

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Estudio de los factores de riesgo asociados a la
presencia y difusión de la Varroosis en la Provincia de
Santa Fe**

Por

Biol. Agostina Giacobino

Director: Marcelo L. Signorini

Lugar de Trabajo: Estación Experimental INTA Rafaela

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Nombre y Apellido: Dra. Adriana Salvo

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Entomológicas, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba –CONICET.

Nombre y Apellido: Dr. Martín J. Eguaras

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Artrópodos, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Nombre y Apellido: Dr. Marcelo L. Signorini

Lugar de Trabajo: Estación Experimental de Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.- CONICET.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: **Aclaración:**

Firma: **Aclaración:**

Firma:..... **Aclaración:**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis padres por el apoyo incondicional y el empuje en los momentos más difíciles desde el comienzo de mis estudios universitarios. A Ignacio, por acompañarme siempre.

A mi director, Dr. Marcelo L. Signorini, tanto por su calidad profesional como humana. Gracias Chelo por ser además de un director, un amigo y hacer de esta etapa un trayecto fructífero, relajado y por sobre todo muy divertido.

Al grupo de apicultura de la EEA Inta Rafaela, César Salto, Julieta Merke, Natalia Bulacio, Emanuel Orellano, Adriana Pacini, Ana Molineri y Silvia Luiselli por sus aportes constantes y gracias también por los momentos divertidos y la compañía agradable de todos los días.

A Leticia Zumoffen y Romina Manfrino porque desde un principio fueron mi apoyo personal y profesional en todo el trayecto del posgrado, por responder a las innumerables preguntas y consultas y sobre todo por tolerar mis ansiedades.

Me gustaría mencionar un agradecimiento especial para Hernán Pietronave, Germán Mansciángelo y Ezequiel Bertozzi por su colaboración continua desde el inicio de las actividades de esta tesis, la coordinación de los muestreos y las respuestas amables a la infinidad de correos electrónicos enviados.

A los miembros de PROAPI, especialmente a las Dras Alejandra Palacio y Alejandra C. Scannapiecco y al Dr. Juan A. Pasucci por su colaboración en materia de recursos, tiempo, dedicación y trabajo compartido.

A los técnicos asesores de Cambio Rural y los productores apícolas de la provincia de Santa Fe por colaborar en las actividades de monitoreo, prestarnos sus colmenas y tomarse el tiempo para realizar la toma de muestras y para responder a todas las encuestas realizadas.

Mencionar especialmente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y agradecer el apoyo económico recibido a través de las becas de formación de post-grado y también a la Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Por otro lado, agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación del intercambio con la Universidad de Hohenheim, Alemania durante la formación de doctorado, lo que me permitió estar en contacto y recibir el aporte de científicos destacados en investigación científica relacionada con la apicultura.

También, agradecer a las instituciones que participaron en las actividades correspondientes a este trabajo: EEA Inta Rafaela, EEA Inta Reconquista, AER Inta Gálvez, AER Inta Casilda y Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica del Instituto de Genética "Ewald Favret" CNIA, INTA Castelar.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- **Giacobino, A.**, Molineri, A., Bulacio-Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Pacini, A., Salto, C., Signorini, M. Risk factors associated with failures of *Varroa* treatments in honey bee colonies without broodless period. *Apidologie*, DOI: [10.1007/s13592-015-0347-0](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0347-0).
- **Giacobino, A.**, Molineri, A., Bulacio-Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Pacini, A., Salto, C., Signorini, M. El recambio de reinas como clave para prevenir pérdidas invernales de colmenas. Segundo Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Epidemiología Veterinaria y Medicina Preventiva. 05 al 07 de Noviembre de 2014, Buenos Aires, Argentina.
- **Giacobino, A.**, Molineri, A., Bulacio-Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Pacini, A., Salto, C., Signorini, M. Management practices associated with acaricide failure during autumn treatment against *Varroa destructor* in Honey Bee colonies from Argentina. Proceedings of the 10th COLOSS Conference. 6-8th September 2014, Murcia Spain (p.23).
- **Giacobino, A.**, Molineri, A., Bulacio-Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Salto, C., Signorini, M. Relación entre niveles de *Varroa* forética y *Varroa* en Cría para las diferentes zonas de Santa Fe. XI Congreso Latinoamericano de Apicultura, FILAPI. 03 al 06 de Septiembre de 2014, Puerto Iguazú-Misiones-Argentina (p. 151).
- **Giacobino, A.**, Molineri, A., Bulacio-Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Salto, C., Signorini, M. Factores de riesgo asociados a colmenas con elevados porcentajes de *Varroa* luego del tratamiento acaricida de otoño. XI Congreso Latinoamericano de Apicultura, FILAPI. 03 al 06 de Septiembre de 2014, Puerto Iguazú-Misiones-Argentina (p. 152).
- **Giacobino, A.**, Bulacio-Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Salto, C., Signorini, M. Risk factors associated with the presence of *Varroa destructor* in honey bee colonies from east-central Argentina. *Prev.Vet.Med.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.04.002>.
- **Giacobino, A.**, Bulacio-Cagnolo, N., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Merke, J., Salto, C., Signorini, M. Factores de riesgo asociados a la presencia pre-tratamiento de *Varroa destructor* en apiarios de la provincia

de Santa Fe. Congreso de la Asociación Argentina de Producción animal. 1 al 3 de Octubre-Corrientes, Argentina, 2013.

- **Giacobino, A.;** N. V. Bulacio Cagnolo; J. Merke; E. Orellano; M.L. Signorini y C. Salto. Aspectos generales de la biología de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) y situación actual de la Varroosis en la provincia de Santa Fe. Rev. FAVE, Sección Ciencias Veterinarias 10 (1): 19-31. 2011.

ÍNDICE GENERAL

Resumen y Abstract	1
Resumen.....	2
Abstract.....	4
Introducción y Materiales y Métodos generales	6
Introducción general.....	7
Hipótesis y Objetivo General.....	21
Materiales y métodos generales.....	23
Capítulo I	32
Introducción.....	33
Materiales y métodos.....	37
Resultados.....	42
Discusión.....	50
Conclusiones.....	55
Capítulo II	57
Introducción.....	58
Materiales y métodos.....	60
Resultados.....	63
Discusión.....	69
Conclusiones.....	74
Capítulo III	76
Introducción.....	77
Materiales y métodos.....	79
Resultados.....	82
Discusión.....	87
Conclusiones.....	92
Capítulo IV	94
Introducción.....	95
Materiales y métodos.....	96
Resultados.....	97
Discusión.....	104
Conclusiones.....	108
Capítulo V	109
Introducción.....	110
Materiales y métodos.....	113
Resultados.....	115
Discusión.....	123

Conclusiones.....	132
Capítulo VI.....	134
Introducción.....	135
Materiales y métodos.....	136
Resultados.....	139
Discusión.....	142
Conclusiones.....	144
Capítulo VII.....	146
Introducción.....	147
Materiales y métodos.....	148
Resultados.....	153
Discusión.....	155
Conclusiones.....	159
Capítulo VII.....	160
Introducción.....	161
Materiales y métodos.....	162
Resultados.....	164
Discusión.....	174
Conclusiones.....	175
Discusión General.....	176
Conclusiones Generales y Perspectivas futuras.....	180
Referencias Bibliográficas.....	183
Glosario y Abreviaturas.....	208
Anexos.....	211

INDICE DE TABLAS

Materiales y Métodos generales

Tabla 1. Resumen de variables derivadas de las encuestas que fueron evaluadas como potenciales factores de riesgo a lo largo de las cuatro fechas de muestreo.....	26
--	----

Capítulo I

Tabla 1.1. Ubicación geográfica de los apiarios distribuidos en las zonas de la provincia de Santa Fe.....	39
--	----

Tabla 1.2 Correlación de Spearman entre los porcentajes de Varroa Forética (VF) y Varroa en Cría (VC) y los parámetros de colmenas: cuadros con abejas (CCA), cuadros con cría (CCC), cuadros con polen (CCP) y cuadros con miel (CCM), para las tres zonas evaluadas en la provincia de Santa Fe.....	45
--	----

Tabla 1.3. Correlación de Spearman los porcentajes de Varroa Forética (VF) y Varroa en Cría (VC), para las tres zonas evaluadas en la provincia de Santa Fe, durante cuatro momentos de monitoreo clave para el desarrollo de la enfermedad.....	47
--	----

Tabla 1.4 Proporción de casos en cada una de las categorías de porcentaje de infestación con Varroa en estado forético y en estado reproductivo.....	48
--	----

Tabla 1.5. Comparación de la tasa de incremento, tasa de reproducción, la proporción de hembras no reproductivas y la descendencia no viable de individuos de <i>Varroa destructor</i> entre la zona norte, centro y sur de la provincia de Santa Fe.....	49
---	----

Tabla 1.6. Temperatura máxima, mínima y media diaria y humedad relativa para el periodo enero-febrero 2013 en Reconquista y Rafaela y enero-febrero 2014 en Casilda.....	50
--	----

Capítulo II

Tabla 2.1 Definición y distribución de las variables seleccionadas de acuerdo con el análisis bivariado ($P < 0,15$), como potenciales factores de riesgo asociados con altos porcentajes de infestación con <i>V. destructor</i> ($>3\%$).....	64
---	----

