge, E., 2009. Does Imidacloprid Seed-Treated Maize Have an Impact on Honey Bee Mortality? *Journal of Economic Entomology*, **102**, 616-623.
- O'Callaghan, M., Glare, T. R., Burgess, E. P. J. y Malone, L. A., 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annual Review of Entomology*.

- OIE, 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). **Volumen I**.
- OIE, 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008.
- Oldroyd, B. P., 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**, 312-315.
- Oldroyd, B. P., 2007. What's killing American honey Bees? *Plos Biology*, **5**, 1195-1199.
- Padilla-Alvarez, F. y Flores-Serrano, J. M., 2011. Selection of honeybee colonies (*Apis mellifera iberiensis*) tolerant to *Varroa destructor* *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, **1**, 449-452
- Patzold, S. y Ritter, W., 1989. Studies on the Behavior of the Honeybee Mite, *Varroa-jacobsoni* O, in a Temperature-Gradient. *Journal of Applied Entomology*, **107**, 46-51.
- Pettis, J. S., vanEngelsdorp, D., Johnson, J. y Dively, G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, **99**, 153-158.
- Pigott, C. R. y Ellar, D. J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev*, **71**, 255-281.
- Pohorecka, K., Bober, A., Skubida, M. y Zdanska, D., 2011. Epizootic Status of Apiaries with Massive Losses of Bee Colonies (2008-2009). *Journal of Apicultural Science*, **55**.
- Porcar, M., Gomez, F., Gruppe, A., Gomez-Pajuelo, A., Segura, I. y Schroder, R., 2008. Hymenopteran specificity of *Bacillus thuringiensis* strain PS86Q3. *Biological Control*, **45**, 427-432.
- Ramirez-Romero, R., Chaufaux, J. y Pham-Delegue, M. H., 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie*, **36**, 601-611.
- Ramirez-Romero, R., Desneux, N., Decourtye, A., Chaffiol, A. y Pham-Delegue, M. H., 2008. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**, 327-333.

- Ramm, D. y Böckeler, W., 1989. Ultrastrukturelle Darstellungen der Sensillen in der Vordertarsengrube von *Varroa jacobsoni* (Acari). *Zool. JB. Anat.*, **119**, 221–236.
- Rath, W., 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **30**, 97-110.
- Rehm, S. M. y Ritter, W., 1989. Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa-jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie*, **20**, 339-343.
- Ribiere, M., Olivier, V., Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Drajnudel, P., Faucon, J. P., Thiery, R. y Chauzat, M. P., 2008. The collapse of bee colonies: the CCD case ("Colony collapse disorder") and the IAPV virus (Israeli acute paralysis virus). *Virologie*, **12**, 319-322.
- Rickli, M., Guerin, P. M. y Diehl, P. A., 1992. Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa-jacobsoni* on a servosphere. *Naturwissenschaften*, **79**, 320-322.
- Rinderer, T. E., Deguzman, L. I., Kulincevic, J. M., Delatte, G. T., Beaman, L. D. y Bucu, S. M., 1993. The breeding, importing, testing and general-characteristics of yugoslavian honey-bees bred for resistance to *Varroa-jacobsoni*. *American Bee Journal*, **133**, 197-200.
- Ritter, W. y Dejong, D., 1984. Reproduction of *Varroa-jacobsoni* O in Europe, the Middle-East and Tropical South-America. *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie-Journal of Applied Entomology*, **98**, 55-57.
- Rivas-Martínez, S., 1995. Clasificación Bioclimática de la Tierra. *Folia Botánica Matritensis*, **16**.
- Robinson, W. S., Nowogrodzki, R. y Morse, R. A., 1989. The value of honey bees as pollinators of united-states crops. *American Bee Journal*, **129**, 411-423.
- Rose, R., Dively, G. P. y Pettis, J., 2007. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie*, **38**, 368-377.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. y Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S96-S119.
- Rosenkranz, P. y Engels, W., 1994. Genetic and Environmental-Influences on the Duration of Preimaginal Worker Development in Eastern (*Apis-cerana*) and

- Western (*Apis-mellifera*) Honey-Bees in Relation to Varroatosis. *Revista Brasileira de Genetica*, **17**, 383-391.
- Rosselló, V. M., Fornós, J. J. y Gómez-Pujol, L., 2003. Introducción a la Geografía Física de Menorca. *Societat d'Història Natural de les Illes Balears*, **10**, 232.
- Roulston, T. H. y Goodell, K., 2011. The Role of Resources and Risks in Regulating Wild Bee Populations. In: M. R. Berenbaum, R. T. Cardé y G. E. Robinson (eds.), *Annual Review of Entomology*, Vol 56. Annual Reviews, Palo Alto.
- Sammataro, D., Untalan, P., Guerrero, F. y Finley, J., 2005. The resistance of varroa mites (Acari : Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology*, **31**, 67-74.
- Satta, A., Floris, I., Eguaras, M., Cabras, P., Garau, V. L. y Melis, M., 2005. Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean area. *Journal of Economic Entomology*, **98**, 267-273.
- Schafer, M. O., Ritter, W., Pettis, J. S. y Neumann, P., 2010. Winter Losses of Honeybee Colonies (Hymenoptera: Apidae): The Role of Infestations With *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) and *Varroa destructor* (Parasitiformes: Varroidae). *Journal of Economic Entomology*, **103**, 10-16.
- Shaw, K. E., Davidson, G., Clark, S. J., Ball, B. V., Pell, J. K., Chandler, D. y Sunderland, K. D., 2002. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari : Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. *Biological Control*, **24**, 266-276.
- Shimanuki, H., Calderone, N. W. y Knox, D. A., 1994. Parasitic mite syndrome - the symptoms. *American Bee Journal*, **134**, 827-828.
- Skaug, H., Fournier, D., Nielsen, A., Magnusson, A. y Bolker, B., 2013. Generalized Linear Mixed Models using AD Model Builder. R package version 0.7.5.
- Skerl, M. I. S., Nakrst, M., Zvokelj, L. y Gregorc, A., 2011. The acaricidal effect of flumethrin, oxalic acid and amitraz against *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera carnica*) colonies. *Acta Veterinaria Brno*, **80**, 51-56.
- Smith, K. M., Loh, E. H., Rostal, M. K., Zambrana-Torrel, C. M., Mendiola, L. y Daszak, P., 2013. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *Ecohealth*, **10**, 434-445.
- Steiner, J., Diehl, P. A. y Vlimant, M., 1995. Vitellogenesis in *Varroa-jacobsoni*, a parasite of honey-bees. *Experimental & Applied Acarology*, **19**, 411-422.

- Steiner, J., Dittmann, F., Rosenkranz, P. y Engels, W., 1994. The 1st gonocycle of the parasitic mite (*Varroa-jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey-bee (*Apis-mellifera-carnica*). *Invertebrate Reproduction & Development*, **25**, 175-183.
- Strachecka, A., Sawicki, M., Borsuk, G., Olszewski, K., Paleolog, J., Bajda, M. y Chobotow, J., 2013. Use of acaricides for fighting *Varroa destructor* mites in bee colonies: efficiency and risk. *Medycyna Weterynaryjna*, **69**, 219-224.
- Tautz, J. r., 2008. *The buzz about bees : biology of a superorganism*, p. 284 p. Springer, Berlin.
- Thompson, H. M., 2010. Risk assessment for honey bees and pesticides - recent developments and 'new issues'. *Pest Management Science*, **66**, 1157-1162.
- Thompson, H. M., Brown, M. A., Ball, R. F. y Bew, M. H., 2002. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie*, **33**, 357-366.
- Topolska, G., Gajda, A., Pohorecka, K., Bober, A., Kasprzak, S., Skubida, M. y Semkiw, P., 2010. Winter colony losses in Poland. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 126-128.
- Torne-Noguera, A., Rodrigo, A., Arnan, X., Osorio, S., Barril-Graells, H., da Rocha, L. C. y Bosch, J., 2014. Determinants of Spatial Distribution in a Bee Community: Nesting Resources, Flower Resources, and Body Size. *Plos One*, **9**, 10.
- Trouiller, J., 1998. Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in western Europe. *Apidologie*, **29**.
- van der Zee, R., Gray, A., Holzmann, C., Pisa, L., Brodschneider, R., Chlebo, R., Coffey, M. F., Kence, A., Kristiansen, P., Mutinelli, F., Nguyen, B. K., Noureddine, A., Peterson, M., Soroker, V., Topolska, G., Vejsnaes, F. y Wilkins, S., 2013. Standard survey methods for estimating colony losses and explanatory risk factors in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, **52**.
- van Dooremalen, C., Stam, E., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J., van Langevelde, F. y Blacquiere, T., 2013. Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of insect physiology*, **59**, 487-493.
- van Engelsdorp, D., Hayes, J., Jr., Underwood, R. M. y Pettis, J., 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One*, **3**, e4071.

- VanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Donovall, L., Mullin, C., Frazier, M., Frazier, J., Tarpy, D. R., Hayes, J. y Pettis, J. S., 2009a. "Entombed Pollen": A new condition in honey bee colonies associated with increased risk of colony mortality. *Journal of Invertebrate Pathology*, **101**, 147-149.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D. R. y Pettis, J. S., 2009b. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *Plos One*, **4**, e6481-e6481.
- vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R. M. y Pettis, J. S., 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 7-14.
- vanEngelsdorp, D. y Meixner, M. D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S80-S95.
- Varis, A. L., Ball, B. V. y Allen, M., 1992. The Incidence of Pathogens in Honey-Bee (*Apis-mellifera* L) Colonies in Finland and Great-Britain. *Apidologie*, **23**.
- Vilà, J. y Vallès, R., 2001. Bibliografía para el estudio geográfico de unas islas Mediterráneas: Las Pityusas (Eivissa y Formentera) *Territoris*, **3**, 241-275.
- Wallner, K., 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, **30**, 235-248.
- Wilson, E. O., 1986. Honeybee ecology - a study of adaptation in social-life -. *Science*, **231**, 625-626.
- Williams, G. R., Tarpy, D. R., vanEngelsdorp, D., Chauzat, M. P., Cox-Foster, D. L., Delaplane, K. S., Neumann, P., Pettis, J. S., Rogers, R. E. y Shutler, D., 2010. Colony Collapse Disorder in context. *Bioessays*, **32**, 845-846.
- Williamson, S. M. y Wright, G. A., 2013. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *J Exp Biol*, **216**, 1799-1807.
- Withgott, J., 1999. Pollination migrates to top of conservation agenda - A collaborative effort on migratory pollinators aims to increase research, education, and conservation efforts. *Bioscience*, **49**, 857-862.
- Wu, J. Y., Smart, M. D., Anelli, C. M. y Sheppard, W. S., 2012. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues

- exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *J Invertebr Pathol*, **109**, 326-329.
- Yang, E. C., Chuang, Y. C., Chen, Y. L. y Chang, L. H., 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol*, **101**, 1743-1748.
- Zakar, E., Javor, A. y Kusza, S., 2014. Genetic bases of tolerance to *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*, **61**, 207-215.
- Ziegelmann, B., Lindenmayer, A., Steidle, J. y Rosenkranz, P., 2013. The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. *Apidologie*, **44**, 314-323.

Anexo I

Patterns of *Varroa destructor* infestation depend on bee host abundance, availability of natural resources for bees and climate across apiaries on a Mediterranean Island

Patterns of *Varroa destructor* infestation depend on bee host abundance, availability of natural resources for bees and climate across apiaries on a Mediterranean Island

M. MAR LEZA*¹, MIGUEL A. MIRANDA-CHUECA¹, BETHAN V. PURSE²

¹Laboratorio de Zoología. Departamento de Biología, Universidad de les Illes Balears, Cra. de Valldemossa, km 7.5, 07122, Palma, Spain.

²NERC Centre for Ecology & Hydrology, Benson Lane, Crowmarsh Gifford, Oxfordshire, UK, OX10 8BB

* Corresponding author: Maria del Mar Leza. E-mail adress: mar.leza@uib.es.
Telephone number: (+34) 971 17 31 55.

Abstract

Varroa destructor (Acari: Varroidae) is currently one of the greatest threats to apiculture and infestation levels and impacts vary widely among apiaries and between years. This study examines the role of host density, natural resource availability for bees, management and climate in driving spatial and annual variability in the abundance of *V. destructor*, and the occurrence of colony losses, recorded in apiaries across a Mediterranean island over a two-year period, using a hierarchical generalized linear model framework.

Whilst the seasonal pattern of *Varroa* abundance was bimodal, with a large peak in spring and a smaller peak in summer/autumn, bee colony losses were concentrated in autumn and winter (76% of annual losses). Abundance patterns of *Varroa* were best explained by models combining host, climate and resource availability factors. A key novel finding was that low availability of natural flowering resources lead to high levels of infestation of *Varroa*, highlight the importance of preserving natural resources around apiaries for maintenance of pollination services in the landscape. *Varroa* abundance was also found to increase as bee densities increased probably due to the greater brood availability at high densities. Climate impacts, namely that *Varroa* abundance increases as temperatures decrease and decreases as relative humidity increases, were consistent with previous empirical studies though mechanisms remain poorly understood. Anti-varroa treatments were only found to impact *Varroa* infestation levels in the second six months of the year in which organic treatments outperformed chemical treatments. The lack of impact of treatments compared to other factors may be attributed to poor seasonal targeting or treatment and emergence of resistance to longer used chemical treatments. Empirical research on optimal seasonal timing and combinations of treatments, as well as impacts of climate and resource availability on natural dynamics of bees and *Varroa* in different climate zones is urgently required.