Tabla 2.2 Modelo mixto de regresión logística para factores de riesgo asociados con la prevalencia de colmenas con altos porcentajes de <i>V. destructor</i> ($>3\%$) al finalizar la	
---	--

temporada de cosecha y previo al tratamiento acaricida de otoño (n=384; Santa Fe, 2013).....	67
--	----

Capítulo III

Tabla 3.1 Modelo de regresión logística mixto para los factores asociados con la prevalencia de colmenas con FT (>1% VF) luego de la aplicación de un tratamiento contra <i>V. destructor</i> en otoño (efecto aleatorio: apiario; n=377).....	83
--	----

Tabla 3.2 Distribución espacial: <i>Cluster</i> de alta y baja tasa de colmenas con fallas en el control de <i>Varroa destructor</i>	86
--	----

Capítulo IV

Tabla 4.1 Asociación de variables generales del apiario, fortaleza de la colmena y parasitación con <i>Varroa</i> en otoño con el porcentaje de <i>Varroa destructor</i> durante el invierno en colmenas de la provincia de Santa Fe.....	98
---	----

Tabla 4.2 Asociación de los factores de manejo y categorías de fortaleza de la colmenas durante el otoño con el porcentaje de <i>Varroa destructor</i> durante el invierno en colmenas de la provincia de Santa Fe.....	99
---	----

Tabla 4.3 Modelo lineal generalizado mixto para factores asociados con el porcentaje de <i>Varroa destructor</i> en colmenas de <i>Apis mellifera</i> durante el invierno en la provincia de Santa Fe.....	101
--	-----

Capítulo V

Tabla 5.1 Factores de manejo y condiciones de la colmena asociados al porcentaje de parasitación con <i>Varroa</i> durante el inicio de temporada 2013-2014 evaluados en 280 colmenas distribuidas en 48 apiarios de la provincia de Santa Fe.....	116
--	-----

Tabla 5.2. Modelo lineal generalizado mixto (MLGM) ajustado para el porcentaje de parasitación con <i>Varroa</i> al inicio de la temporada 2013-2014 en 280 colmenas distribuidas en 48 apiarios de la provincia de Santa Fe.....	119
---	-----

Tabla 5.3. Agrupaciones espacio-temporales de colmenas con alta y baja probabilidad de superar los umbrales de daño a lo largo del ciclo productivo.....	122
--	-----

Capítulo VI

Tabla 6.1 Asociación entre potenciales factores de riesgo y el porcentaje de mortalidad invernal registrado en apiarios de la provincia de Santa Fe durante el año 2013.....	139
--	-----

Tabla 6.2 Modelo de regresión logística para factores de riesgo asociados al porcentaje de mortalidad invernal de colmenas en la provincia de Santa Fe (2013; n=42).....	141
--	-----

Capítulo VII

Tabla 7.1. Porcentaje de mortalidad esperado y observado por apiario para la exposición a la CL ₅₀ de base de los principios activos evaluados.....	153
--	-----

Tabla 7.2. Porcentaje de mortalidad observado en concentraciones crecientes (0 a 2 ug/ml) y CL 50 de flumetrina para el apiario I.....	154
--	-----

INDICE DE FIGURAS

Introducción general

Figura 1. Fases del ciclo biológico de *Varroa destructor* (inferior) acoplado con el desarrollo de *Apis mellifera* (superior).....9

Figura 2. Ciclo reproductivo de *Varroa destructor*10

Materiales y Métodos generales

Figura 1. Esquema de monitoreo estratificado de colmenas.....24

Figura 2. Cuadro de cría operculada de *Apis mellifera* inspeccionado para estimar el porcentaje de infestación de Varroa en Cría.....28

Figura 3. Cámara de cría de una colmena de *Apis mellifera* tipo Langstroth con 10 cuadros completos.....29

Capítulo I

Figura 1.1 Distribución de las encuestas de curva de floración por zona de la provincia de Santa Fe con relación a las regiones fitogeográficas38

Figura 1.2 Familia completa de *Varroa destructor*.....42

Figura 1.3 Caracterización del flujo de polen y néctar para la zona norte, centro y sur, de acuerdo con las encuestas realizadas a técnicos de Cambio Rural.....43

Figura 1.4 Caracterización del flujo de polen y néctar para la zona de costa de la provincia de Santa Fe de acuerdo con las encuestas realizadas a técnicos de Cambio Rural.....44

Figura 1.5 Calendario de las principales actividades/condiciones relacionadas con la actividad apícola para las distintas zonas de la provincia de Santa Fe de acuerdo con las encuestas realizadas a técnicos de Cambio Rural.....45

Capítulo II

Figura 2.1 Distribución por zona de los apiarios incluidos en los monitoreos de la etapa pre-tratamiento en la provincia de Santa Fe.....61

Figura 2.2 Esquema de interacción entre los factores de riesgo identificados en el modelo de regresión logística mixto asociados con la prevalencia de colmenas con

>3% de VF en etapa pre-tratamiento y las variables que fueron excluidas por el ajuste en el análisis multivariado.....69

Capítulo III

Figura 3.1 Esquema de interacción entre los factores de riesgo asociados con la prevalencia de colmenas con FT identificados en el modelo de regresión logística mixto y las variables que fueron excluidas por el ajuste en el análisis multivariado.....86

Figura 3.2 Distribución de apiarios monitoreados en la provincia de Santa Fe (n=62). A) Distribución de *cluster* (puramente espacial) posterior al tratamiento acaricida, de alta tasa (1 y 3) y baja tasa (2 y 4) de infestación con *Varroa destructor*. B) Asociación espacial entre *cluster* y la distribución de apiarios de acuerdo con el porcentaje de infestación con *V. destructor* previo al tratamiento acaricida de otoño C) Asociación espacial entre *cluster* y la distribución de apiarios de acuerdo con la aplicación de recambio de reina.....87

Capítulo IV

Figura 4.1 Efecto de la parasitación post-tratamiento acaricida y la alimentación con hidratos de carbono sobre la parasitación con *Varroa destructor* durante el invierno en colmenas de la provincia de Santa Fe.....103

Figura 4.2 Factores de confusión. Asociación entre las variables seleccionadas en el análisis bivariado y los factores principales identificados el modelo multivariado final.....104

Capítulo V

Figura 5.1. Esquema de interacción entre los factores de riesgo identificados en el modelo lineal generalizado mixto (MLGM) y las variables que fueron excluidas por el ajuste en el análisis multivariado.....121

Figura 5.2. Distribución espacio-temporal de colmenas con mayor (alta tasa) o menor probabilidad (baja tasa) de superar los umbrales de daño en el periodo post-tratamiento-invierno-inicio de temporada en la provincia de Santa Fe.....123

Capítulo VI

Figura 6.1 Porcentaje de Infestación con *Varroa destructor* durante el otoño 2013 y mortalidad de colmenas en invierno (% de colmenas por apiario) para todas las zonas en la provincia de Santa Fe.....142

Capítulo VII

Figura 7.1 Ubicación de los apiarios seleccionados para análisis de resistencia de poblaciones de *Varroa destructor* en la provincia de Santa Fe.....150

Figura 7.2 Porcentaje de infestación con *Varroa destructor* en abejas adultas (*Varroa forética*) anterior (pre) y posterior (post) al tratamiento acaricida provenientes de apiarios de la provincia de Santa Fe con sospecha de resistencia.....151

Figura 7.3. Extracción de hembras adultas de *V. destructor* para el análisis de poblaciones resistentes.....151

Figura 7.4. Incubación de cápsulas de Petri en estufa (29 ± 1 °C y $70 \pm 10\%$ de humedad) por 24 horas.....152

Figura 7.5 Esquema de rotación de principios activos en los apiarios seleccionados para análisis de resistencia de poblaciones de *Varroa destructor* en la provincia de Santa Fe.....155

Capítulo VIII

Figura 8.1 Condiciones de ciclado para amplificación de gen mitocondrial *cox I* de poblaciones de *Varroa destructor* provenientes de la provincia de Santa Fe.....164

Figura 8.2. Cromatogramas obtenidos como resultado de la secuenciación correspondiente a las ocho muestras analizadas.....165

Figura 8.3. Alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondientes a muestras de las cuatro zonas analizadas: norte, centro, sur y costa.....172

Figura 8.4 Alineamiento de la secuencia consenso obtenida a partir de muestras individuales de *V. destructor* provenientes de Santa Fe y las secuencias previamente publicadas por Solignac *et al.* (2005) y Anderson & Trueman (2000).....174

Discusión General

Figura 1. Relación entre los niveles de parasitación con *Varroa destructor* y sus factores de riesgo asociados a lo largo del ciclo productivo en colmenas de *Apis mellifera* de la provincia de Santa Fe.....178



RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

Varroa destructor (Anderson and Trueman) (Acari: Varroidae) es un ectoparásito obligado de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) y es considerado una de las mayores amenazas a la producción apícola global. El daño causado incluye la pérdida de peso, la malformación y el debilitamiento de las abejas melíferas. También es sugerido como la principal causa asociada con la mortalidad invernal de colmenas y un importante vector de virus presentes en las abejas. Poco se conoce acerca de los múltiples factores que afectan la presencia de *V. destructor* y su interacción en apiarios de Argentina. El objetivo de este estudio fue identificar los factores de riesgo asociados con la prevalencia de *V. destructor*. Se evaluaron el nivel de infestación con *V. destructor* y la fortaleza de las colmenas en 63 apiarios distribuidos en cuatro regiones de la provincia de Santa Fe. Los datos sobre las prácticas de manejo se recolectaron mediante la aplicación de encuestas. Se realizó un análisis en dos etapas para asociar variables de manejo con el riesgo de alcanzar niveles de infestación en abejas adultas mayores al 3%; 1% y 2% durante el otoño antes del tratamiento, después del tratamiento-invierno y el periodo de primavera, respectivamente. Entre los factores identificados se destacan el manejo nutricional (suplemento proteico y carbohidratos) y el recambio periódico de reinas en las colmenas. Además, a lo largo del año, se observó que el nivel de parasitación con *V. destructor* en un determinado momento se encontraba asociado con la condición de infestación que presentaban las colmenas en una etapa previa. El manejo en los apiarios también influyó sobre la mortalidad invernal que resultó asociada principalmente al porcentaje de colmenas que recambian la reina periódicamente. Se evaluaron además, características intrínsecas del parásito como potenciales factores de riesgo asociados a los niveles de *V. destructor*. No se encontraron poblaciones de ácaros resistentes a los principios activos utilizados en el control de Varroosis ni diferencias a nivel molecular cuando se comparan las secuencias para el gen mitocondrial *citocromo oxidasa I* entre individuos provenientes de distintos apiarios de la provincia de Santa Fe. La infestación con *V.*

destructor y la pérdida invernal de colmenas pueden explicarse por una interacción compleja de factores, donde el manejo aparece como una de las principales variables. Los estudios epidemiológicos proporcionan información clave para el diseño de programas de vigilancia contra la mayor amenaza para la apicultura a nivel mundial.

ABSTRACT

Varroa destructor (Anderson and Trueman) (Acari: Varroidae) is an obligate ectoparasite of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) and is considered one of the major threats for worldwide apiculture. Damage caused by varroa mite includes body weight loss, malformation and weakening of the honeybees. It was also suggested as the main cause associated with colony winter mortality and as an important vector for several honey bee viruses. Little is known about multiple factors and their interaction affecting *V. destructor* presence in apiaries from Argentina. The aim of this study was to identify risk factors associated with *V. destructor* prevalence. Parasitic mite infestation level and colony strength measures were evaluated in 63 apiaries distributed in four different regions in Santa Fe province. Data regarding management practices were collected by means of several questionnaires. A two step analysis was conducted to associate management variables with the risk of achieving mite infestation in adult bees higher than 3%; 1% and 2% during autumn prior to treatment, after treatment-winter and spring period, respectively. Among the identified factors, nutritional management (protein supplements and carbohydrates) and periodic queen replacement in the hives were the most important. Furthermore, throughout the year, it was observed that the percentage of infestation with *V. destructor* at a certain point was associated with infestation condition of the hives at an earlier stage. Apiaries management also influenced on winter mortality, which was mainly associated with the percentage of hives that periodically replaced their queens. Also, intrinsic characteristics of the parasite were evaluated as potential risk factors associated with *V. destructor* levels. No mite populations resistant to the active ingredients used in controlling Varroosis were found or differences at molecular level when sequences of mitochondrial gene cytochrome oxidase I among individuals from different apiaries distributed in Santa Fe province were compared. Mite infestation and winter colony losses can be explained by a complex interaction of factors, where management appears as one of the most important drivers. Epidemiological studies provide key

information to design surveillance programs against one the major threat to worldwide beekeeping.



**INTRODUCCIÓN Y
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES**

INTRODUCCIÓN

La apicultura es una actividad económica que posiciona a Argentina entre los primeros puestos a nivel mundial, ocupando el primer lugar como exportador de miel (aportando el 20% de las exportaciones totales) y el tercero como productor, contribuyendo con el 6% de la producción mundial. Argentina exporta más del 95 % de su producción debido al bajo consumo interno de miel y a la gran demanda principalmente de países de la Unión Europea. En 2013 y 2014 se exportaron 64.572 y 52.132 toneladas de miel a granel por un valor total de 211 y 192 millones de dólares, respectivamente (Blengino, 2013; 2014).

En la provincia de Santa Fe existen aproximadamente 3.735 productores apícolas con un total de 435.935 colmenas distribuidas en 19 departamentos (Departamento de Agricultura de Santa Fe, 2008). La mayoría son pequeños productores (hasta 210 colmenas), pocos son medianos (entre 211 y 500 colmenas) y los menos frecuentes son los grandes productores (más de 500 colmenas). La apicultura es considerada una actividad complementaria a otras actividades productivas, ya que el 72,2% de los apicultores la asumen como una actividad secundaria (ACDICAR, 2010). La provincia de Santa Fe aporta el 11% de la producción nacional, ocupando el tercer lugar entre las provincias productoras de miel.

No obstante, la cantidad y calidad de la producción de miel se ve amenazada tanto por problemas sanitarios como por los cambios en el uso de la tierra (Vandame & Palacio, 2010; Smith *et al.*, 2013). Dentro de los problemas sanitarios más destacados se pueden mencionar patologías como Varroosis, Nosemosis, Virosis y sus interacciones (Martin *et al.*, 2012).

Varroa destructor (Acari: Varroidae) es un ectoparásito obligado de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) y agente causal de Varroosis. Es una de las principales causas de disminución en la producción de miel y pérdida de colmenas (CONASA, 2002; Le Conte *et al.*, 2010; Guzmán Novoa *et al.*, 2010). *Varroa* (de aquí en adelante este término será utilizado como sinónimo de *Varroa destructor*, ya que es comúnmente

utilizado como equivalente) presenta persistencia de alta parasitación en colmenas tratadas, aumenta los costos de manejo y el tiempo invertido en tratamientos poco eficaces (Flores Serrano *et al.*, 2007), representando un problema económico trascendental para el sector apícola y una de las amenazas más importantes para esta actividad.

El efecto de Varroa destructor sobre las colmenas y la producción de miel

Varroa destructor produce en su hospedador deformación y acortamiento de apéndices y abdomen (Marcangeli *et al.*, 1992), reducción de la vida media y pérdida de peso de las abejas emergentes (De Jong & De Jong 1983; Duay *et al.*, 2003, Amdam *et al.*, 2004). También actúa como vector de otros agentes patógenos tales como hongos, bacterias y virus. La presencia de *Varroa* ha sido propuesta como uno de los factores involucrados en el Síndrome de Despoblamiento de Colmenas (vanEngelsdorp *et al.*, 2009) precisamente asociado al debilitamiento que produce en el sistema inmunológico de las abejas, permitiendo la transmisión de varios virus (virus de deformación de alas, virus de la parálisis aguda, etc.). El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) con el apoyo de los gobiernos provinciales realizó en 2007 un relevamiento de las patologías asociadas a la apicultura y encontró que *Varroa* presentaba la mayor ocurrencia en todos los estudios realizados. El 74% de las muestras recolectadas resultaron positivas para presencia de *Varroa*, con un 70% de infestaciones mayores al 1% y de éstas 46% mayores al 3%. Específicamente, para la provincia de Santa Fe se encontró un 68% de muestras positivas, con niveles de infestación mayores al 3% en el 55% de los apiarios, en muchos de los casos luego de la aplicación de acaricidas (SENASA, 2007). Estos elevados niveles de parasitación son el reflejo de la deficiencia en las estrategias de control de *Varroa*, especialmente en el control químico, que en muchos casos podría incluso llevar a la aceleración de la aparición del fenómeno de resistencia a los acaricidas. El mismo estudio conducido por el SENASA encontró que el 29% de los

productores aplicó preparaciones caseras para el tratamiento de la parasitosis, solo el 8% utilizó acaricidas orgánicos y casi el 70% de los productores no rotó los principios activos o directamente no los conoce (SENASA, 2007). Los problemas de manejo y control de Varroa junto con la gran capacidad del ácaro de sobrevivir y reproducirse exitosamente en las colmenas hacen que en la actualidad la Varroosis sea el principal problema sanitario y consuma gran parte de los recursos de los gobiernos, cooperativas apícolas e instituciones públicas (SENASA, Resolución 81/2015).

Características generales de *Varroa destructor* y su ciclo asociado a *Apis mellifera*

El ciclo biológico de Varroa (Rosenkranz *et al.*, 2010) está dividido en dos fases: una forética (sobre la abeja adulta y succionando hemolinfa) que dura entre 4 y 14 días y otra reproductiva (dentro de la celda de cría de obreras y zánganos), que dura entre 12 y 13 días (Figura 1).