Introduction

Rapid and substantial losses have been observed in honeybee (*Apis mellifera* Linnaeus) populations worldwide over the last decade (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8). These losses have been attributed to a combination of different potential causes, such as diseases (*Varroa destructor*, *Nosema ceranae* and virus), poor nutrition and frequent applications of insecticides to control pests (8), (9), (10), (11). Honeybees contribute to food security and their extinction would represent a serious biological imbalance. Pollination is a crucial process to preserve ecosystems (12) and the honeybee is one of most effective pollinators of wild flowers and cultivated crops, carrying out 60-95 % of overall pollination in some areas (13). Moreover, the management of honeybees to produce honey, wax, royal jelly, pollen, venom and propolis is socially, culturally and economically important.

The hemophagous mite *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000 (Acari: Varroidae) is currently one of the greatest threats to apiculture having high impact on health of hives with resulting economic losses (14). *Varroa* feeds on honeybee blood, but also impairs bee immunity and transmits a number of viruses (ref). This mite is distributed worldwide (with the notable exception of Australia (14), (15)). Establishment and spread of *Varroa* is exacerbated by the lack of clinical symptoms at low infestation rates, leading to late detection. In the absence of efficacious control methods, the colonies of *A. mellifera* can collapse within a few years following infection in temperate climates (16), (17). Population dynamics differ between temperate and subtropical/tropical areas, with lower population growth of *Varroa* under tropical conditions (14), (18), (19), (20), (21), (22).

This ectoparasite infects all the stages of honeybee, having a phoretic phase on adult bees and a reproductive phase on brood cells. The population growth is variable and depends on the features of the host (density and seasonal availability of brood, proportion of drones in the brood, level of defense behavior of the bees, and swarming phenomenon) and the parasite (reproductive capacity) (14).

Factors external to the hive, including temperature, humidity or availability of pollen and nectar, can also indirectly impact on *Varroa* populations (14). The precise impacts of these indirect factors on *Varroa* populations parameters are rarely studied and still unknown (14) though it is widely assumed that population dynamics of *Varroa* depends on the climate (18), (20), (23), (24), (25), (26).

A recent review of existing population models for *Varroa* and honeybee colonies (Becher, et al. 2013), highlighted the need for new integrated models that incorporate the impact that multiple interacting stressors may have on the hive, including internal factors such as *Varroa* infestation or management, and external factors, such as floral availability or weather. Amongst existing models, none integrate colony dynamics with pathology and foraging dynamics of bees in heterogeneous landscapes and few incorporate empirical field data (27).

This study examines the role of host density, natural resource availability for hosts, management and climate in driving spatial and annual variability in abundance of *Varroa* recorded in apiaries across a Mediterranean island over a two-year period. The influence of *Varroa* abundance and these environmental factors on the likelihood of honeybee colony collapse is then examined. The following specific hypotheses were tested:

- 1) Since the population growth of *Varroa* depends on bee brood availability which is linked to bee abundance (14), we expect *Varroa* abundance to increase with colony abundance. We expect colony loss to be more likely at high levels of *Varroa* abundance.

- 2) Linked to 1, we expect sampled *Varroa* abundance to be at low levels following a colony loss since the colony is replaced with other bees and some months will be required for bees to increase the available brood and for *Varroa* to invade and/or re-establish.
- 3) If hives are treated correctly with anti-varroa products, then *Varroa* population will be reduced. Though the duration of efficacy is currently unknown we expect *Varroa* abundance to be negatively related to treatment on a monthly but not an annual basis.
- 4) Hive conditions and fitness of individual bees are impacted by the availability of pollen and nectar (14). For example van Dooremalen (28) demonstrated that reduced pollen availability, in the form of beebread for the nurse bees, resulted in low adult weight and abdominal protein levels. We hypothesize that low availability of natural flowering resources (linked to the availability of pollen and nectar) will make bee colonies less resilient to infestation of *Varroa*. Thus hives with a lower proportion of natural resources in surrounding landscapes will have higher average abundance of *Varroa* and be more likely to suffer colony loss.
- 5) Though mechanisms are poorly understood, a preference for lower temperatures by *Varroa* mites, measured both within the hive and external to the hive (20), (29), (30), (31), (32) has been observed in empirical studies. We hypothesise that if ambient temperature decreases, then the abundance of *Varroa* will increase and colony loss is more likely to occur.
- 6) *Varroa* reproduction has been observed to drop significantly when the relative humidity measured inside the hive is high (26). Consistent with this Harris (33) detected a negative relationship between ambient relative humidity and *Varroa* annual population growth rate. Moreover, Kraus and Velthuis (26) observed that in conditions of high ambient temperatures and high relative humidity bees are unable to control hive conditions and maintain brood availability leading to low abundance of *Varroa*. Overall, we expect that as ambient humidity relative humidity increases, *Varroa* abundance will decrease.

Material and Methods

Study sites

The trials were carried out in colonies of *Apis mellifera iberiensis*, kept in Langstroth standard hives, naturally infested with *Varroa destructor* mites on the island of Majorca (the major of Balearic archipelago). Ten apiaries (numbered 1 to 10) were sampled for only the first study year (from December 2009 to December 2010) and five apiaries (number 2, 3, 6, 9 and 10) were sampled throughout the two years (between January 2010 to December 2011).

Mallorca has a temperate climate (39°30'N, 03°0'E), being wetter in mountainous areas (Serra de Tramuntana, Serres de Llevant zones) in the North and semi-arid in the central plain in the South (es Raiguer, es Pla and es Migjorn zones). Ten apiaries were selected, comprising two apiaries in each of these five geomorphological zones, as indicated in Figure 1.

Sampling method

In every apiary, five hives were monitored. Each hive was equipped with a modified bottom board, provided with a removable tray where a vaseline sticky paper (34), (35), (36) was inserted and removed after four days, once a month, in order to count the natural mite fall (34) and to count the frames occupied by bees (as a measure of bee population size (37), (38)). We recorded the month in which beekeepers decided to treat their hives with a chemical or organic anti-varroa product.

A total of 900 samples were analyzed (600 in the first and 300 in the second year of study).

Environmental data

Climatic data was obtained from weather stations located 0-15 km distance from the apiaries (Spanish Weather Service - AEMET). See Table S1 for coordinates of weather stations. The proportion of the area covered by natural resources in a 3-km surrounding apiaries was calculated from the Land Use dataset (Environment Agency, Government of the Balearic Islands) at a resolution of 5 m using ArcGIS Version 10.1 (ESRI, Inc., Redlands, CA, U.S.A.).

Statistical analysis

The relationship between *Varroa* abundance and environmental predictors was examined over different time periods using Generalized Linear Mixed Models (GLMM) fitted with a negative binomial error structure using the glmmADMB package (39), (40) in the R software program (R Development Core Team, 2013). The latter error structure was preferred over a poisson error structure because significant overdispersion was detected in the residuals of the poisson GLMM.

Annual abundance of *Varroa* and abundance in six month periods (January to June and July to December) was separately analysed as dependent variables in relation to eight biological, climate or landscape variables as indicated in Table 1. The climate and bee or *Varroa* abundance predictors were averaged and the presence/absence of colony loss or treatment were scored within the same periods as for the dependent variable i.e. no lagged effects were considered. To account for potential non-independence of observations between hives, apiaries, climate zones, these factors were considered as random effect terms. The best combination of these random effect terms was selected on the basis of which one produced the lowest value of Akaike's Information Criterion (AIC, (41)) in a global model containing all eight environmental variables. Having selected the most appropriate random effects, all possible

combinations of eight predictors were fitted and the model with the lowest AIC was selected, unless the AIC of this model was within 2 AIC units of the null model with no predictors, in which case the null model was preferred. A wider range of temperature, precipitation and humidity variables were initially considered but, due to the high degree of collinearity between them (indicated where Pearson's correlation test statistic values exceeded 0.7 or were lower than -0.7), a single temperature variable (Annual Minimum Temperature) and a single moisture related variable (Mean Humidity) was retained for further analysis. Amongst the other variables, the availability of natural flowering resources was highly correlated with the coverage of unproductive land covers so model combinations including both of these variables were not fitted.

Monthly abundance of *Varroa* was again modelled using a negative binomial GLMM in relation to monthly values of climate, biological and treatment variables in addition to the static resource variables). Since we expect time lags in the response of *Varroa* populations to environmental factors, lagged effects of the previous two month values of climate, *Varroa* and bee abundance, population loss and treatment were considered rather than values observed in the same month (lag 0).

Again, all possible combinations of fourteen predictors were considered and the best models selected on the basis of AIC. To assess the overall goodness-of-fit of the final abundance model Pearson correlations between observed and predicted abundance values were calculated. In monthly models, autocorrelation plots of model residuals were used to assess whether temporal autocorrelation was fully accounted for.

The likelihood of colony loss was modelled on a monthly basis in relation to lagged effects of the previous two month values of climate, *Varroa* and bee abundance and treatment and the static landscape predictors using a GLMM with Bernoulli errors (special case of binomial where there is a single observation of an event per sample unit). Again, all possible combinations of twelve predictors were considered and the best models were selected on the basis of AIC. Model accuracy was assessed by calculating the proportion of times a loss or lack of loss was correctly predicted and by calculating the Area Under the Curve (AUC) (42) statistic. AUC ranges between 0.5 and 1.0, with 0.5 indicating no discrimination ability (here between loss or no loss); values below 0.7 are low, values between 0.7 and 0.9 are useful in some cases, and values > 0.9 indicate high discrimination (43). Again model residuals were examined for evidence of temporal autocorrelation.

Table 1. Description of explanatory variables considered in models of *Varroa* abundance and honey bee colony loss.

Category of variable	Variable (Abbreviation)	Description and units
Biological	<i>Varroa</i> abundance (V)	Number of fallen mites averaged across 4 sample days per month. Note for period analyses, the monthly values are averaged across six months or a year as appropriate.
	Bee abundance (B)	Number of frames occupied by bees averaged across 4 sample days, per month, as a proportion of the ten frames that could potentially be occupied by bees. Note for period analyses, the monthly values are averaged across six months or a year as appropriate.
Climate	Absolute minimum temperature (AMIT)	Minimum daily temperature measured during each month of study (°C).
	Mean humidity (MH)	Average of the daily mean humidity of each month of study (%).
Landscape	Percentage of area in a 3-km surrounding site covered by natural resources (Nat_Res)	These resources included Holm oak, almond tree, riverbank forest, mixed forest, citrus, garrigue, carob, irrigated herbaceous, dry herbaceous, vegetable patch, garden, olive tree, pasture, pine, wild olive tree, vineyard, grove other fruits
	Percentage of area in a 3-km surrounding site covered by unproductive land covers (Unp_Res)	These included Buildings, water, railways, dunes.
Management	Treatment (Treat)	Coded as 1 if chemical treatment (Apivar) was applied during a month or period, and 2 if organic treatment (Apiguard) was applied or as 0 if no such treatment occurred

Results

Seasonal patterns in *Varroa* and bee populations

The curve of abundance *Varroa* throughout the year was bimodal, with two peaks, one in spring and the other in summer/autumn, of which the spring peak was the largest in both study years (Figure 2a). However, the timing of the second peak was variable between years, occurring in September in 2010, but earlier in June in 2011 (Figure 2a). The highest **average number of fallen mites (NFM)** was obtained in 2010 March (103.59 NFM), and the lowest NFM was achieved during 2011 September (6.55 NFM). The abundance of *Varroa* was higher during 2010, with a mean NFM of 52.36 ± 6.21 in 2010, and a mean of 39.86 ± 7.83 NFM in 2011.

Regarding the bee host dynamics, the **average number of frames occupied with bees (NFB)** remained constant during the year, except the last two months of both years, when the population was lower, with less than 6.5 NFB (Figure 2b). The abundance of bees is again higher in 2010 (mean of NFB of 7.99 ± 0.30) than in 2011 (mean of NFB of 7.20 ± 0.20).

Figure 2c shows that **honeybee losses** were concentrated during autumn and winter (September to February) each year, when 77.5% of losses occurred (31 colonies were lost during two years). The season with least losses was summer (June to August), when only 5% of losses occurred (2 colonies in two years).

The seasonal pattern of monthly **minimum temperatures** was quite similar between the study years, falling below zero for four months in the winter 2009/2010 and two months in winter 2010/2011, and rising above 12°C in summer earlier in the second (July 2011) than the first (August 2010) study year (Figure 2d). High **mean monthly relative humidity** (> 78%) occurred in the winter months (November to January). In both years, mean monthly relative humidity was lower than 70% in the period from May to August (Figure 2e).

There was no consistent seasonal pattern in when beekeepers chose to apply **anti-varroa treatments** (Figure 2f). During 2010, December was the month in which the most hives were treated (29.41% of the total applied treatments). During 2011, the most treatments were applied in March and October (28.57% of all treatments applied in each of these months).

Environmental effects on *Varroa* abundance

Hive random effect was the best combination of random effects in a global environmental model for all different dependent variables and this effect was included in all models during variable selection (supplementary information table S2).

The best performing models included a combination of different types of variables, including biological, landscape, climatic and management factors (Table 2).

Table 2. Top performing models for *Varroa* abundance and colony loss in different time periods together with the predictors contained in each model. Values of Log-likelihood (LogLik), AIC and δ AIC compared to the best model (shown in bold for each period). The δ AIC statistic is defined by the difference between AIC values for two nested models.

Model	N. pred.	Predictors in model	LogLik	AIC	δ AIC	
Annual <i>Varroa</i> abundance (n=75)	0	None	-358.66	723.33	20.68	
	3	B + Treat + Nat_Res	-344.33	702.65	-	
	2	B + Nat_Res	-346.63	703.25	0.60	
	4	B + Treat + Nat_Res + MH	-343.71	703.43	0.78	
	3	B + Nat_Res + MH	-345.96	703.91	1.26	
	4	B + Nat_Res + AMIT + MH	-345.41	704.82	2.17	
	3	B + Nat_Res + AMIT	-346.51	705.01	2.36	
	1	B	-351.62	711.24	8.59	
2	B + AMIT	-351.14	712.28	9.63		
Six-month <i>Varroa</i> abundance (n=75)	P1	0	none	-378.81	763.62	14.14
	(n=75)	4	B + Treat + Nat_Res + AMIT	-366.74	749.48	-
		3	Treat + Nat_Res + AMIT	-367.95	749.89	0.41
		3	B + Nat_Res + AMIT	-369.65	751.30	1.82
		2	Nat_Res + AMIT	-370.66	751.32	1.84
		5	B + Treat + Nat_Res + AMIT + MH	-366.68	751.37	1.89
		4	Treat + Nat_Res + AMIT + MH	-367.94	751.88	2.40
		4	B + Nat_Res + AMIT + MH	-369.40	752.80	3.32
	3	Nat_Res + AMIT + MH	-370.53	753.07	3.59	
	P2	0	none	-303.72	633.44	12.25
	(n=75)	4	B + Treat + Nat_Res + MH	-314.85	645.69	-
		3	B + Treat + MH	-316.42	646.84	1.15
		5	B + Treat + Nat_Res + AMIT + MH	-314.57	647.13	1.44
		4	B + Treat + AMIT + MH	-315.82	647.64	1.95
3		B + Nat_Res + MH	-321.88	655.76	10.07	
4		B + Nat_Res + AMIT + MH	-321.03	656.07	10.38	
3		B + AMIT + MH	-323.57	659.14	13.45	
2	B + Treat	-323.70	659.40	13.71		
Monthly <i>Varroa</i> abundance (n=414)	0	none	-1865.66	3737.32	81.82	
	5	V_Lag1 + B_Lag1 + AMIT_Lag1 + Nat_Res + Treat_Lag2	-1819.75	3655.50	-	
	5	V_Lag1 + B_Lag1 + MH + AMIT_Lag1 + Nat_Res	-1819.93	3655.86	0.36	
	4	V_Lag1 + AMIT_Lag1 + Nat_Res + Treat_Lag2	-1821.30	3656.60	1.10	
	4	V_Lag1 + B_Lag1 + AMIT_Lag1 + Nat_Res	-1821.54	3657.08	1.58	
	5	V_Lag1 + B_Lag1 + MH + AMIT_Lag2 + Nat_Res	-1820.59	3657.18	1.68	
	7	V_Lag1 + V_Lag2 + B_Lag1 + MH + AMIT_Lag1 + Nat_Res + Treat_Lag2	-1818.60	3657.20	1.70	
	5	V_Lag1 + AMIT_Lag1 + AMIT_Lag2 + Nat_Res + Treat_Lag2	-1820.71	3657.42	1.92	
5	V_Lag1 + MH + AMIT_Lag1 + Nat_Res + Treat_Lag2	-1820.72	3657.44	1.94		

Monthly colony loss (n=432)	0	none	-34.80	73.60	2.49
	3	V_Lag2 + B_Lag1 + B_Lag2	-30.56	71.11	-
	2	V_Lag2 + B_Lag1	-31.57	71.15	0.04
	1	B_Lag1	-32.59	71.18	0.07
	4	V_Lag2 + B_Lag1 + MH + Unp_Res	-29.68	71.37	0.26
	3	V_Lag2 + B_Lag1 + MH	-30.78	71.56	0.45
	4	V_Lag2 + B_Lag1 + B_Lag2 + MH	-29.84	71.69	0.58
	2	B_Lag1 + MH	-31.91	71.82	0.71
	3	V_Lag2 + B_Lag1 + Unp_Res	-30.91	71.82	0.71

B: Bee abundance, V: *Varroa* abundance, AMIT: Absolute Minimum Temperature, MH: Mean Humidity, Nat_Res: percentage of area in a 3-km surrounding site covered by natural resources, Unp_Res: percentage of area in a 3-km surrounding site covered by unproductive land covers, Treat: anti-*varroa* treatment, Lag1: value in the previous month, Lag2: value in the two previous months.

The best **annual *Varroa* model** included three significant predictors: bees, anti-*varroa* treatment and availability of natural resources (Table 2). Annual *Varroa* abundance increased as annual bee abundance increased, and host abundance was the most important predictor in the final model (i.e. lead to the highest increase in AIC when dropped from the final model, see delta AIC values in Table 3). The availability of natural resources had a significant negative impact on the annual abundance of *Varroa* i.e. *Varroa* was more abundant in apiaries surrounded by lower availability of natural flowering resources. Chemical treatment and organic treatment had significant negative impacts on annual abundance, though treatment effects were very marginal since the difference in AIC between the model without treatment and the model with treatment was less than 1 (Table 3).

Table 3. Coefficients and p values for predictors in each final model. The δ AIC statistic provides the importance of each predictor in the final model.

Final models		Pred. final model	Estimate	p value	δ AIC
Annual <i>Varroa</i> abundance (n=75)		B	0.673	< 0.0001	14.48
		Nat_Res	-0.036	< 0.0005	9.66
		Ctreat	-0.775	0.024	
		OTreat	-0.736	0.039	0.60
Six-month <i>Varroa</i> abundance	P1 (n=75)	Nat_Res	-0.048	0.003	6.51
		AMIT	-0.178	0.006	4.83
		CTreat	-0.527	0.087	1.82
		OTreat	0.028	0.941	
		B	0.176	0.120	0.41
	P2 (n=75)	B	1.041	< 0.0001	23.42
		MH	-0.177	< 0.0001	14.32
		CTreat	-1.446	0.003	10.07
		OTreat	-1.096	0.002	
		Nat_Res	-0.027	0.065	1.15

Monthly <i>Varroa</i> abundance (n=414)	V_Lag1	0.008	< 0.0001	46.86
	AMIT_Lag1	-0.045	< 0.0005	14.48
	Nat_Res	-0.087	< 0.0001	9.28
	Treat_Lag2	-0.725	0.001	1.58
	B_Lag1	0.124	0.003	1.10
Monthly colony loss (n=432)	B_Lag1	-0.504	0.028	3.43
	V_Lag2	-0.017	0.271	0.83
	B_Lag2	0.314	0.174	0.04

B: Bee abundance, V: *Varroa* abundance, AMIT: Absolute Minimum Temperature, MH: Mean Humidity, Nat_Res: percentage of area in a 3-km surrounding site covered by natural resources, CTreat: chemical treatment, OTreat: Organic Treatment, Lag1: value in the previous month, Lag2: value in the two previous months.

For the **period from January to June**, in addition to bee abundance, treatments and availability of natural resources, absolute minimum temperature had significant negative impact on *Varroa* abundance i.e. *Varroa* abundance increased as temperatures decreased. This temperature effect and that of availability of natural flowering resources was more important than the marginal effects of bees or treatment (Tables 2 and 3).

For the period **from July to December**, apart from significant effects of bees and treatment, colony losses and mean humidity both had significant negative impacts on *Varroa* abundance. i.e. *Varroa* abundance decreased when a loss had occurred in the same period and in conditions of high humidity (Tables 2 and 3). The impacts of treatment were most significantly associated with low *Varroa* abundance in this period and organic treatment had greater impacts than chemical treatment (Table 3).

In **monthly models**, *Varroa* abundance significantly increased with the abundance of both *Varroa* and bees in the previous month. Treatments applied in the two previous months (lag2), availability of natural resources and absolute minimum temperature in the previous month (lag1) had significant negative impact on *Varroa* abundance. The lagged *Varroa* abundance was of primary importance, followed by the lagged absolute minimum temperature whilst the impacts of bees and treatment were very marginal observed at a monthly time scale (Tables 2 and 3).

A high correspondence was found between observed abundance levels of *Varroa* and those predicted from our environmental models for annual and six month time periods but a lower correspondence for monthly abundance levels (Figure 3, annual Pearson's correlation coefficient $r_p = 0.738$, $p < 0.0001$; six month period January-June $r_p = 0.882$, $p < 0.0001$; six month period July-December $r_p = 0.760$, $p < 0.0001$; monthly $r_p = 0.416$, $p < 0.0001$).

Environmental effects on colony loss

The occurrence of colony losses in a given month was best predicted by a combination of *Varroa* abundance two months prior to sampling and bee abundance one and two months before, though only bee abundance one month before had statistically significant effects (Tables 2 and 3). Overall colony loss was less likely when bees were abundant one month before sampling. No other impacts of flower availability, climate or treatment were detected. This model had an Area under the Curve statistic (AUC) of 0.869 indicating a reasonable fit to the observed patterns of losses.

Discussion

Our models indicate that host and climatic factors and the availability of natural flowering resources are dominant in driving spatial and annual variability in abundance of *Varroa* and combined models best explained patterns in *Varroa* models in all periods and timescales (Table 2). For colony loss by contrast, no impacts of *Varroa* abundance, climatic factors or flowering resources could be detected, but were more likely when bee abundance was low. Here, the key factors influencing both *Varroa* abundance and bee colony loss are set in context of prior knowledge and implications for optimal *Varroa* treatment and population sampling regimes are discussed.

Considering internal hive factors affecting *Varroa* populations, as we expected (hypothesis 1), *Varroa* abundance increases significantly with bee abundance at an annual level, particularly in the second half of the year, as the population growth of *Varroa* are influenced by the bee brood availability. Adult female mites have a phoretic phase on adult bees and a reproductive phase on brood cells once these cells become available, and the duration of each reproductive phase is restricted by the duration of bee development (44). *Varroa* population growth has previously been associated with the amount of bee brood and/or the fertility of mites (33), (45), (46) but this is the first time that the link has been made with overall bee population abundance. In the first six months of the year, when bee abundance tends to be higher across hives, then the impacts of bees on *Varroa* abundance was more marginal. These impacts of abundance were detected despite the relatively crude measure of bee abundance of number of frames occupied (37), (38). Colony loss was found to reduce *Varroa* abundance significantly (Hypothesis 2) only in the second half of the year – the period of the year in which colony losses were largely concentrated. Although the bee colony is replaced with other bees, some months are required for bees to increasing the available brood and for *Varroa* to invade and/or re-establish.

Though anti-varroa treatments were significantly associated with subsequent low *Varroa* abundance (hypothesis 3), the impacts of treatment were largely marginal, including at a monthly time scale. The most significant impact of treatment was found in the second period of the year, the season in which population sizes of *Varroa* tend to

be lower. Our finding that in this period organic treatments were more effective than chemical treatments in reducing *Varroa* abundance is consistent with other study conducted in Balearic islands (Leza et al, in press) that obtained a higher efficacy for Apiguard (organic treatment) compared to Apivar (chemical treatment), both in spring (April to May) and in late autumn (November to December). Moreover, Loucif-ayad (47) found similar results in a comparative field study of treatments carried out in Algeria, Western Mediterranean, during autumn. The lower efficacy of the chemical treatment Amitraz could be linked with the emergence of resistance of *V. destructor* to this product due to the continuous application of this product during the last 30 years ((47), (48), (49), (50), (51), Leza unpublished). Thymol, an organic treatment, could represent an alternative in integrated control strategies against *V. destructor*, having a low risk of residues and resistance. A previous study (Leza unpublished) found spring to be the most appropriate period for applying anti-varroa treatment resulting in reduced abundance of *Varroa*. The inconsistency of treatment impacts on abundance in the current study could be due to the fact that more than 35% of the treatments were applied in a non-adequate period, being too early (January – February) or too late (May – June), Further experiments are needed to test the appropriate period for application of different treatment types in different climate contexts.

Considering factors external to the hive, as expected (hypothesis 4), hives with a lower proportion of natural flowering resources in surrounding landscapes had higher average abundance of *Varroa*.

Hive conditions and fitness of individual bees are impacted by the availability of pollen and nectar (14) which is closely linked to the availability of natural flowering resources in the landscape ((52), (53), (54)). For example van Dooremalen (28) demonstrated that reduced pollen availability, in the form of beebread for the nurse bees, resulted in low adult weight and abdominal protein levels. Ours is one of the first studies to find a link between low availability of natural flowering resources and levels of infestation of *Varroa*, though a significant knock-on impact of availability of natural flowering resources on the likelihood of bee colony loss could not be demonstrated.