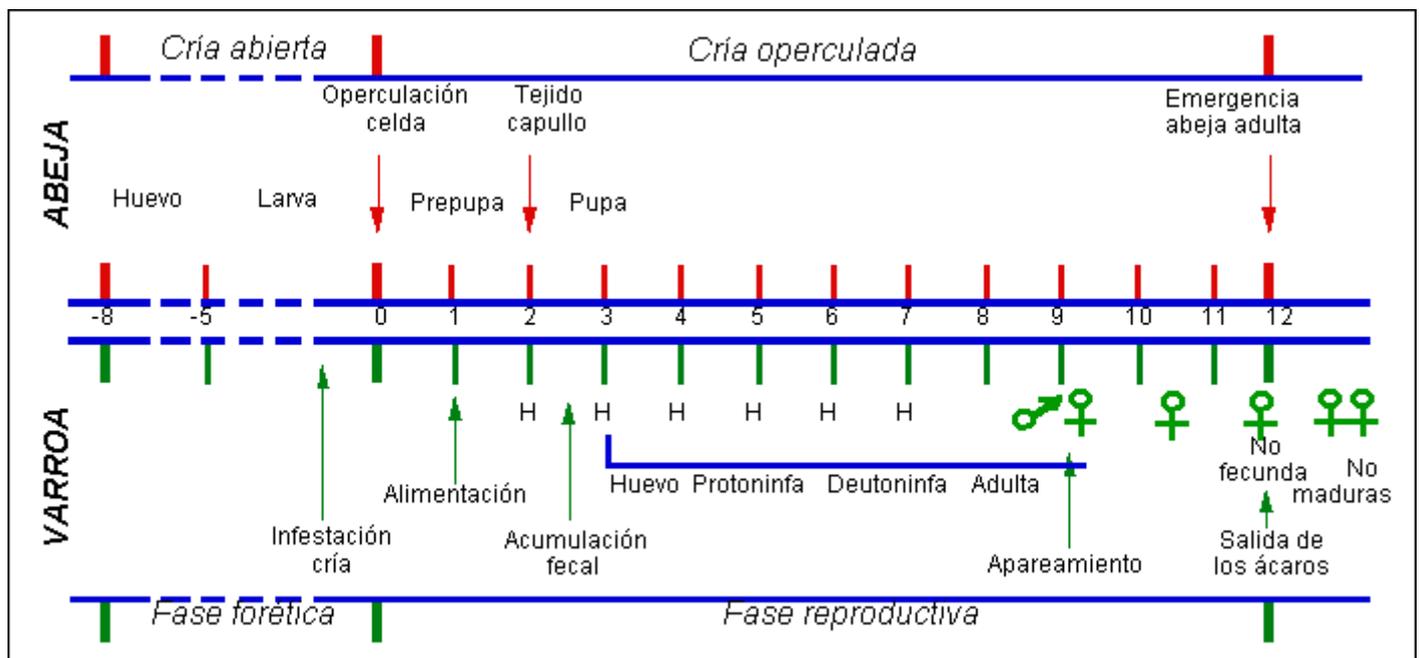


Figura 1. Fases del ciclo biológico de *Varroa destructor* (inferior) acoplado con el desarrollo de *Apis mellifera* (superior). El día 0 corresponde al operculado de la celda (extraído de Vandame, 2000).

Esta última se inicia cuando el parásito se aloja en el fondo de la celda, horas antes del inicio del operculado (quinto estadio de desarrollo larval) y comienza a alimentarse

del alimento larval (Nazzi *et al.*, 2006), permaneciendo inactivo hasta que se inicia la fase de pupa de la abeja. A partir de allí comienza el desove (aproximadamente 60 horas después del operculado de la celda de cría). El primer huevo dará origen a un macho y posteriormente con intervalos de 30 horas son puestos huevos que darán origen a hembras (Figura 2).

La madurez sexual se alcanza en el macho 5,5/6 días y en la hembra 7,5/8 días, produciéndose la copula en la celda de cría. Los machos y las fases inmaduras mueren en la celda mientras que la hembra adulta de *V. destructor*, ya fecundada, emerge junto con la abeja. Si la celda parasitada es de obrera cada hembra fecundada que ingresa dará en promedio 1,6 ácaros hembras fecundadas mientras que si es de zángano, debido a la mayor duración del periodo de operculado, el número aumenta a 2,7 hembras hijas/hembra fundadora. Para iniciar un nuevo ciclo de reproducción, la hembra debe permanecer entre 4 y 5 días en fase forética sobre la abeja con la que emergió (Fries & Rosenkranz, 1996).

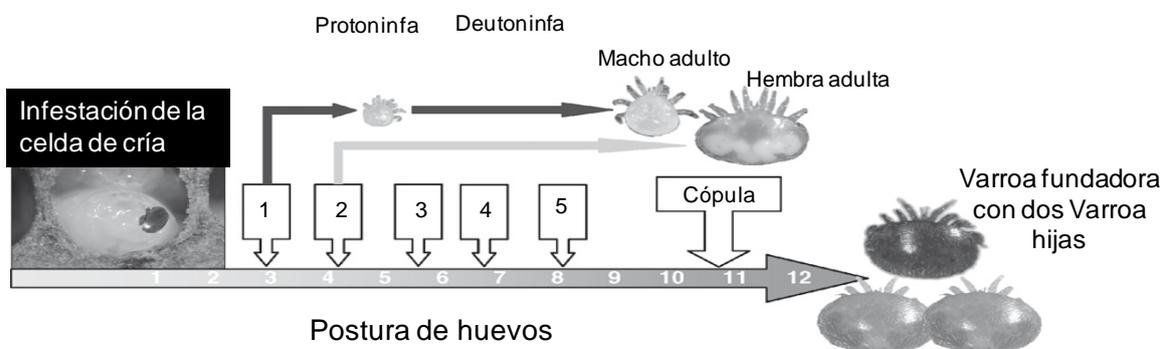


Figura 2. Ciclo reproductivo de *Varroa destructor* (modificado de Rosenkranz *et al.*, 2010).

Varroa destructor presenta adaptaciones al parasitismo que le permiten un desarrollo poblacional eficaz dentro de las colonias. Entre ellas se destaca la selección de hospedadores de acuerdo con la edad y/o la función de las abejas (Calderone *et al.*, 2002; Pernal *et al.*, 2005). *Varroa* parasita preferentemente abejas nodrizas porque le

permite acercarse a las celdas de cría y abejas pecoreadoras porque le permite infestar nuevas colmenas (Bruno, 2003).

Varroa presenta tasas de infestación entre 5 y 9 veces mayor en celdas de zánganos comparadas con las celdas de obreras, principalmente porque la diferencia en el tiempo y duración del periodo de operculado le permite aumentar su efectividad reproductiva (Calderone & Kuenen, 2003). Existen estudios que plantean un mecanismo de comunicación basado en el patrón de secreción de ciertos ésteres liberados por larvas del quinto estadio (Le Conte & Arnold, 1987; Trouiller & Milani, 1999). Estos tienen un efecto de tipo feromona en las abejas al desencadenar el proceso de operculado (Le conte *et al.*, 2001) y un efecto de tipo kairomona en Varroa indicando el momento de invasión de las celdas de cría. Las larvas de zánganos secretan mayores cantidades de ésteres durante mayor tiempo lo que permite explicar al menos en parte la preferencia del ácaro por este tipo de celdas (Trouiller *et al.*, 1994).

Los estadios de abejas más sensibles a la Varroosis son larva y pupa (Rosenkranz *et al.*, 2010). Cuando la prevalencia parasitaria es alta dentro de las celdas de cría, las abejas emergentes presentan distintos tipos de malformaciones en alas, patas y abdomen (Marcangeli *et al.*, 1992) con un promedio de vida en el estadio adulto más corto (Amdam *et al.*, 2004). Esto último ocasiona que la producción de miel y de cría se vea disminuida (Delfinado-Baker, 1988; Murilhas, 2002). Estudios recientes demostraron que las abejas pecoreadoras o forrajeras parasitadas presentan una escasa capacidad de aprendizaje no asociado, ausencias prolongadas fuera de la colonia y una reducida tasa de retorno a la misma (Kralj & Fuchs, 2006; Kralj *et al.*, 2007) ocasionando un aumento considerable de la mortalidad de las colmenas (De Jong, 1997).

No obstante, el daño producido en las abejas individuales, para la estimación del impacto real del parásito debe considerarse la organización social de las abejas, denominada por algunos autores como "Superorganismo" (Moritz & Fuchs, 1998) Este

daño es considerado como indicador de la necesidad de un tratamiento terapéutico y depende de la estación del año y la presencia de virus asociados. El umbral de daño determinado es un parámetro de naturaleza económica y no biológica y por lo tanto se aplica en las decisiones de manejo de colmenas con fines exclusivamente de producción y rentabilidad (Delaplane & Hood, 1999).

Diseminación de la enfermedad

La transmisión de *Varroa* es horizontal (entre individuos de una misma generación) y vertical (entre parentales y descendencia). Además, en el caso de las abejas la transmisión puede ser intracolonia o intercolonia. Principalmente, la diseminación del ácaro depende de un grupo de factores relacionados al comportamiento de la abeja como pecoreo, pillaje, enjambrazón, que a su vez están influenciados por factores genéticos y ambientales. Las prácticas de manejo de las colmenas constituyen un segundo grupo de factores que contribuyen a la transmisión horizontal de *Varroa*, permitiendo que se mantengan las formas más virulentas del parásito en comparación con áreas donde no se han implementado prácticas de control (Fries & Camazine, 2001). Este efecto sobre la diseminación de la enfermedad puede reducirse diseñando esquemas de manejo adecuados.

Equilibrio parásito-hospedador

Anderson & Trueman (2000) determinaron que *V. destructor* y *V. jacobsoni* eran dos especies diferentes que parasitaban tanto a *A. mellifera* como a *A. cerana*. Solo dos haplotipos de *V. destructor* habrían sufrido un cambio de hospedador de *A. cerana* a *A. mellifera*, debido principalmente a la introducción de esta última en Asia aproximadamente 30 años atrás (Oldroyd, 1999). *Varroa destructor* no afecta a las colonias de *A. cerana* de la misma forma que a *A. mellifera*. Para el caso de *A. cerana*, *V. jacobsoni* se considera un parásito benigno, producto de una larga historia de coadaptación (Oldroyd, 1999). Dado que existen similitudes entre ambas especies de

abejas, es probable que con el paso del tiempo ocurra también una co-adaptación con *A. mellifera* (Fries & Camazine, 2001). El equilibrio en las relaciones parasito-hospedador puede ser crucial para el bienestar del hospedador tanto a nivel individual (inmunidad) como a nivel poblacional (diversidad genética) (Daszak *et al.*, 2000).