Considering ambient climate, the finding that *Varroa* abundance increased as temperatures decreased (hypothesis 5) in the first part of the year was consistent with previous suggestions that mites prefer lower temperatures, both within the hive and external to the hive, dependent on seasons and climatic regions (20), (26), (29), (30), (31), (32), (33), (55). The mechanisms for this preference are poorly understood but maybe linked to the fact that lower brood cell temperature implies an increase of the duration of the post-capping period of worker brood development of the host and therefore the reproduction of mites could increase (32). The finding that *Varroa* abundance decreases as relative humidity increases between July and December is

consistent with previous studies linking high ambient relative humidity to low *Varroa* annual population growth rate (26). These authors observed that females of *Varroa* react to high relative humidity and almost never reproduce at levels above 80% relative humidity. Moreover, in conditions of high ambient temperatures and high relative humidity bees are unable to control hive conditions and maintain brood availability leading to low abundance of *Varroa* (26). On the other hand, other studies found reproduction of mites to be higher at 70% relative humidity than at 40% (56), or have linked diminished reproductive rates by *Varroa* mites to periods of hot and dry weather (33), suggesting that impacts of relative humidity and temperature will be strongly dependent on climatic context. An improved understanding of these climatic effects will require studies that measure *Varroa* population growth and the temperature and humidity both inside and outside the hive simultaneously across a range of climate zones. Ideally, such studies would simultaneously monitor bee population abundance including brood availability for example to quantify interactive effects between climate and host factors but this is hampered currently by the impacts of invasive methods of monitoring on bee populations.

Overall, our multi-factorial models predicted abundance patterns of *Varroa* with a high degree of accuracy within years and six monthly periods (r_p of 0.7 to 0.8), and a more moderate degree of accuracy on a monthly basis (r_p around 0.4). The explanatory power of monthly models may be substantially improved given increased availability of finer resolution climate and host data.

The finding that colony losses were concentrated in autumn and winter (September to February containing 77.5% of losses) each year is consistent with previous studies in Europe (57), the USA (3), (58), the Middle East and Japan, and some authors have attributed this seasonality to damage caused by *Varroa* (4). During fall and winter the bee population declines and the relative parasitization increases and consequently the long-living winter bees are damaged (59). In our study framework however, despite expectations, colony losses were not significantly more likely at high levels of *Varroa* abundance (hypothesis 2). The fact that *Varroa* abundance could not be quantified in the same month as a colony loss within our sampling regime may have hampered the detection of a direct link between *Varroa* abundance and colony loss. Colony losses were significantly linked to bee abundance in the previous month and it is probably that only an empirical framework in which bee population sizes could be measured more accurately across many hives subject to different environmental conditions would be capable of disentangling the effects of bee population sizes from impacts of *Varroa*, climate, flowering resources and treatment.

Our results illustrate the complexity of factors that influence both *Varroa* abundance (14), (60), (61), (62), and bee colony loss and highlight the importance of

considering these factors simultaneously in empirical and model frameworks. This approach led to the important, novel finding that low availability of natural flowering resources increases levels of infestation of *Varroa* providing a key imperative for preservation of natural resources around apiaries to support the development of healthy honey bee colonies and maintain pollination levels. Impacts of host abundance and climate on *Varroa* abundance though largely consistent with previous studies also vary between seasons and climate zones. Understanding of the interactive effects of climate and bee host factors on *Varroa* infestation levels and bee colony loss requires detailed empirical studies of bee population and *Varroa* dynamics and internal and external hive conditions in apiaries across different climate zones. The relative lack of impact of anti-*Varroa* treatments on *Varroa* infestation compared to climate, host abundance and resource availability, may be due to a combination of poor seasonal targeting or treatment and emergence of resistance to longer used chemical treatments. Though our data indicate that organic treatments may outperform chemical treatments, empirical research on optimal seasonal timing and combinations of treatments in different climate zones is urgently required.

References

1. Vanengelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes J, Jr. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: A report commissioned by the apiary inspectors of America. *American Bee Journal*. 2007;147(7):599-603.
2. Mutinelli F, Costa C, Lodesani M, Baggio A, Medrzycki P, Formato G, et al. Honey bee colony losses in Italy. *Journal of Apicultural Research*. 2010;49(1):119-20.
3. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *Plos One*. 2009;4(8):e6481-e.
4. Neumann P, Carreck NL. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*. 2010;49(1):1-6. PubMed PMID: WOS:000276090500001. English.
5. Pettis JS, Delaplane KS. Coordinated responses to honey bee decline in the USA. *Apidologie*. 2010;41(3):256-63.
6. Potts SG, Roberts SPM, Dean R, Marris G, Brown MA, Jones R, et al. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*. 2010;49(1):15-22.
7. Pohorecka K, Bober A, Skubida M, Zdanska D. Epizootic Status of Apiaries with Massive Losses of Bee Colonies (2008-2009). *Journal of Apicultural Science*. 2011;55(1).
8. Higes M, Martin-Hernandez R, Martinez-Salvador A, Garrido-Bailon E, Virginia Gonzalez-Porto A, Meana A, et al. A preliminary study of the epidemiological

factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports*. 2010;2(2):243-50.

9. Miranda CRE, Bitondi MMG, Simoes ZLP. Effect of proctolin on the egg-laying activity of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*. 2003;42(3):35-8.

10. Cox-Foster D, vanEngelsdorp D. Saving the HONEYBEE RID E-7934-2010. *Scientific American*. 2009;300(4):40-+.

11. Ratnieks FLW, Carreck NL. Clarity on Honey Bee Collapse? *Science*. 2010;327(5962):152-3.

12. Klein A-M, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2007;274(1608):303-13.

13. Morse RA, Calderone NW. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. Ithaca, New York.: Report Cornell University., 2000 Contract No.: Report.

14. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*. 2010;103:S96-S119.

15. Agriculture AGDo. Bees and bee pests and diseases. 2015.

16. Rademacher E, Harz M. Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies - a review. *Apidologie*. 2006;37(1):98-120.

17. Boecking O, Genersch E. Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping RID C-2232-2009. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2008;3(2):221-8.

18. Dejong D, Goncalves LS, Morse RA. Dependence on Climate of the Virulence of *Varroa-jacobsoni*. *Bee World*. 1984;65(3):117-21.

19. García Fernández P. Influence of the environment and the host on parasitization by *Varroa jacobsoni* Oud. The varroosis in the Mediterranean region. *Cahiers Options Méditerranéennes*. 21: Zaragoza : CIHEAM; 1997. p. 33-47.

20. Moretto G, Goncalves LS, Dejong D, Bichuette MZ. The Effects of Climate and Bee Race on *Varroa-jacobsoni* Oud Infestations in Brazil. *Apidologie*. 1991;22(3).

21. Rosenkranz P. Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie*. 1999 Mar-Jun;30(2-3):159-72. PubMed PMID: WOS:000081082800007. English.

22. Murilhas AM. *Varroa destructor* infestation impact on *Apis mellifera carnica* capped worker brood production, bee population and honey storage in a Mediterranean climate. *Apidologie*. 2002 May-Jun;33(3):271-81. PubMed PMID: WOS:000176071900003. English.

23. DeJong D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. *Bee World*. 1996;77(2):67-70.

24. Eguaras M, Marcangeli J, Fernandez NA. Influence of Parasitic Intensity on *Varroa-jacobsoni* Oud Reproduction. Journal of Apicultural Research. 1994;33(3):155-9.
25. P. García-Fernández RBR, Orantes-Bermejo FJ. Influence du climat sur le développement de la population de *Varroa jacobsoni* Oud dans des colonies d'*Apis mellifera iberica* (Goetze) dans le sud de l'Espagne Influence of climate on the evolution of the population dynamics of the *Varroa* mite on honeybees in the south of Spain. 1995:371-80--80.
26. Kraus B, Velthuis HHW. High humidity in the honey bee (*Apis mellifera* L) brood nest limits reproduction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. Naturwissenschaften. 1997;84(5):217-8.
27. Becher MA, Osborne JL, Thorbek P, Kennedy PJ, Grimm V. REVIEW: Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. Journal of Applied Ecology. 2013;50(4):868-80.
28. van Dooremalen C, Stam E, Gerritsen L, Cornelissen B, van der Steen J, van Langevelde F, et al. Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. Journal of insect physiology. 2013;59(4):487-93.
29. Le Conte Y, Arnold G. The Effects of Bee Age and of Heat on the Parasite Behavior of *Varroa-jacobsoni*. Apidologie. 1987;18(4):305-20.
30. Le Conte Y, Arnold G. A Study of the Thermopreferendum of *Varroa-jacobsoni* Oud. Apidologie. 1988;19(2):155-64.
31. Patzold S, Ritter W. Studies on the Behavior of the Honeybee Mite, *Varroa-jacobsoni* O, in a Temperature-Gradient. Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie. 1989;107(1):46-51.
32. Rosenkranz P, Engels W. Genetic and Environmental-Influences on the Duration of Preimaginal Worker Development in Eastern (*Apis-Cerana*) and Western (*Apis-Mellifera*) Honey-Bees in Relation to Varroatosis. Revista Brasileira de Genetica. 1994;17(4):383-91.
33. Harris JW, Harbo JR, Villa JD, Danka RG. Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata : Varroidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera : Apidae) during a 10-year period. Environmental Entomology. 2003;32(6):1305-12.
34. Flores JM RJ, Afonso SM. Accessment of the popularion of *Varroa destructor* based on its collection from boards at the bottoms of hives of *Apis mellifera iberica*. Revista portuguesa de ciencias veterinarias. 2002.
35. Branco MR, Kidd NAC, Pickard RS. A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari : Varroidae) population estimation. Apidologie. 2006;37(4):452-61.
36. Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, et al. Standard methods for varroa research. Journal of Apicultural Research. 2013;52(1):52.1.09-52.1.09.

37. Guzman-Novoa E, Eccles L, Calvete Y, McGowan J, Kelly PG, Correa-Benitez A. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*. 2010;41(4).
38. Nasr ME, Thorp RW, Tyler TL, Briggs DL. Estimating Honey-Bee (Hymenoptera, Apidae) Colony Strength by a Simple Method - Measuring Cluster Size. *Journal of economic entomology*. 1990;83(3):748-54.
39. Fournier DA, Skaug HJ, Ancheta J, Ianelli J, Magnusson A, Maunder MN, et al. AD Model Builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optimization Methods & Software*. 2012;27(2):233-49.
40. Skaug H FD, Nielsen A, Magnusson A and Bolker B Generalized Linear Mixed Models using AD Model Builder. R package version 0.7.5. 2013.
41. Akaike H. MAXIMUM LIKELIHOOD IDENTIFICATION OF GAUSSIAN AUTOREGRESSIVE MOVING AVERAGE MODELS. *Biometrika*. 1973;60(2):255-65. PubMed PMID: WOS:A1973Q510200005. English.
42. Fielding AH, Bell JF. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation*. 1997 Mar;24(1):38-49. PubMed PMID: WOS:A1997XV97800008. English.
43. Swets JA. Measuring the Accuracy of Diagnostic Systems. *Science*. 1988;240(4857):1285-93.
44. Donze G, Herrmann M, Bachofen B, Guerin PM. Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Ecological Entomology*. 1996 Feb;21(1):17-26. PubMed PMID: WOS:A1996TU92000003.
45. Arechavaleta-Velasco ME, Guzman-Novoa E. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*. 2001;32(2):157-74.
46. Lodesani M, Crailsheim K, Moritz RFA. Effect of some characters on the population growth of mite *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* L colonies and results of a bi-directional selection. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*. 2002 Apr;126(2-3):130-7. PubMed PMID: WOS:000175257200014.
47. Loucif-ayad W, Aribi N, Smagghe G, Soltani N. Comparative effectiveness of some acaricides used to control *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Algeria. *African Entomology*. 2010;18(2):259-66.
48. Trouiller J. Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in western Europe. *Apidologie*. 1998;29(6).
49. Elzen PJ, Baxter JR, Spivak M, Wilson WT. Amitraz resistance in varroa: New discovery in North America. *American Bee Journal*. 1999;139(5).
50. Sammataro D, Untalan P, Guerrero F, Finley J. The resistance of varroa mites (Acari : Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International*

Journal of Acarology. 2005 Mar;31(1):67-74. PubMed PMID: WOS:000227267900008. English.

51. Mathieu L, Faucon JP. Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. Journal of Apicultural Research. 2000;39(3-4):155-8. PubMed PMID: WOS:000166815300009. English.

52. Holzschuh A, Dudenhoffer JH, Tschardt T. Landscapes with wild bee habitats enhance pollination, fruit set and yield of sweet cherry. Biol Conserv. 2012 Sep;153:101-7. PubMed PMID: WOS:000307917800013. English.

53. Torne-Noguera A, Rodrigo A, Arnan X, Osorio S, Barril-Graells H, da Rocha LC, et al. Determinants of Spatial Distribution in a Bee Community: Nesting Resources, Flower Resources, and Body Size. Plos One. 2014 May;9(5):10. PubMed PMID: WOS:000336369200081. English.

54. Roulston TH, Goodell K. The Role of Resources and Risks in Regulating Wild Bee Populations. In: Berenbaum MR, Carde RT, Robinson GE, editors. Annual Review of Entomology, Vol 56. Annual Review of Entomology. 56. Palo Alto: Annual Reviews; 2011. p. 293-312.

55. Bruce WA, Needham GR, Potts WJE. The effects of temperature and water vapor activity on water loss by *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae). American Bee Journal. 1997 Jun;137(6):461-3. PubMed PMID: WOS:A1997XC79100021. English.

56. Le Conte Y, Arnold G, Desenfant P. INFLUENCE OF BROOD TEMPERATURE AND HYGROMETRY VARIATIONS ON THE DEVELOPMENT OF THE HONEY-BEE ECTOPARASITE *VARROA-JACOBSONI* (MESOSTIGMATA, VARROIDAE). Environmental Entomology. 1990 Dec;19(6):1780-5. PubMed PMID: WOS:A1990EM95200021.

57. CRAILSHEIM KB, R; NEUMANN, P. The COLOSS puzzle: filling in the gaps. Proceedings of the 4th COLOSS Conference. 2009:46-7.

58. vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Pettis JS. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. Journal of Apicultural Research. 2010;49(1):7-14. PubMed PMID: WOS:000276090500002. English.

59. Amdam GV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera : Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari : Varroidae): A factor in colony loss during overwintering? Journal of economic entomology. 2004;97(3):741-7.

60. Calis JNM, Fries I, Ryrie SC. Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie. 1999;30(2-3):111-24.

61. Fries I, Camazine S, Sneyd J. Population-Dynamics of *Varroa-jacobsoni* - a Model and a Review. Bee World. 1994;75(1):5-28.

62. Currie RW, Tahmasbi GH. The ability of high- and low-grooming lines of honey bees to remove the parasitic mite *Varroa destructor* is affected by environmental conditions. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie. 2008;86(9):1059-67.

Figure Legends

Figure 1. (a) Locations of apiaries on Mallorca Island in which *Varroa* and honey bee dynamics were studied (black filled circles). (b) Location of Mallorca Island off the east coast of Spain. Two apiaries were selected in five different geomorphological zones which include mountainous (Serra de Tramuntana, Serres de Llevant zones) and semi-arid areas (es Raiguer, es Pla and es Migjorn zones). Shading indicates elevation above sea level.

Figure 2. Seasonal patterns in (a) abundance of fallen *Varroa* (mean \pm standard error across hives), (b) number of frames occupied by bees (mean \pm standard error across hives), (c) total number of colony losses, (d) absolute minimum temperature ($^{\circ}\text{C}$) (mean \pm standard error), (e) mean humidity (%) (mean \pm standard error), and (f) total number of anti-varroa treatments applied through the years, from 2009 December to 2011 December.

Figure 3. Comparison between observed and predicted *Varroa* abundance from environmental models fitted at different time scales.

Supporting Information Captions

Table S1. Summary of climate and locational information for meteo-stations used for each apiary.

Meteo. station	X_UTM	Y_UTM	Apiary (approx. dist.)	MH 2010 (Mean±sd)	MH 2011 (Mean±sd)	AMIT 2010 (Mean±sd)	AMIT 2011 (Mean±sd)	P 2010	P 2011
Sa Pobla	503615	4405875	1 (5.5-6 km)	76.33 ± 9.04	75.70 ± 9.85	8.71 ± 5.62	10.64 ± 5.17	2.51 ± 9.06	1.49 ± 6.82
Inca	494713	4392671	2 (15 km), 3 (11 km)	72.79 ± 10.15	72.93 ± 10.08	9.70 ± 5.87	11.31 ± 5.17	1.76 ± 6.94	1.39 ± 6.11
Manacor	514745	4377383	4 (15 km)	74.17 ± 10.30	73.83 ± 9.76	9.26 ± 5.86	11.38 ± 5.09	1.49 ± 4.49	1.17 ± 5.66
Calvia	454088	4378308	5 (5 km)	75.63 ± 8.86	76.05 ± 8.89	10.14 ± 5.75	12.08 ± 4.91	2.16 ± 9.13	1.49 ± 6.96
UIB	464222	4385320	6 (5 km)	72.25 ± 31.62	71.22 ± 32.45	9.90 ± 5.77	10.43 ± 5.69	20.54 ± 78.88	14.24 ± 58.52
Arta	530886	4394220	7 (7 km), 8 (5 km)	75.40 ± 10.10	78.51 ± 9.96	10.27 ± 5.70	12.60 ± 4.89	2.27 ± 5.87	0.90 ± 3.35
Campos	505434	4361827	9 (0 km), 10 (2 km)	70.8 ± 19.12	74.42 ± 8.99	3.99 ± 6.46	5.92 ± 5.98	47.9 ± 36.92	40.2 ± 46.92

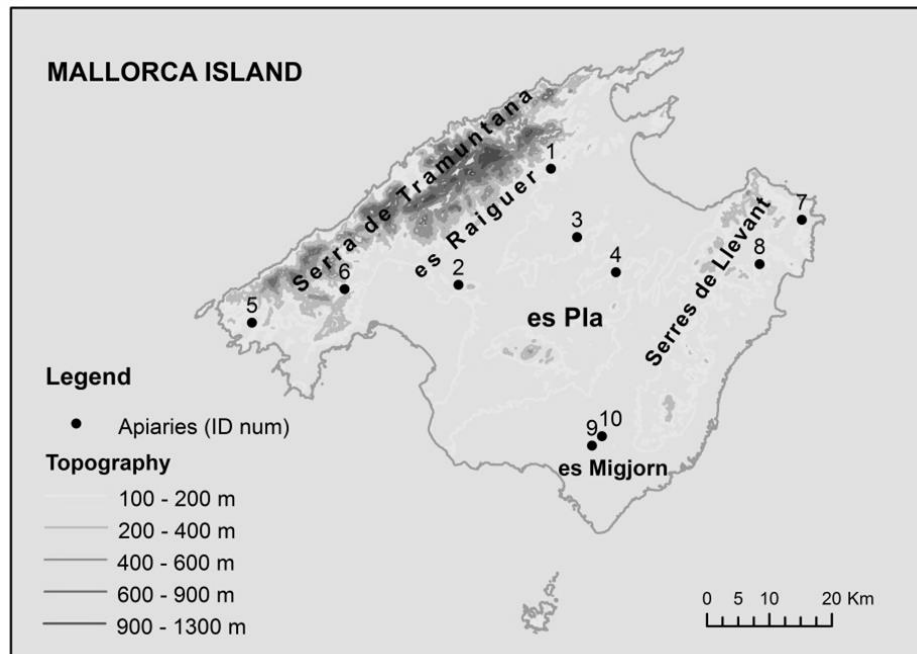
AMIT: Absolute Minimum Temperature (°C), MH: Mean Humidity (%) and P: precipitation (mm).
Approx. dist.: Approximate distance to each apiary.

Table S2. Selection of appropriate random effects for *Varroa* abundance and colony loss models: Table of AIC values for global models (containing all environmental predictors) with different combinations of random effects for each dependent variable.

Random effects combination	Dependent variable				
	<i>Varroa</i> annual abundance n= 75	<i>Varroa</i> six month period 1 abundance n = 75	<i>Varroa</i> six month period 2 abundance n = 75	Monthly <i>Varroa</i> abundance n = 414*	Monthly colony loss n = 432*
Hive	706.6	752.9	628.8	3665.1	93.1
Apiary	710.1	756.8	629.5	3668.9	93.1
Climate zone	709.8	756.8	629.5	-	-
Year	710.1	756.8	629.5	3666.9	93.1
Hive + Apiary	708.6	non-convergence	630.8	3667.1	95.1
Hive + climate zone	708.6	754.9	non-convergence	-	-
Hive + year	708.6	754.9	630.8	3665.7	95.1
Apiary + climate zone	711.8	non-convergence	non-convergence	-	-
Apiary + year	712.1	758.8	631.5	3668.9	95.1
Climate zone + year	711.8	758.8	631.5	-	-

Figures

A



B



Figure 1. (a) Locations of apiaries on Mallorca Island in which *Varroa* and honey bee dynamics were studied (black filled circles). (b) Location of Mallorca Island off the east coast of Spain. Two apiaries were selected in five different geomorphological zones which include mountainous (Serra de Tramuntana, Serres de Llevant zones) and semi-arid areas (es Raiguer, es Pla and es Migjorn zones). Shading indicates elevation above sea level.

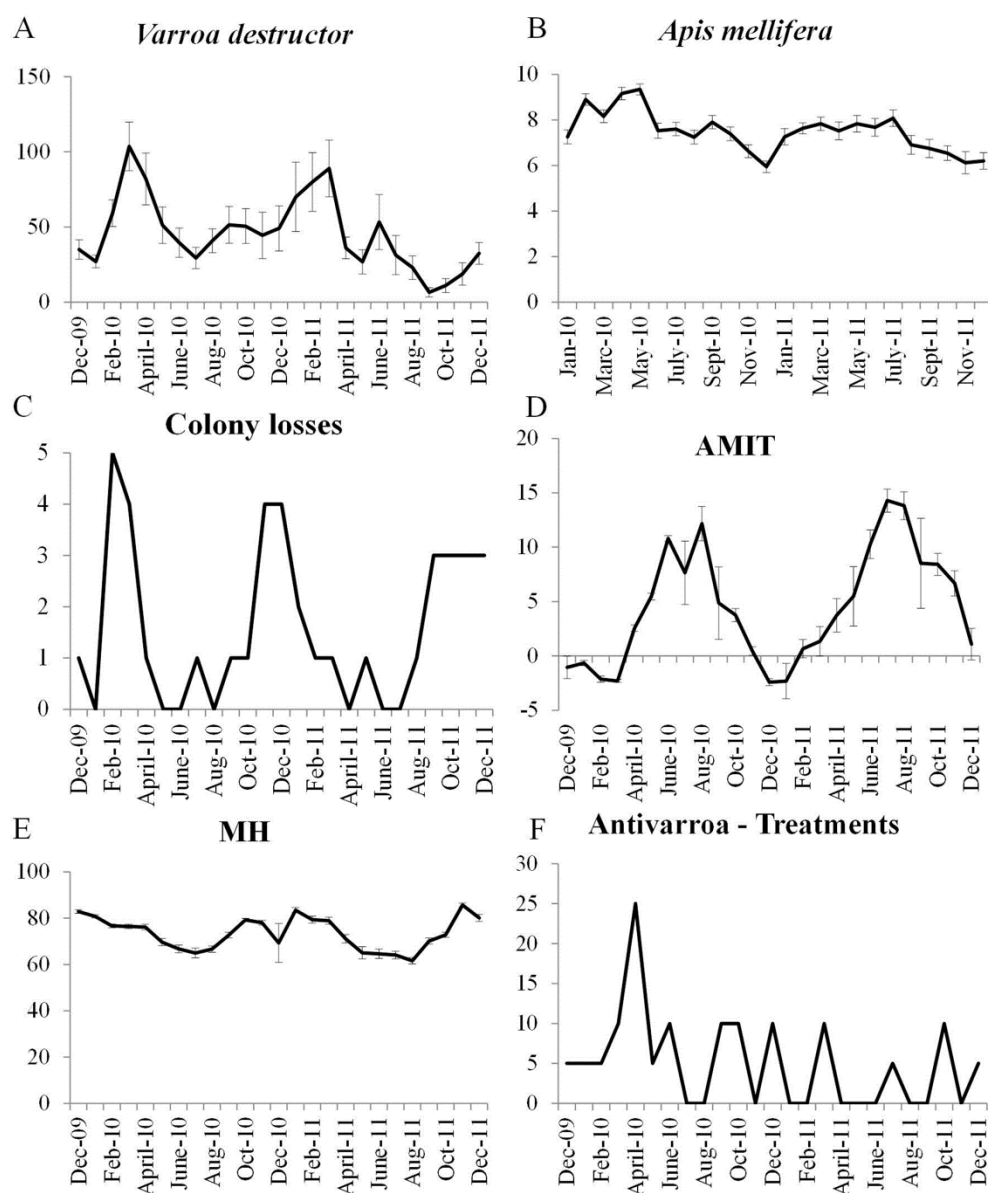


Figure 2. Seasonal patterns in (a) abundance of fallen *Varroa* (mean \pm standard error across hives), (b) number of frames occupied by bees (mean \pm standard error across hives), (c) total number of colony losses, (d) absolute minimum temperature ($^{\circ}$ C) (mean \pm standard error), (e) mean humidity (%) (mean \pm standard error), and (f) total number of anti-varroa treatments applied through the years, from 2009 December to 2011 December.

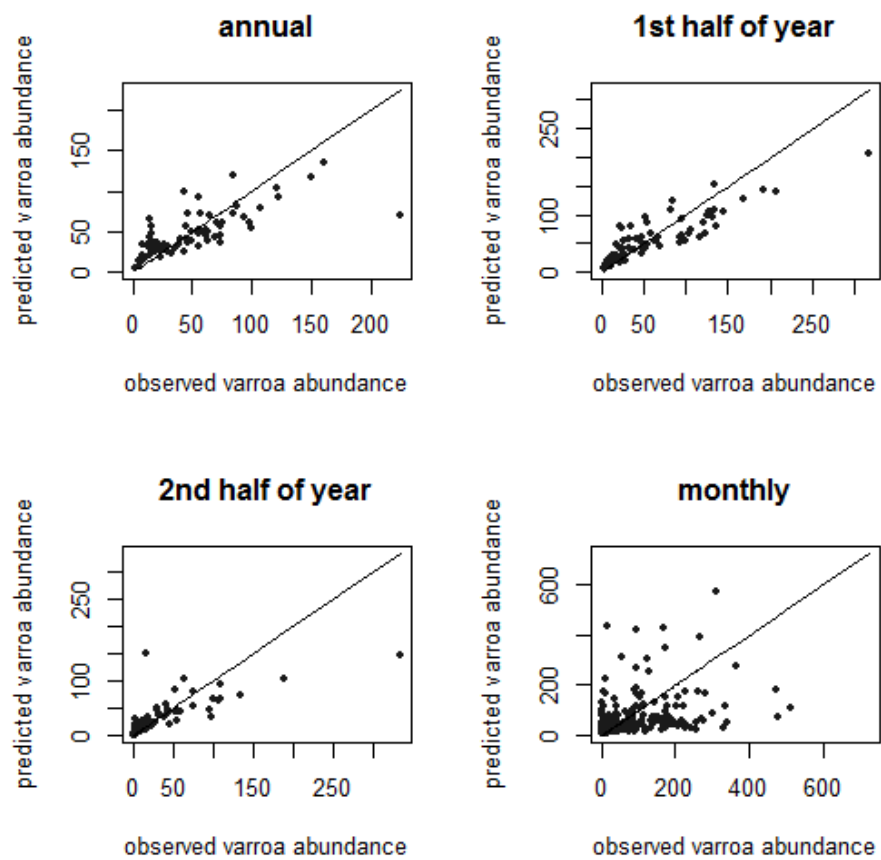


Figure 3. Comparison between observed and predicted *Varroa* abundance from environmental models fitted at different time scales.