Apis cerana posee una serie de mecanismos de defensa que le permiten mantener la población del ácaro dentro de los límites aceptables para no producir daño en la colonia (Ruttner & Hänel, 1992). Estos factores son: i) la reproducción exclusiva del parásito en celdas de zánganos, ii) la remoción y comportamiento higiénico efectivo por parte de las obreras (el único presente también en *A. mellifera*) y iii) *Entombing* en la cría de zánganos (cierre y refuerzo del operculado para que no pueda emerger el adulto infestado con Varroa). Las obreras de *A. cerana* tienen gran capacidad de autolimpieza (*grooming*) lo que les permite remover los parásitos de su cuerpo y de la colmena evitando que puedan infectar otras celdas (Buchler *et al.*, 1992; Fries *et al.*, 1996; Rath, 1999). Estudios independientes sugieren que las adaptaciones que llevan a la co-existencia entre ambas especies pueden ocurrir tanto en abejas como en las poblaciones de ácaros (Fries & Bommarco, 2007) y que un punto crucial en el equilibrio parásito–hospedador es la reproducción de *V. destructor* exclusivamente en celdas de zánganos (Rath, 1999).

Factores que afectan la dinámica poblacional de Varroa destructor

El crecimiento de la población de parásitos depende del equilibrio entre la tasa reproducción y la tasa de mortalidad de los individuos dentro de la colmena en un momento dado. Estos dos parámetros a su vez son afectados por una serie de factores que pueden estar relacionados al hospedador, al parásito, al ambiente o una combinación de varios de ellos (Moretto *et al.*, 1991). Sin embargo, existen relaciones complejas, probablemente sinérgicas, entre todos los factores que afectan a la dinámica poblacional que dificultan su análisis.

Factores asociados al Ambiente

Como primera barrera para la ocurrencia de Varroa, la temperatura restringe la distribución de su hospedador y por lo tanto también lo hace con su propia distribución (García Fernández, 1997). La temperatura y humedad son factores ambientales que limitan el crecimiento de las poblaciones del ácaro en forma directa (Harris *et al.*, 2003) mientras que la disponibilidad de polen y el flujo de néctar lo hacen indirectamente regulando la disponibilidad de celdas para su reproducción. El área de cría en colmenas ubicadas en ambientes templados varía a lo largo del año, desde muy abundante en verano hasta mínima o nula en invierno, lo que interrumpe la reproducción del parásito durante esta época. Esto no alcanza a detener el daño del ácaro porque la población de *A. mellifera* se reduce y la parasitación relativa aumenta. Las abejas invernantes, que deben sobrevivir durante aproximadamente tres meses, son más vulnerables al efecto del parásito y sólo colmenas con un gran número de abejas llegan a primavera en buenas condiciones para el comienzo de la temporada productiva.

Factores asociados a A. mellifera

Las características genotípicas y fenotípicas de las abejas tienen gran influencia sobre la capacidad de crecimiento de las poblaciones del ácaro y la prevalencia de la parasitosis. Se conoce que las abejas de razas africanizadas son más tolerantes que las abejas de razas europeas (Mondragón *et al.*, 2006) debido a ciertas características que les confiere su genotipo como la producción de celdas de menor tamaño (Maggi *et al.*, 2010a) y la reducción de la tasa reproductiva de varroa en celda de obreras (Carneiro *et al.*, 2007). La capacidad de las abejas para defenderse (mediante el comportamiento higiénico y el *grooming*), la disponibilidad de cría y el período de duración de cría operculada de las obreras, son fundamentales para que el parásito pueda reproducirse (Moritz & Hänel, 1984; Dustmann, 1993). Muchas de estas

características son afectadas no sólo por el ecotipo o raza de abeja sino también por las condiciones ambientales, por ejemplo la poca disponibilidad de néctar aumenta el pillaje y consecuentemente la transmisión de *Varroa* a otras colmenas (Root, 1993). Existen además trabajos que proponen que las colmenas que son tolerantes al parásito presentan una gran proporción de hembras del ácaro no reproductivas (Martin *et al.*, 1997). Sin embargo, la causa y el mecanismo por el cual se reduce la fertilidad de las hembras *Varroa* no está claro.

Factores asociados a V. destructor

La capacidad natural del ácaro para adaptarse y la selectividad en la parasitación de abejas con perfiles etarios y funcionales particulares, son dos características fundamentales en la dinámica poblacional de *V. destructor*. Particularmente, los parámetros de potencial reproductivo como la tasa de reproducción, la tasa de incremento y la proporción de hembras reproductivas regulan el tamaño de sus poblaciones, siendo ellos mismos regulados por una confluencia de factores ambientales (Moretto *et al.*, 1991; Kraus & Velthuis, 1997; Harris *et al.*, 2003) y propios del hospedador (Locke *et al.*, 2012; Frey *et al.*, 2013). En general, se asume que la eficacia reproductiva del parásito está más relacionada a estos últimos que a factores intrínsecos de su raza/ecotipo, aunque se deberían realizar estudios adicionales orientados a este aspecto. La reproducción de *Varroa* disminuye cuando el número de parásitos por celda aumenta, lo que se identifica como componente denso-dependiente de su dinámica y permite que las poblaciones del parásito se auto-regulen (Eguaras, 1993). Sin embargo, no está claro si la disminución en la reproducción del ácaro se debe a una reacción propia de la competencia intra-específica o a una respuesta inmune de las abejas (Eguaras, 1993).

Control de Varroa destructor

Las medidas de control para mantener las poblaciones de Varroa por debajo del umbral de daño económico, requieren de la implementación de diferentes estrategias. Esto demanda la planificación de acciones de manejo de acuerdo al comportamiento anual de la enfermedad. La reproducción de Varroa tiene su pico en verano que corresponde al momento de mayor disponibilidad de cría y la máxima intensidad parasitaria en invierno cuando el número de abejas está reducido (Eguaras, 1993). El momento en que se produce mayor daño a las colonias es durante el invierno dado el estado de susceptibilidad de las abejas durante esta época del año. Las poblaciones del ácaro deben monitorearse, de lo contrario las colmenas colapsan en un término medio de dos años (Calatayud Tortosa, 2002; Bulacio Cagnolo, 2011). El esquema de monitoreo debe diseñarse en función de la temporada productiva y en consecuencia del desarrollo de la población de *A. mellifera*. Por lo general, se recomienda realizar un muestreo al comienzo de la temporada (determinado por el flujo de néctar) y otro luego de la cosecha de miel que permita diagnosticar la presencia de la parasitosis (Unger & Poffer, 2012). En los casos donde se aplica un tratamiento, deben realizarse dos muestreos adicionales durante el tratamiento y al finalizarlo. Este esquema permite evaluar la verdadera efectividad de la aplicación del acaricida y principalmente evitar que, en los casos donde el acaricida por diversos motivos no funciona, las colmenas comiencen el invierno con altos niveles de infestación (Boecking & Genersch, 2008).

A pesar que el 95% de los productores de la zona centro de la provincia de Santa Fe realizan tratamientos para Varroa, el 88% lo hace con productos aprobados, sólo el 12% hace un muestreo previo a la aplicación del acaricida y el 43% lo hace posteriormente. Únicamente productores que recibieron asesoramiento técnico realizaron muestreos post-tratamiento (50%) (ACDICAR, 2010).

Los principales acaricidas de síntesis que están disponibles en el mercado son productos comerciales a base de los principios activos cumafós, flumetrina, fluvalinato

y amitraz. Su uso tiene ventajas, como su fácil aplicación y bajo costo. No obstante, son persistentes en el ambiente, se acumulan en propóleos, miel y ceras (Tremolada *et al.*, 2004; Medici *et al.*, 2009a; Medici *et al.*, 2009b), constituyen un riesgo para la salud humana y con el tiempo generan resistencia (Bruno, 2003; Maggi *et al.*, 2009; Maggi *et al.*, 2010b). Muchas veces la falta de información obstaculiza el buen uso de estos compuestos ya que al no rotarse o aplicarse de manera inapropiada aceleran el proceso de generación de resistencia (Wallner & Fries, 2003).

Otro tipo de acaricidas denominados “blandos” u orgánicos constituyen una alternativa, dado que tienen bajo riesgo de persistencia y acumulación, no contaminan la miel (Bogdanov, 2006) y presentan baja probabilidad de desarrollar resistencia (Rosenkranz *et al.*, 2010). Aun en estos casos, estos productos son de efecto muy variable, su eficacia está fuertemente condicionada tanto por variables ambientales como por la dosis (Higes *et al.*, 1999; Underwood & Currie, 2003) y se ha registrado en algunos casos la presencia de estos compuestos en los órganos internos de las abejas (Nozal *et al.*, 2003; Martín- Hernández *et al.*, 2007). Los más utilizados son el ácido oxálico, el ácido fórmico y el timol. Se han realizado ensayos para determinar el efecto varroocida del timol para Rafaela (región centro-oeste de la provincia de Santa Fe), donde se obtuvo un 80% de eficacia en amplitudes térmicas de 10 °C, con mínimos y máximos aproximados de 10 y 34°C, respectivamente (Bulacio Cagnolo *et al.*, 2010). Con relación a los otros acaricidas orgánicos nombrados anteriormente, se observaron eficacias superiores al 66% en diferentes regiones de la provincia (Bulacio Cagnolo, 2011).