Anexo II

Tabla 31

Tabla 31. Resumen del clima y de la información sobre la localización de las estaciones meteorológicas utilizadas para cada apiario, en el estudio de la Dinámica poblacional de *V. destructor* y los factores que la modulan.

Estación meteo.	X_UTM	Y_UTM	Apiario (distancia aprox. al apiario)	HM 2010 (M ± EE)	HM 2011 (M ± EE)	TMA 2010 (M±EE)	TMA 2011 (M±EE)	P 2010	P 2011
Sa Pobra	503615	4405875	1 (5,5-6 km)	76,3±9,0	75,7±9,8	8,7±5,6	10,6±5,2	2,5± 9,1	1,5±6,8
Inca	494713	4392671	2 (15 km), 3 (11 km)	72,8±10,1	72,9±10,1	9,7±5,9	11,3±5,2	1,8±6,9	1,4±6,1
Manacor	514745	4377383	4 (15 km)	74,2±10,3	73,8±9,8	9,3±5,9	11,4±5,1	1,5±4,5	1,2±5,7
Calvia	454088	4378308	5 (5 km)	75,6±8,9	76,0±8,9	10,1±5,7	12,1±4,9	2,2±9,1	1,5±6,9
UIB	464222	4385320	6 (5 km)	72,2±31,6	71,2±32,4	9,9±5,8	10,4±5,7	20,5±78,9	14,2±58,5
Arta	530886	4394220	7 (7 km), 8 (5 km)	75,4±10,1	78,5±9,9	10,3±5,7	12,6±4,9	2,3±5,9	0,9±3,3
Campos	505434	4361827	9 (0 km), 10 (2 km)	70,8± 9,1	74,4±8,9	3,9±6,4	5,9±5,9	47,9±36,9	40,2±46,9

Anexo III

Comparison of the efficacy of Apiguard (thymol) and Apivar (amitraz) in the control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in the Balearic Islands (Western Mediterranean)

Comparison of the efficacy of Apiguard (thymol) and Apivar (amitraz) in the control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in the Balearic Islands (Western Mediterranean).

M. MAR LEZA*, GREGORI LLADO, MIGUEL A. MIRANDA-CHUECA

Laboratorio de Zoologia. Departamento de Biologia, Universidad de les Illes Balears, Cra. de Valldemossa, km 7.5, 07122, Palma, Spain.

*Corresponding author: Maria del Mar Leza. E-mail adress: mar.leza@uib.es.
Telephone number: (+34) 971 17 31 55.

This work has one table and one figure.

Running title: Effectiveness of thymol and amitraz used to control *V. destructor*.

Topic: animal health and welfare.

Abstract

The present study compared the efficacy of Apivar (amitraz) and Apiguard (thymol) in controlling the mite *Varroa destructor* during spring 2010 and autumn 2011, in the Balearic Islands (Spain). Number of fallen mites (NFM) was counted weekly and the efficacy of treatments was evaluated by using the percent reduction of average daily fallen mites (%R). During spring assay, the average NFM was highly reduced in Apiguard (89.8%) compared to Apivar (64.3%) group, finding significant differences between Apiguard and control group (untreated group) in post treatment week. In autumn assay, colonies showed a 17.9% reduction in average NFM, while Apiguard colonies showed a higher reduction: 30.8%, showing a tendency between control and Apiguard group in post treatment week. In both assays, %R was higher in Apiguard than in Apivar (no significant differences between treatments in any of the seasons). We found Apiguard less efficacious during November-December, probably due to the low external temperatures that hampered an optimal volatilization of the product. The lower efficacy of Apivar in our results seems related to the resistance of *V. destructor* to this chemical miticide, which has been used during the last thirty years. Results of this study showed that in Mediterranean conditions, spring is an appropriate period for applying Apiguard to the colonies, whereas application in late autumn would decrease the efficacy of the product. Based on these results, Apiguard could represent a low resistance and residues alternative product for integrated control.

Keywords: *Varroa*, effectiveness, amitraz, thymol, essential oil, chemical, falling mites.

Abbreviations:

%R: percent reduction of average daily mite fall; NFM: number of fallen mites.

Main text

The mite *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000 (Acari: Varroidae) is a hemophagous ectoparasite of honeybee (*Apis mellifera*) distributed worldwide (with the notable exception of Australia (Rosenkranz *et al.*, 2010)). This parasite is currently one of the greatest menaces for apiculture (Rosenkranz *et al.*, 2010) due to economic losses and high impact on colonies health. This mite infects all the stages of honeybee, having a phoretic phase on adult bees and a reproductive phase in brood cells. Clinical symptoms are not visible at low infestation rates, and in the absence of efficacious control methods, the colonies of *A. mellifera* can collapse within a few years, in

temperate climates (Boecking & Genersch, 2008). Further, *V. destructor* is responsible for the transmission of viruses to their hosts (Rosenkranz *et al.*, 2010).

In this study two chemical products commonly used for controlling *V. destructor* were compared: Apivar (amitraz, enclosed as “hard” synthetic chemicals) and Apiguard (thymol, included in the group of essential oils). Amitraz (the active ingredient of Apivar) was one of the earliest acaricide tested against *V. destructor* (Hollingworth, 1976). Apivar possesses some advantages, such as the simplicity of application and the low economic cost. However, the main disadvantages of this product are its limited efficacy after continuous use due to the development of resistances (Trouiller, 1998; Elzen *et al.*, 1999) as well as the accumulation of residues in bee products (Martel *et al.*, 2007; Lodesani *et al.*, 2008; Chauzat *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009). Nowadays, alternative methods for *V. destructor* control based on natural products (such as organic acids and essential oils) are being tested. Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol, the active ingredient of Apiguard) is a one of those products of natural origin which have demonstrated to control varroosis both in field and in laboratory conditions (Chiesa, 1991; Imdorf *et al.*, 1995; Colombo & Spreafico, 1999; Floris *et al.*, 2004; Akyol & Yeninar, 2008; Gashout & Guzman-Novoa, 2009). Apiguard acts as an efficient miticide with a low risk of residues in bee products and resistance in *V. destructor* populations (Fries *et al.*, 1991; Floris *et al.*, 2004; Bogdanov, 2006). The aim of the present study was to compare the efficacy of two commercial products: Apiguard (Thymol, essential oil. Vita Europe Ltd., Basingstoke, UK) and Apivar (Amitraz, formadimine. Veto-Pharma SA, Villebon-sur-Yvette, France), during different seasons (spring and autumn-winter) in the Mediterranean climate.

We present here the results of the study conducted in an apiary located at the University of the Balearic Islands in Majorca (39° 38' 30.20''N, 2° 38' 23.57'' E) (Western Mediterranean). The trials were carried out in an apiary of 15 colonies of *Apis mellifera iberiensis*, kept in Langstroth standard colonies, naturally infested with *Varroa destructor* mites. One group of colonies was treated with Apivar, other treated with Apiguard, and the last one remained untreated as control. Before the trial, mite infestation level was monitored to obtain three experimental groups, as homogeneous as possible. All treatments were applied following the manufacturer's instructions. For the Apivar treatment, two plastic strips were inserted in the brood chamber of each hive and left for six weeks. In the case of the Apiguard treatment, one tray were located in the top of brood frames of each hive and left for fourteen days and then it was replaced by a second tray, which was left for 2 weeks more. The assay of 2010 and 2011 started on 8 April and 11 November, respectively. The treatments were applied on 15 April 2010 and 18 November 2011. Apiguard was repeated on 29 April 2010 and 2 December 2011 and removed on 13 May 2010 and 16 December 2011, whereas Apivar was not repeated and was removed on 27 May 2010 and 30 December 2011. Each colony was equipped with a modified bottom board, provided with a removable tray where a vaseline sticky paper was inserted and removed every seven days. Fallen mites, as good indicator of

colony infestation, were used. This technique is a non-destructive method and it is considered an excellent method to be used periodically (Dietemann *et al.*, 2013). Fallen mites were counted weekly, starting one week before treatment in order to estimate the initial population of *V. destructor* in each colony. Two different parameters were showed: NFM and the percent reduction of average daily mite fall (%R). The percent of NFM reduced were calculated from the difference between the NFM obtained at the beginning and the end of the assay. The efficacy of treatments was evaluated by using the **percent reduction of average daily mite fall**, according to the following formula (Henderson & Tilton, 1955; Satta *et al.*, 2005): $\%R = 100 [1 - (Bc \cdot At / Bt \cdot Ac)]$; where Bt and At are the data on the average daily mite fall in treated colony before (Bt) and after treatment (At), and Bc and Ac are the same parameters in the control group. This evaluation method is probably more precise than others methods that used the % change in infestation, because it incorporates variation in mite population caused by various and important factors, such as natural mortality, natality, immigration or emigration (Floris *et al.*, 2001). Data were analysed by Student's t-test using SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A level of $p \leq 0.05$ was accepted as significant.

The results of the treated groups showed a similar pattern in both seasons (Figure 1). Only one peak for Apivar was observed, in the first week of product application (the number of mites was multiplied by 4.8 in spring and 6.2 in autumn). Whereas Apiguard showed two high points, one the first week (increased in 2.4 in spring and 5.7 in autumn) and other in the third week (multiplied 2.2 in spring and 2.9 in autumn), which coincides with the replacement of the treatment. At the end of the treatments in the post treatment week, the average NFM during spring assay was reduced 89.8% in Apiguard treatment and 64.3% in Apivar, without statistically significant differences between groups. Regarding to autumn assay, in Apivar colonies the average NFM was reduced of 17.9%, meanwhile in Apiguard ones the reduction of average NFM was higher: 30.8%. However, in untreated group the average NFM was increased in 5%. There were not statistically significant differences between groups in the autumn assay.

Table 1 shows the percent reduction of the average daily fallen mites (%R). Thymol based miticide product (Apiguard) showed higher efficacy compared to Amitraz based product (Apivar). In spring the former showed a percentage R of 76.9%, meanwhile for the same period, Apivar showed only a 65.2% of reduction, although there were not statistical significant differences between treatments. Both obtain about 40% lower of score under autumn. Also, the percentage of reduction was variable colony-to-colony (table 1).

The present work is the first conducted in the Balearic Islands to test the efficacy of commonly used anti-varroosis treatments. Our results obtained for thymol (Apiguard) either in spring and autumn agreed with other published works where thymol showed efficacies varying from 40% to more than 90% (Marchetti & Bar battini, 1984; Chiesa, 1991; Imdorf *et al.*, 1995; Gregorc & Planinc, 2005; Loucif-ayad *et al.*, 2010). We

detected a drop of efficacy of thymol in late autumn (November-December), probably due to the low external temperatures (13°C of average daily external temperature) that hampered an optimal volatilization of the product. This observation was also reported by Ellis (2001), showing that Apiguard had a good performance at 15-20°C, and lose efficacy when the temperatures were lower. In regards to Amitraz, our results obtained in spring are similar to those published by Floris *et al.* (Floris *et al.*, 2001) and Pohorecka *et al.* (Pohorecka *et al.*, 2011), who achieved an efficacy around of 70%. Other authors have reported higher efficacies ranging from 82% (Chuda-Mickiewickz *et al.*, 2007; Loucif-ayad *et al.*, 2010) to 99.5% (Faucon *et al.*, 2007). We have no clear explanation to the lower efficacy of Amitraz that we found in our results. One explanation that needs to be tested in future works is the possibility that *V. destructor* populations in the Balearics are resistant to amitraz due to the continuous application of this product during the last 30 years (first years with wooden frames impregnated with amitraz).

Our results also showed a high variability of treatment efficacy among colonies. This fact was already observed by other authors in Italy, Swiss and Poland (Marchetti & Barbattini 1984; Imdorf *et al.*, 1995; Colombo & Spreafico, 1999; Floris *et al.*, 2004; Chuda-Mickiewickz *et al.*, 2007). In the case of thymol, variable efficacy among colonies could be due to microclimatic conditions related to each colony that cause different volatilization rate and thus dispersal inside the colony. Whereas, regarding to amitraz it is linked with the emergence of resistance of *V. destructor* to this product (Trouiller, 1998; Elzen *et al.*, 1999).