En cuanto a alternativas a tratamientos, existen nuevos estudios con relación a la tolerancia a Varroa de colmenas determinada por características genéticas de *A. mellifera* (Merke & Palacio, 2011).

El enfoque epidemiológico: estudio de los factores de riesgo

Descripción de la ocurrencia de una enfermedad

La aplicación eficiente de cualquier programa de manejo de enfermedades requiere de información precisa acerca del manejo cuantitativo de la intensidad de la enfermedad, es decir la “cantidad de la enfermedad en una población” (Nutter, 1999). La cuantificación de una enfermedad puede estar dada por el número de casos presentes en una población conocida en un determinado momento del tiempo (prevalencia) o el número de nuevos casos presentes en una población conocida en un periodo de tiempo determinado (incidencia) (Thrusfield, 1995).

Causas de una enfermedad

Los estudios epidemiológicos intentan identificar los factores que pueden explicar o contribuir a la aparición de una enfermedad (VanEngelsdorp *et al.*, 2013), que por lo general es fenómeno multicausal (Dohoo *et al.*, 2003). Los factores de riesgo son los determinantes de una enfermedad, es decir, una característica o atributo que afecta la salud de una población. Estos pueden clasificarse en primarios o secundarios de acuerdo con la magnitud del efecto que producen sobre la ocurrencia de la enfermedad. Los primarios son necesariamente causas, como el agente etiológico. Los determinantes a su vez pueden clasificarse según se encuentren asociados al hospedador, al agente etiológico o al ambiente (Thrusfield, 1995). Particularmente, las patologías en insectos sociales están determinadas por una red compleja de interacciones que incluye múltiples factores asociados tanto a las colmenas como al ambiente (Naug & Camazine, 2002). Asimismo, en el caso de *Apis mellifera* la complejidad aumenta dado la intervención del hombre en el mantenimiento y reproducción de colmenas productoras de miel.

Factores de riesgo

Para reducir la ocurrencia de una enfermedad en una población es necesario cuantificar la enfermedad pero también identificar los factores de riesgo que contribuyen a su presencia o desarrollo. Un factor de riesgo es aquel que incrementa la probabilidad de que se presente una determinada enfermedad o fenómeno de interés (VanEngelsdorp *et al.*, 2013).

Existen dos tipos de estudios que permiten establecer la asociación existente entre la exposición a uno o más factores y un resultado binario (enfermo-no enfermo), los estudios experimentales y los observacionales.

En los estudios observacionales, la exposición no está determinada por el investigador, dado que es diseñado de modo tal de reconocer la ocurrencia o no de una enfermedad y registrar una serie de variables que están o estuvieron presentes en cada uno de los individuos analizados (exposición). Existen estudios observacionales que hacen un seguimiento de la experiencia de la población a lo largo del tiempo (diseño longitudinal) (Delgado Rodríguez & Llorca Díaz, 2004) y otros que realizan un “corte” en la población en un momento determinado (diseño transversal) (VanEngelsdorp *et al.*, 2013). Los estudios transversales son utilizados para estimar la prevalencia y para identificar asociaciones potenciales entre un factor de riesgo y la ocurrencia de una enfermedad (Smith, 2006; VanEngelsdorp *et al.*, 2013). No es posible determinar causalidad en este tipo de estudios dado que la exposición y el resultado en cada uno de los individuos son registrados en el mismo momento (VanEngelsdorp *et al.*, 2013).

Identificar los factores asociados a la presentación de una enfermedad es esencial para comprender la multicausalidad de la misma y permite diseñar medidas tendientes a controlarla con base científica. Sin este tipo de estudios epidemiológicos sería imposible diagramar campañas de control o erradicación efectiva de las enfermedades.

Análisis espacial

Los patrones espaciales de la ocurrencia de una enfermedad pueden ser uniformes, aleatorios o agrupados (en *cluster*) (Ward & Carpenter, 2000). Comprender el impacto de la localización (entendida como distribución en el espacio) es un elemento clave en la investigación epidemiológica (Auchincloss *et al.*, 2012).

Los métodos de análisis espacial son herramientas clave dentro del contexto de análisis de riesgo de una enfermedad y al mismo tiempo colaboraran en el desarrollo de estrategias de manejo de dicho riesgo (Pfeiffer *et al.*, 2008). En particular, las pruebas de detección de *cluster* agregan un volumen de información considerable a la investigación de enfermedades y proveen a los epidemiólogos de fundamentos firmes sobre los cuales plantear hipótesis causales e implementar estrategias de control (Ward & Carpenter, 2000). Estos métodos han superado las limitaciones de los anteriores con relación a la potencia estadística, incluyendo situaciones en las cuales existen pocos casos detectados, alta variabilidad en la densidad de la población subyacente y el tamaño y forma de los *cluster* (Auchincloss *et al.*, 2012).

Los métodos para detectar *cluster* se clasifican en “Local” o “Global”. Los métodos globales o no específicos se utilizan para determinar si existe un agrupamiento evidente de los datos a lo largo de la región de estudio pero no identifican la ubicación de dichos *cluster*. Miden el grado de agregación que presentan los datos a través de una prueba estadística cuya hipótesis nula es que los datos se distribuyen de manera aleatoria, es decir no presentan agrupamiento alguno. Los métodos de detección local o específicos en cambio, definen la ubicación y el tamaño de los *cluster* (Pfeiffer *et al.*, 2008).

Spatial Scan Statistic es un test de detección de *cluster* que permite localizar el sitio y radio de cada *cluster*, así como testear su significancia estadística (Ward & Carpenter, 2000). Según Auchincloss *et al.* (2012), es el método de detección de *cluster* más común en la publicaciones revisadas de los últimos años. Consiste en generar múltiples círculos cuyos centroide se van desplazando a lo largo de la región de

estudio. Para cada posición del centroide, el radio cambia y toma valores entre cero y un límite superior establecido por el investigador (como máximo 50% de toda la población). Se definen de esta manera los *cluster* potenciales, cada uno con diferente localización y tamaño. El test de radio de verosimilitud (*likelihood ratio test*) plantea como hipótesis alternativa que existe al menos un círculo para el cual el riesgo de ocurrencia de la enfermedad es mayor dentro que fuera del mismo. Para ello, se comparan los casos observados sobre los casos esperados si la ocurrencia de la enfermedad presentara una distribución aleatoria (Kulldorff & Nagarwalla, 1995; Kulldorff *et al.*, 2003).

Debido a la problemática compleja que representa la presencia de *Varroa destructor* en colmenas de *Apis mellifera*, se presenta como desafío la implementación de un manejo integrado de plagas (MIP), donde el monitoreo a campo de las poblaciones de ácaros, la rotación de productos acaricidas, la incorporación de moléculas orgánicas y la implementación de técnicas de manejo, adquieren un nuevo protagonismo para mantener las poblaciones por debajo del umbral de daño económico. En este contexto, el desarrollo de un sistema de vigilancia epidemiológica para *V. destructor* resulta fundamental. Estos sistemas requieren, como paso previo a su diseño, conocer aquellos factores de riesgo, asociados al manejo de los apiarios, la dinámica poblacional del parásito y los diferentes ambientes en los cuales se desarrolla la apicultura y que tienen un impacto significativo sobre la prevalencia de *V. destructor*.

HIPÓTESIS

- Las prácticas de manejo de los apiarios y las condiciones ambientales favorecen la presencia de elevados niveles de infestación con *Varroa destructor*.
- El agente causal de la Varroosis presenta en el territorio provincial diferentes patrones de resistencia a los acaricidas empleados normalmente en su control.

- Las diferencias genéticas entre las poblaciones de *V. destructor*, a nivel provincial, pueden explicar, al menos en parte, el comportamiento diferencial de la enfermedad.
- Dado que la distribución espacial de *Varroa destructor* no es uniforme a lo largo de la región de estudio, existen agrupaciones de colmenas con mayor riesgo de presentar altos niveles de parasitación.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es identificar los factores de riesgo asociados a la presencia y difusión de *Varroa destructor* en los apiarios de la provincia de Santa Fe como paso previo al diseño de un Sistema de Vigilancia Epidemiológica activa.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Descripción del área de estudio

El estudio fue realizado en la provincia de Santa Fe ubicada en el centro este de Argentina. La provincia está dividida administrativamente en 19 departamentos con una extensión total de 133.007 km² (Arzamendia & Giraudo, 2004).

El clima de Santa Fe es templado sin estación fría en el sur y templado y cálido en el norte; con un régimen hídrico que varía de húmedo a sub-húmedo de este a oeste (Arzamendia & Giraudo, 2004). Los principales tipos de vegetación de Santa Fe han sido incluidos en cuatro provincias fitogeográficas y cinco subdivisiones: la provincia del Chaco (seco y húmedo), la provincia del Espinal, el valle de inundación del río Paraná y la provincia Pampeana (Burkart *et al.*, 1999).

La provincia se caracteriza por una fuerte presencia en la producción agrícola-ganadera. Del total de la superficie provincial, el 26% es de neta capacidad de uso agrícola (mitad sur de la provincia), el 31,5% exclusivamente ganadera (mitad norte de la provincia) y el 32,4% posee aptitud ganadero-agrícola (Castignani, 2011).