Anti-varroa products have been widely used worldwide during the last 35 years (Hollingworth, 1976). Important concerns due to the use of Amitraz products are raising lately, due to the development of chemical resistances in *V. destructor* populations, the adverse effects of treatments on bees and the accumulation of residues in bee products. Therefore, alternative friendly methods to those based in Amitraz are urgently needed. Based on the results of the present study, thymol could represent an alternative in integrated control strategies against *V. destructor*, having a low risk of residues and resistance, although it may be more expensive than Amitraz products (in Spain Apiguard is 86% more expensive than Apivar). Our results also pointed out that spring is the most appropriate time to apply thymol treatments to colonies managed under Mediterranean climate, whereas late autumn (November-December) seemed to be unappropriated time for an effective use of thymol. Finally, future works may include the test of other essential oils to compare with the anti-varroa effect of thymol. Further studies focused on the resistance status of *Varroa destructor* population in the Balearic Islands to widely products such as Amitraz are also needed.

Acknowledgment

This work was partially supported by the Balearic Government. Thanks to student collaborators for their assistance in field assays. Thanks to Dr R del Rio for his kind revision of the manuscript and to Mr D Pons for his statistics support.

References

- Akyol E, Yeninar H, 2008. Controlling *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies by using Thymovar (R) and BeeVital (R). Ital J Anim Sci 7(2): 237-242.
- Anderson D, Trueman J, 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp Appl Acarol 24(3): 165-189.
- Boecking O, Genersch E, 2008. Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping RID C-2232-2009. J Fur Verbrauch Lebens 3(2): 221-228.
- Bogdanov S, 2006. Contaminants of bee products. Apidologie 37: 1-18.
- Chauzat M, Carpentier P, Martel A, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Madec F, Aubert M, Faucon J, 2009. Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. Environ Entomol 38(3): 514-523.
- Chiesa F, 1991. Effective Control of Varroosis using Powdered Thymol. Apidologie 22(2): 135-145.
- Chuda-Mickiewicz B, Prabucki J, Jerzy PR, 2007. Evaluation of varroacidal efficacy of biowar preparation. J Apic Sci 51 (2): 47-48-53.
- Colombo M, Spreafico M, 1999. Esperienze di lotta a *Varroa jacobsoni* Oud. con un nuovo formulato a base di timolo. La Selezione Veterinaria 7: 473-478.
- Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson D, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tannahill C, Frey E, Ziegelmann B, Rosenkranz P, Ellis JD, 2013. Standard methods for varroa research. In: The Coloss Beebook, Volume II: standard methods or *Apis mellifera* pest and pathogen research (V Dietemann; J D Ellis; P Neumann eds). Journal of Apicultural Research 52(1).
- Ellis JD, 2001. The future of *Varroa* control: Integrating current treatments with the latest advancements. Am Bee J 141(2): 127-131.
- Elzen PJ, Baxter, JR, Spivak M, Wilson WT, 1999. Amitraz resistance in varroa: New discovery in North America. Am Bee J 139(5): 362.
- Faucon J, Drajnudel P, Chauzat MP, Aubert M, 2007. Control of the efficacy of APIVAR ND against *Varroa destructor*, a parasite of *Apis mellifera*. Rev Med Vet-Toulouse 158(6): 283-290.
- Floris I, Satta A, Garau VL, Melis M, Cabras P, Aloul N, 2001. Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*. Apidologie 32(6): 577-585.

- Floris I, Satta A, Cabras P, Garau VL, Angioni A, 2004. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: Effectiveness, persistence, and residues. *J Econ Entomol* 97(2): 187-191.
- Fries I, Aarhus A, Hansen H, Korpela S, 1991. Comparison of Diagnostic Methods for Detection of Low Infestation Levels of *Varroa jacobsoni* in Honeybee (*Apis mellifera*) Colonies. *Exp Appl Acarol* 10 (3-4): 279-287.
- Gashout HA, Guzman-Novoa E, 2009. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Apicult Res* 48(4): 263-269.
- Gregorc A, Planinc I, 2005. The control of *Varroa destructor* in honey bee colonies using the thymol-based acaricide - Apiguard. *Am Bee J* 145(8): 672-675.
- Henderson C, Tilton E, 1955. Tests with Acaricides Against the Brown Wheat Mite. *J Econ Entomol* 48(2): 157-161.
- Hollingworth RM, 1976. Chemistry, biological-activity, and uses of formamidine pesticides. *Environ Health Persp* 14: 57-69.
- Imdorf A, Bogdanov S, Kilchenmann V, Maquelin C, 1995. Apilife Var - a New Varroacide with Thymol as the Main Ingredient. *Bee World* 76(2): 77-83.
- Johnson RM, Pollock HS, Berenbaum, MR, 2009. Synergistic Interactions Between In-Colony Miticides in *Apis mellifera*. *J Econ Entomol* 102(2): 474-479.
- Lodesani M, Costa C, Serra G, Colombo R, Sabatini AG, 2008. Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie* 39(3): 324-333.
- Loucif-ayad W, Aribi N, Smagghe G, Soltani N, 2010. Comparative effectiveness of some acaricides used to control *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Algeria. *Afr Entomol* 18(2): 259-266.
- Marchetti S, Barbattini R, 1984. Comparative Effectiveness of Treatments used to Control *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 15(4): 363-377.
- Martel A, Zeggane S, Aurieres C, Drajnudel P, Faucon J, Aubert M, 2007. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar (R) or Asuntol (R) 50. *Apidologie* 38(6): 534-544.
- Pohorecka K, Bober A, Skubida M, Zdanska D, 2011. Epizootic Status of Apiaries with Massive Losses of Bee Colonies (2008-2009). *J Apic Sci* 55 (1): 137-150.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103: S96-S119.
- Satta A, Floris I, Eguaras M, Cabras P, Garau V, Melis M, 2005. Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean area. *J Econ Entomol* 98(2): 267-273.
- Trouiller J, 1998. Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in western Europe. *Apidologie* 29(6): 537-546.

Tables and figures

Table 1. Percent of reduction of the average daily fallen mites (%R) of Apivar (amitraz) and Apiguard (thymol) treatments against *V. destructor*, during the two assays.

Colony	% reduction of daily fallen mites (%R)			
	Spring		Autumn	
	Apivar	Apiguard	Apivar	Apiguard
1	85,0	91,9	71,8	53,6
2	75,7	75,7	-36,0	27,6
3	14,8	98,0	57,1	24,7
4	51,3	24,9	14,7	10,3
5	99,3	94,6	10,9	62,6
Mean \pm SEM	65,2 \pm 14,8	76,9 \pm 13,6	23,7 \pm 19,0	35,8 \pm 21,6

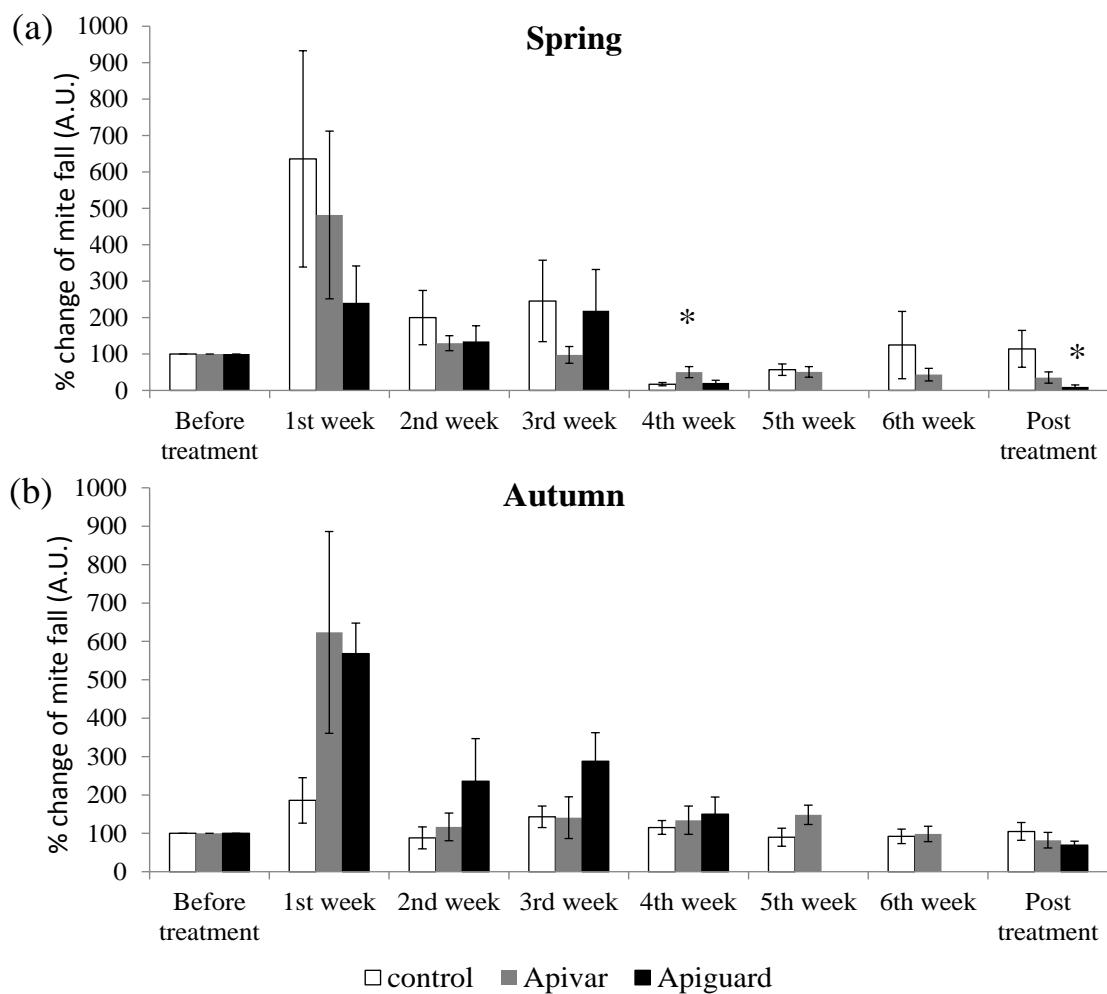


Figure 1. (a) Spring and (b) autumn assays. A.U. Arbitrary units. Data represent the means of number of fallen mites \pm SEM, before, during and after treatments. Values of weekly average number of fallen mites at t_0 (week before treatment) were set at 100, and the values of average number of fallen mites during the following weeks were represented as percentage of the above mentioned value for week t_0 .

* indicates significant differences at the $p < 0.05$ level with control group.

Anexo IV

First field assessment of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial application on the colony performance of *Apis mellifera* L.
(Hymenoptera: Apidae)

SHORT COMMUNICATION

OPEN ACCESS

First field assessment of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial application on the colony performance of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)

Maria del Mar Leza*¹, Gregori Llado¹, Ana Belen Petro² and Ana Alemany¹

¹ *Departamento de Biología.* ² *Departamento de Ciencias Matemáticas e Informática. Universidad de les Illes Balears. Ctra. de Valldemossa, km 7.5. 07122 Palma, Spain*

Abstract

Honeybee populations around the world are experiencing a decrease in colony numbers probably due to a combination of different causes, such as diseases, poor nutrition and frequent applications of insecticides to control pests. Previous studies about the effect of pesticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) on *Apis mellifera* L. report different results. The aim of this study was to analyze the effect of field aerial applications of *Btk* on bee colony performance, specifically on the brood cell percentage evolution, which can be used as an indicator of queen health and brood development breeding rates. To achieve it, the brood cell surface was photographed in every sampling, and data were analyzed using a method based on image treatment software. A total of 480 pictures were examined from two groups of four nucleus hives in two areas, one receiving aerial spraying with *Btk* and the other without treatment. A mixed factorial design was realized to analyse the data showing no differences in colony performance between the two groups of colonies either before the treatment, during and at the end of the assay. Furthermore, the brood surface ratio of *Btk*-treated/untreated increased along the experiment. Therefore, the results of the present study suggest that *Btk* aerial applications did not affect the brood development of honeybees under natural conditions. Nevertheless further field studies are required to ascertain a safe use of *Btk* in forest pest management.

Additional key words: honeybee; *Btk*; field study; Balearic Islands; forest management; impact.

Pollination is a crucial process to preserve the ecosystems (Klein *et al.*, 2007). One of most effective pollinators of wild flowers and cultivated crops is the honeybee (*Apis mellifera* Linnaeus), which represents the 60-95% of the overall pollination in some geographical zones (Morse & Calderone, 2000). Nowadays honeybee populations throughout the world have been subjected to rapid losses (Underwood & vanEngelsdorp, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Neumann & Carreck, 2010; Pohorecka *et al.*, 2011). Some authors confirm that these losses are triggered by different combination of causes, such as diseases (*Varroa destructor*, *Nosema ceranae* and virus), poor nutrition and frequent applications of insecticides to control pests (Miranda *et al.*, 2003; Cox-Foster & VanEngelsdorp, 2009; Higes *et al.*, 2010). In the present study the impact of the pesticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) on honeybees was

evaluated. There is a lack of studies developed to evaluate the impact of *Btk* aerial application on *A. mellifera*, although there are some studies developed to evaluate the impact on many groups of animals, such as non-target Lepidoptera (Boulton, 2004), non-target soil organisms (Addison & Barker, 2006) and songbirds (Sopuck *et al.*, 2002). The effect on bees have been developed in some field and laboratory studies, although the majority of the experiments tested the toxicology of *Btk* used in genetically modified crops (O'Callaghan *et al.*, 2005; Duan *et al.*, 2008). These studies showed no adverse effect on *A. mellifera* (Malone & Pham-Delègue, 2001; Hanley *et al.*, 2003; Malone *et al.*, 2004; Porcar *et al.*, 2008), however, some authors confirmed a toxicity of *Btk* under controlled conditions (Ramirez-Romero *et al.*, 2005; Brighenti *et al.*, 2007). It is worth to note that it must be considered that the field results using *Btk* aerial application differ from the laboratory experiments and some authors require more information about effect under field apicultural conditions (Rose *et al.*, 2007;

*Corresponding author: mar.leza@uib.es
Received: 27-09-13. Accepted: 14-05-14

Duan *et al.*, 2008; Mommaerts *et al.*, 2010). On the other hand, it is often difficult to extrapolate the impact of aerial application from field results obtained in transgenic crops.