Diseño de esquema de monitoreo

Durante el año 2013, se realizó un monitoreo en colmenas de *A. mellifera* a lo largo de la provincia de Santa Fe. Se establecieron cuatro fechas de muestreo: previo al tratamiento de otoño (febrero-mayo), posterior al tratamiento de otoño (mayo-junio), durante el invierno (agosto) y al inicio de la temporada de cosecha de miel (septiembre-diciembre).

La provincia de Santa Fe cuenta con aproximadamente 3735 productores registrados en el Registro Nacional de Productores Apícolas (RENAPA) con una prevalencia esperada de colmenas que superan el umbral de daño de 74% (SENASA, 2007). Con base en esta información se estableció un tamaño de muestra de 63 apiarios distribuidos en la provincia y provenientes de diferentes apicultores (nivel de confianza

de 95 % y un error menor al 10%). Los apiarios fueron elegidos a través de un proceso de aleatorización estratificada (números aleatorios computarizados) (Moher *et al.*, 2010) teniendo en cuenta la heterogeneidad ambiental de la provincia (abordada en detalle en el capítulo 1) y la proporción de apiarios presentes en cada zonas (Figura 1). La estratificación espacial es utilizada en estudios a gran escala para asegurar una determinación insesgada en el número de unidades experimentales.

La localización geográfica de cada establecimiento involucrado en los monitoreos se determinó con un instrumento de posicionamiento geográfico o de acuerdo a los registros del RENAPA.

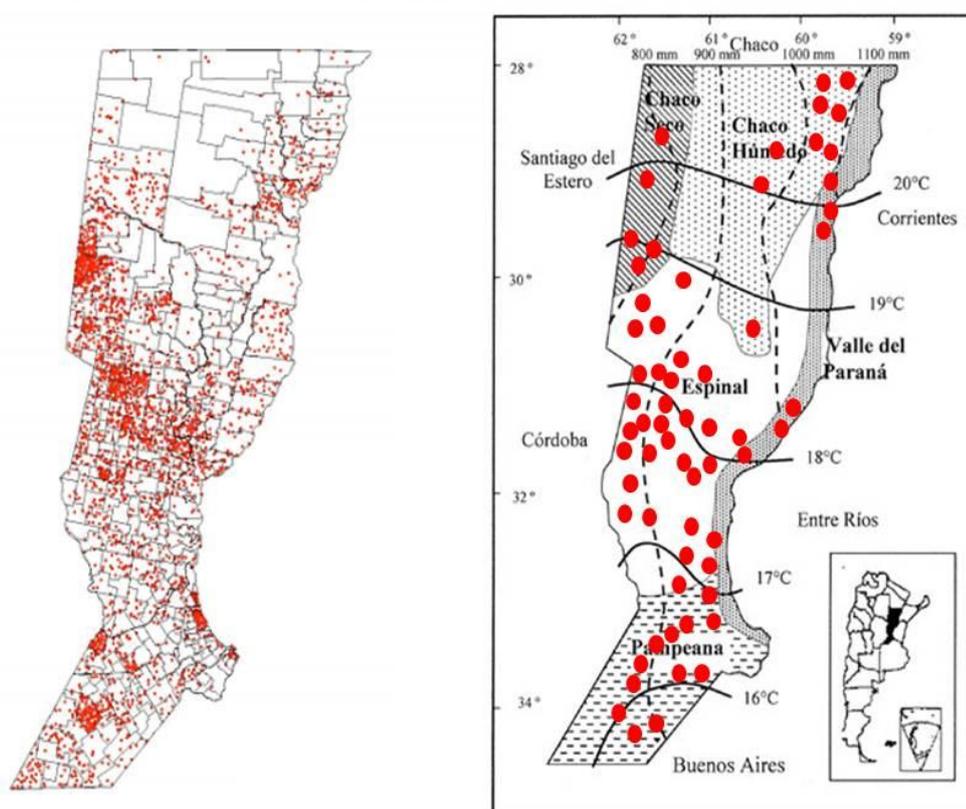


Figura 1. Esquema de monitoreo estratificado de colmenas. Izquierda: distribución de colmenas en la provincia de Santa Fe (Extraído de Departamento de Agricultura de Santa Fe, 2008). Derecha: distribución por zona de los apiarios monitoreados en la provincia de Santa Fe durante 2013 (Extraído y modificado de Arzamendia & Giraud, 2004).

En cada apiario se tomaron datos en el 10 % de las colmenas o un mínimo de 6 en aquellos con menos de 60 colmenas (Lee *et al.*, 2010). Las colmenas registradas en la

primera visita fueron correctamente rotuladas para realizar el seguimiento a lo largo del año.

Durante cada visita a los apiarios se registraron en todas las colmenas seleccionadas el número de cuadro con abejas (CCA), número de cuadro con cría (CCC), número de cuadros con polen (CCP) y número de cuadros con miel (CCM). En conjunto estas variables se denominarán de aquí en adelante como fortaleza de la colmena. Además se tomó una muestra de abejas adultas para determinar el porcentaje de infestación de *Varroa forética* de acuerdo con la prueba del frasco (descrita posteriormente en esta sección). Las colmenas seleccionadas fueron manejadas por el apicultor de la misma manera que las restantes en el apiario y de acuerdo con el manejo habitual que realiza el productor.

Datos generales del apicultor y encuestas de manejo

Durante cada visita a los apiarios también se realizó una encuesta semi-estructurada (Anexos 2 a 5) con el objetivo de obtener datos generales del apicultor (tipo de actividad económica, número de colmenas que posee en total, años de experiencia en la apicultura) y datos sobre el manejo del apiario (alimentación, tratamientos acaricidas, monitoreos y sanidad). Antes de aplicar la encuesta se les explicó el objetivo del trabajo dejando en claro que no se pretendía obtener información de ningún apiario en particular sino la frecuencia a nivel poblacional. Las encuestas fueron procesadas para obtener las variables que se utilizaron posteriormente en los correspondientes análisis de factores de riesgo (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de variables derivadas de las encuestas que fueron evaluadas como potenciales factores de riesgo a lo largo de las cuatro fechas de muestreo.

Factores/variables	
	Región: Norte, Centro, Sur y Costa
Datos generales del apiario	Tamaño del apiario: número de colmenas por apiario
	Antigüedad Apicultura: número de años de experiencia en la actividad
	Tipo de actividad: Primaria (dedicación exclusiva) o Secundaria
	Mortalidad promedio durante los últimos 3 años: % of colmenas por año
	Promedio de cosecha de miel (últimos 3 años): kg. por colmena
Prácticas de Manejo	Suplementación proteica: polen natural, polivitamínicos o torta de polen
	Alimentación c/ carbohidratos: Jarabe de sacarosa o maíz de alta fructosa
	Estación del año y objetivo de la suplementación
	Multiplicación de colmenas: Si o No (producción de núcleos)
	Frecuencia (en años) de recambio de reinas
	Porcentaje de colmenas sobre las cuales se realiza el recambio de reinas
	Reemplazo anual de Cuadros: cuadros nuevos por colmena/año
	Desinfección del material inerte post-cosecha: Si/No
	Trashumancia: Si/No
	Trashumancia: donde y por cuánto tiempo
Tratamientos contra Varroa	Tratamiento de Otoño: principio activo y marca de producto
	Monitoreo de las colmenas antes y después de aplicación: Si/No
	Tratamiento de Invierno: Si/No; Principio activo, y marca del producto
Posterior al tratamiento	Rotación de los principios activos últimos 2, 3 o 4 años: Si/ No
	Producto acaricida aplicado
Invierno	Fecha de aplicación
	Tipo de alimentación: JMAF, jarabe de azúcar u otros
Primavera-Verano	Producción promedio de miel 2013 en Kg. colmena
	Tratamiento acaricida durante o posterior al invierno: fecha y producto
	Mortandad de colmenas: % del apiario
	Como se realiza la desinfección
	Concentración de apiarios: N° y distancia de apiarios cercanos
	Concentración de colmenas: N° de colmenas en los apiarios

Determinación del grado de infestación con *Varroa destructor* en colmenas de *Apis mellifera*

Porcentaje de parasitación en abejas adultas (prueba del frasco)

Se tomó una muestra de aproximadamente 300 abejas nodrizas cepilladas de dos o tres cuadros de cría diferentes y se colocaron en un frasco con agua y alcohol (1:1). En el laboratorio se agregó a cada frasco unas gotas de detergente. Posteriormente, los frascos se agitaron vigorosamente durante unos minutos, se vació el contenido sobre un tamiz que retuvo las abejas dejando pasar los ácaros que fueron recibidos en un paño blanco colocado debajo del tamiz. Se contabilizaron los ácaros, las abejas y se determinó el porcentaje de infestación o tasa de infestación de *Varroa forética* (VF) en abejas adultas (De Jong *et al.*, 1982 modificada por Marcangeli, 2000; Dietemann *et al.*, 2013).

Porcentaje de parasitación en cría de abejas obreras

Se tomaron panales con cría operculada, de los cuales se abrieron 200 celdas de cría en forma diagonal a ambos lados del cuadro y se sacaron con cuidado las crías de abejas (Figura 2). Los ácaros se observan fácilmente contra la pupa blanca, apreciándose adicionalmente las paredes y fondo de las celdas abiertas. Se contabilizó el número de celdas infestadas con *Varroa* y se determinó el porcentaje de infestación o tasa de infestación de *Varroa* en Cría (VC) (Dietemann *et al.*, 2013)



Figura 2. Cuadro de cría operculada de *Apis mellifera* inspeccionado para estimar el porcentaje de infestación de Varroa en Cría (VC).