In order to confirm or reject whether *Btk* aerial treatment affect to colony performance of honeybees in field conditions, the present assay analyzes the evolution of the percentage of each frame occupied with brood [as an indicator of queen health and brood development (Dai *et al.*, 2012)] under the effect of *Btk* aerial treatment, which is realized with the purpose of controlling the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller) in Ibiza (Balearic Islands, Spain).

To this aim, eight Langstroth nucleus hives were located in two pine forests (four nucleus per field) of Ibiza (572.56 km²), West Mediterranean island. According to Dai *et al.* (2012) methodology, two fields were selected. One of the forests is located in a zone treated with *Btk* (UTM: 31S 379032 m E 4322751 m N), while the second one is in a treatment-free protected area, and was considered as control (UTM: 31S 367720 m E 4321474 m N). The two zones are separated by about 10 km, an insurmountable distance for a bee flight, and also far enough to be free of the spray wind drift. To make sure those bee populations of all nucleus hives were as homogeneous as possible, sister queens from the same breeding line were reared by using Doolittle method (Flores *et al.*, 1998). The frames of all colonies were made from organic wax and bees did not receive any chemical treatment.

A BACI (Before-After Control-Impact) design (Green, 1979) was conducted in this study. The firsts measurements were taken on August 25, 2009, two months before the treatment applied, which was realized by helicopter on October 20, 2009. The product applied was Foray 48 B, Kenogard S.A., Spain (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, 11.8% p/v (11.8 · 10⁶ of IU g⁻¹). It was a suspension concentrate (SC); 3.5 L ha⁻¹ ultra-low volume application, drop diameter: 100-125 microns). By knowing the initial state, the environmental heterogeneity was controlled. First's five samplings were taken fortnightly, except the last sampling, which were taken one month later on December 16, 2009.

Both faces of every frame were photographed in every sampling. A total of 480 pictures were taken and examined. In each sampling, 80 pictures were taken (10 pictures per hive). Each digital photograph was

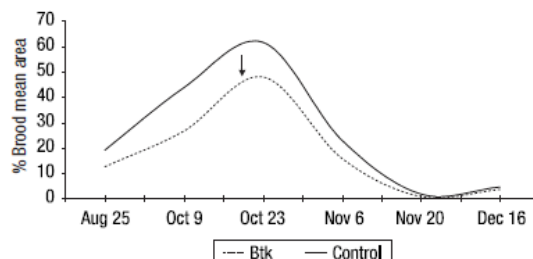


Figure 1. Evolution of the brood area mean percentage of the nucleus hives located in the pine forests, either treated with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) or untreated, in a study conducted in 2009. Arrow indicates the time of insecticide application.

processed with the Image Analysis Software SIG ArcGIS (ESRI), in order to calculate the percentage of cells occupied with brood (open brood as well as capped brood) in relation to the total surface of the frame, as an effective measurement of the bee's brooding efficiency (Dai *et al.*, 2012).

Data were analysed by a 2 × (6 × 4) mixed factorial design with one between-factor (control/treated groups) and one within-factor (six temporal points) in SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A level of $p < 0.05$ was accepted as significant. Means and standard deviations were computed for variable.

As it is shown in Fig. 1, the percentage of brood of both groups of hives showed a strong parallelism throughout the experiment. No significant differences between groups were found ($F = 2.59$, $p = 0.159$).

During the first three samplings the brood were increased. In the third sampling (just after the *Btk* treatment) the brood area was triplicated in both groups (3.8 fold in *Btk* colonies and 3.2 fold in control hives). In the fourth sampling three colonies of treated site (*Btk1*, *Btk2* and *Btk4*) and all colonies of control site began to decrease. In the fifth sampling, the brood surface was practically non-existent in six nucleus hives, three of the treated colonies (*Btk1*, *Btk2* and *Btk4*) and three in the control forest zone (control 1, control 2 and control 4). Actually, in both groups there were significant differences between fourth and fifth sampling ($t = 4.573$, $p = 0.020$ in control group; and $t = 3.472$, $p = 0.040$ in treated group). In addition to this drastic brood decrement, new queen cells in all of these nucleus hives were observed, as well as the new honeybee swarms in the nearby trees. All of these symptoms suggested that the nucleus hives had lost their queens because of a natural swarming process.

Table 1. Brood mean percentages of the hives analysed during the sampling period in 2009

Hives ¹	Brood mean percentages					
	Before treatment		Post-treatment			
	Aug 25	Oct 9	Oct 23	Nov 6	Nov 20	Dec 16
<i>Btk</i> 1	8.08	8.20	13.31	11.78	0.45	1.18
<i>Btk</i> 2	16.95	53.94	79.93	6.45	0.00	0.00
<i>Btk</i> 3	6.83	12.12	27.82	29.59	2.92	5.12
<i>Btk</i> 4	18.36	32.13	70.89	15.38	0.00	8.30
<i>Btk</i> (M ± SD)	12.56 ± 2.97	26.60 ± 10.51	47.99 ± 16.21	15.80 ± 4.95	0.84 ± 0.70	3.65 ± 1.90
C 1	22.12	55.39	77.60	25.48	0.00	1.20
C 2	21.39	47.11	60.39	15.98	0.00	0.00
C 3	12.23	33.11	55.39	38.98	6.97	8.80
C 4	20.39	39.17	53.21	11.40	0.00	8.35
C M ± SD	19.03 ± 2.30	43.70 ± 4.84	61.65 ± 5.53	22.96 ± 6.09	1.74 ± 1.74	4.59 ± 2.32
Ratio <i>Btk</i> / C	0.66	0.61	0.78	0.69	0.48	0.79

¹ *Btk*: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*; M: mean; SD: standard deviation; C: control (non-treated nucleus hives).

Although in control 4 there was a low brood percentage, it was observed that all of them remained in a pupal stage without any young or old larvae, which indicates that there was no recent queen laying. Interestingly, in the last sampling, four of these six colonies were recovered (*Btk1*, *Btk4*, control 1 and control 4) and a similar brood percentage was observed in both hive groups. On the other hand, *Btk* 3 and control 3 were maintained with normal growth (Table 1). At the end of the assay no significant differences between groups of hives were found. None of the nucleus hives showed any disease during the assay, being the reserves of honey and pollen enough to the development of the colonies.

Furthermore, if the brood percentage of both groups are compared through the ratio efficiency *Btk*/control, it can be observed that, even though the *Btk* hives had an initial brood surface smaller than those of the control group, the brood mean ratio increased throughout the experiment: from an initial value of 0.66 (12.56/19.03) to a final 0.79 (3.65/4.59) (Table 1). So the treated group breeding had increased comparatively to the control group breeding.

Unfortunately, we have found very few references on field studies performed under natural conditions, so we can barely compare results. Some authors as Brighenti *et al.* (2007) have reported some mortality rate attributed to *Btk* in laboratory tests involving direct spraying or food poisoning and Ramírez-Romero *et al.* (2005) concluded that *Bt* toxins may have an

antifeedant effect in high concentrations. However, it must be considered that insecticide field applications differ from laboratory experiments. On the other hand, this data are in agreement with the majority laboratory studies published based on the effect of *Btk* produced by transgenic farming, which showed that the *Btk* does not affect honeybee populations (Hanley *et al.*, 2003; Malone *et al.*, 2004; Babendreier *et al.*, 2005; O'Callaghan *et al.*, 2005; Duan *et al.*, 2008; Porcar *et al.*, 2008). Furthermore, the results of the present study are consistent with previous works conducted in *Bt* corn pollen (Dai *et al.*, 2012), which showed that the percentage of brood cells did not differ between the *Bt* and non-*Bt* treatments. Thus, our results agree with other field study conducted in USA that detected no significant effects of exposure to *Bt* pollen on colony performance (Rose *et al.*, 2007).

To sum up, the evolution between the groups of colonies was really similar (Fig. 1), without any significant difference along the experiment between groups, and the breeding mean ratio efficiency *Btk*/control increased throughout the experiment. So, the results of the effect of *Btk* aerial treatment (which is applied against processionary caterpillar in pine forest in Ibiza) on *A. mellifera* suggest that the *Btk* do not affect the brood development of honeybees. However, this is the first field assay conducted to assess the impact of aerial application on bees, so further field studies are required to ascertain a safe use of *Btk* in forest pest management.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge to L. Nuñez, J. Ferrer and J. Juan for their valuable support. Special thanks are due to A. Palmer for statistical analysis, and to J. Ramon, A. González and F. San Juan, for technical support. English was improved thanks to J. Miro and D. G. Jones kind revision. Funding for this study was provided from the Balearic Government (Forestry Health and Safety Service).

References

- Addison PJ, Barker GM, 2006. Effect of various pesticides on the non-target species *Microctonus hyperodae*, a biological control agent of *Listronotus bonariensis*. *Entomol Exp Appl* 119 (1): 71-79.
- Babendreier D, Kalberer NM, Romeis J, Fluri P, Mulligan E, Bigler F, 2005. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie* 36: 585-594.
- Boulton TJ, 2004. Responses of nontarget lepidoptera to foray 48B *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on Vancouver Island, British Columbia, Canada. *Environ Toxicol Chem* 23 (5): 1297-1304.
- Brighenti DM, Carvalho CF, Andrade G, Brighenti CRG, Malfitano S, 2007. Bioactivity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) to adults of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Ciênc Agrotec Lavras* 31 (2): 279-289.
- Cox-Foster D, VanEngelsdorp D, 2009. Saving the honeybee. *Sci Am* 300 (4): 40-47.
- Dai P, Zhou W, Zhang J, Cui HJ, Wang Q, Jiang WY, Sun JH, Wu YY, Zhou T, 2012. Field assessment of Bt cry1A_h corn pollen on the survival, development and behavior of *Apis mellifera ligustica*. *Ecotoxicol Environ Safety* 79: 232-237.
- Duan JJ, Marvier M, Huesing J, Dively G, Huang ZY, 2008. A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE* 3(1): e1415. DOI: 10.1371/journal.pone.0001415.
- Flores JM, Ruíz JA, Ruz JM, Puerta F, Campano F, Padilla F, Bustos M, 1998. Cría controlada de abejas reinas de *Apis mellifera ibérica*. *Arch Zootec* 47: 347-350.
- Green RH, 1979. Sampling design and statistical methods for environmental biologists. John Wiley & Sons, NY, USA. 257 pp.
- Hanley AV, Huang ZY, Pett WL, 2003. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *J Apic Res* 42: 77-81.
- Higes M, Martín-Hernández R, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, Virginia González-Porto A, Meana A, Luis Bernal J, del Nozal M, Bernal J, 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ Microbiol* 2 (2): 243-250.
- Klein AM, Vaissière BE, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Roy Soc B* 274: 303-313.
- Malone LA, Pham-Delègue MH, 2001. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32: 1-18.
- Malone LA, Todd JH, Burgess EPJ, Christeller JT, 2004. Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie* 35: 655-664.
- Miranda JE, Navickiene HMD, Nogueira-Couto RH, De Bortoli SA, Kato MJ, Bolzani VS, Furlan M, 2003. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Apidologie* 34: 409-415.
- Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagghe G, 2010. Impact of *Bacillus thuringiensis* strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Manag Sci* 66: 520-525.
- Morse, RA, Calderone NW, 2000. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. Cornell University, Ithaca, NY. Available in <http://www.beeculture.com/content/pollinationreprint07.pdf>. [15 May 2014].
- Neumann P, Carreck NL, 2010. Honey bee colony losses. *J Apic Res* 49: 1-6.
- O'Callaghan M, Glare TR, Burgess EPJ, Malone LA, 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annu Rev Entomol* 50: 271.
- Pohorecka K, Bober A, Skubida M, Zdanska D, 2011. Epizootic status of apiaries with massive losses of bee colonies (2008-2009). *J Apic Sci* 55(1): 137-150.
- Porcar M, Gómez F, Gruppe A, Gómez-Pajuelo A, Segura I, Schrödere R, 2008. Hymenopteran specificity of *Bacillus thuringiensis* strain PS86Q3. *Biol Control* 45 (3): 427-432.
- Ramirez-Romero R, Chauvaux J, Pham-Delègue MH, 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36: 601-611.
- Rose R, Dively GP, Pettis J, 2007. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie* 38: 368-377.
- Sopuck L, Ovaska K, Whittington B, 2002. Responses of songbirds to aerial spraying of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Foray 48B (R)) on Vancouver Island, British Columbia, Canada. *Environ Toxicol Chem* 21(8): 1664-1672.
- Underwood R, vanEngelsdorp D, 2007. Colony collapse disorder: have we seen this before? *Bee Cult* 135: 13-18.
- VanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen YP, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS, 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLOS ONE* 4(8): e6481. DOI: 10.1371/journal.pone.0006481.