-Determinación de los parámetros de fortaleza en colmenas de *Apis mellifera*

Las colmenas que participaron del monitoreo fueron exclusivamente de tipo Langstroth con cámaras de cría completas con 10 cuadros (Figura 3).

Se estimaron los parámetros en la cámara de cría de todas las colmenas de acuerdo con la siguiente metodología:

Población de A. mellifera: se contabilizó el número de cuadros cubiertos por abejas adultas, teniendo en cuenta ambos lados de cada cuadro.

Cría de A. mellifera, polen y miel: luego de abrir cada colmena, los cuadros fueron removidos secuencialmente. Se observaron ambos lados de cada cuadro y se estimó visualmente el porcentaje de cobertura con cría de abejas, polen y miel. Luego se sumaron los porcentajes de ambos lados de todos los cuadros y se obtuvo el total de cuadros cubiertos con cría, polen y miel por colmena (Delaplane *et al.*, 2013). Esta metodología es de práctica común entre los técnicos apícolas y se encuentra estandarizada en las revisiones a campo.

Datos ambientales

Los datos de temperatura y humedad fueron obtenidos a partir de los registros aportados por las estaciones meteorológicas cercanas a los apiarios (EEA

Reconquista, EEA Rafaela y Sistema Meteorológico Nacional para la AER Casilda de EEA Oliveros).

Análisis estadísticos

En todos los casos, se utilizaron el Test Kolmogorov-Smirnov y Test de Levene para comprobar si los datos satisfacían o no los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas respectivamente.

Todos los análisis de factores de riesgo se realizaron mediante la aplicación un de análisis bivariado en una primera etapa y de un análisis multivariado en segunda instancia. El análisis bivariado establece el grado de asociación individual de cada una de las variables independientes o predictoras con la variable de respuesta.



Figura 3. Cámara de cría de una colmena de *Apis mellifera* tipo Langstroth con 10 cuadros completos.

El tipo de análisis elegido dependió de la naturaleza las variables evaluadas (Correlación de Spearman, Chi-cuadrado de Pearson, T de Student, ANOVA, Mann Whitney, Kruskal Wallis). Un problema importante cuando se analizan conjuntos de datos con muchas variables independientes es el de colinealidad o multicolinealidad.

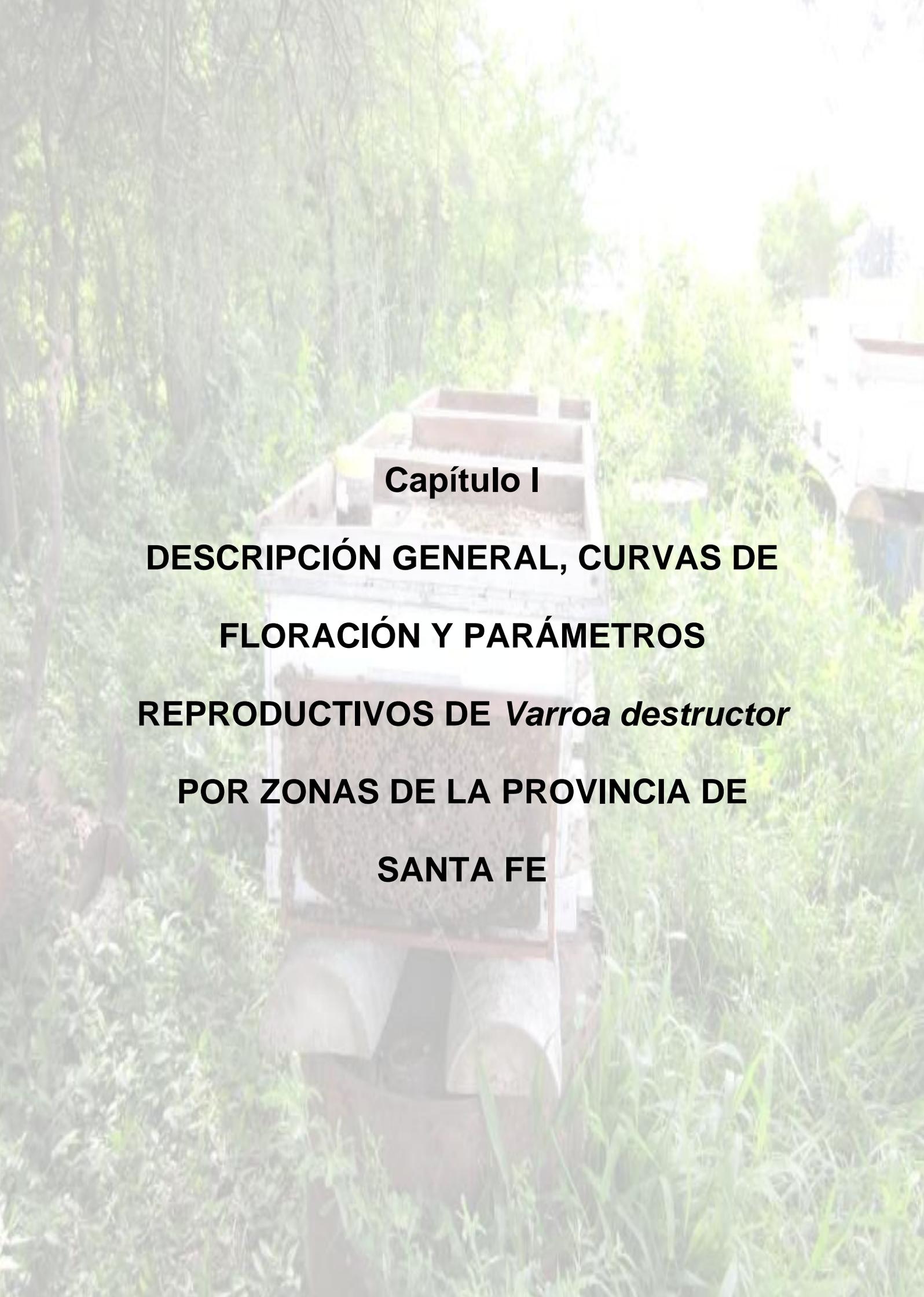
Esto surge cuando algunos de los factores estudiados están correlacionados entre sí y separar sus efectos resulta difícil (Dohoo *et al.*, 1996). Cuando dos potenciales factores de riesgo se encontraron altamente relacionados, solo uno de ellos (el que presentó valor P más bajo) fue incluido en la segunda etapa. Un segundo problema con relación al análisis simultáneo de múltiples variables, es el de confusión. La confusión surge cuando un factor (X) está causalmente relacionado con otra variable independiente de interés (Z) y la variable de respuesta (Y) (Dohoo *et al.*, 1996). Los factores de confusión se identificaron cuando variables que resultaron asociadas con la variable de respuesta en el análisis bivariado, no lo estuvieron en el modelo multivariado. La asociación establecida entre X e Y estaba confundida por el efecto que tiene la asociación entre X y Z , variable que en última instancia se encuentra directamente asociada con Y .

Se seleccionaron aquellas variables que presentaron un valor de $P < 0,15$ y no presentaban colinealidad para ser incluidas en un análisis multivariado, utilizando modelos lineales generalizados (MLG) y generalizados mixtos (MLGM) con el apiario como factor aleatorio y REML como método de estimación.

Los MLG permiten trabajar con variables cuya distribución forma parte de la familia exponencial. En estos análisis, la medida de variabilidad utilizada que cumple con la propiedad de poseer máxima verosimilitud, es la denominada *Deviance* o *Devianza*. La incorporación de uno o más factores con efectos aleatorios transforma a estos modelos en MLG Mixtos (Mangeaud & Videla, 2005). Estos modelos permiten incorporar un mayor nivel de complejidad al análisis, muchas veces dado por la condición anidada de los datos (por ejemplo datos provenientes de colmenas que pertenecen a un mismo apiario). Los procedimientos de inferencia en estos modelos usan un análisis de la *Deviance*, comúnmente el test de razón de verosimilitud (LR por Likelihood Ratio Test), que es equivalente a los test F de los modelos lineales generales (Venables & Dichmont, 2004). El test compara dos modelos anidados, evaluando si los parámetros del modelo más complejo difieren significativamente de

los parámetros del modelo nulo. El objetivo es establecer si el mayor ajuste dado por un aumento de complejidad es justificado (Bolker, 2008).

Todos los análisis fueron realizados usando los programas estadísticos SPSS versión 17.0 y R versión 2.15.3.



Capítulo I

**DESCRIPCIÓN GENERAL, CURVAS DE
FLORACIÓN Y PARÁMETROS
REPRODUCTIVOS DE *Varroa destructor*
POR ZONAS DE LA PROVINCIA DE
SANTA FE**

INTRODUCCIÓN

El diseño de estudios epidemiológicos requiere de cierta información previa de manera tal que permita que los resultados obtenidos puedan aplicarse a una región determinada y sean comparables entre todos los individuos que participan del mismo. Las particularidades del área que abarca el estudio, las principales características de los individuos que conforman el universo a estudiar y la prueba diagnóstica para determinar el estado sanitario de las colmenas son centrales para que los resultados sean exitosos (Smith, 2006).

Caracterización de las zonas de estudio dentro de la provincia de Santa Fe.

En la Provincia de Santa Fe se identifican cinco fitoregiones: Chaco Húmedo y Seco, Espinal, Paraná y Pampeana (Arzamendia & Giraudó, 2004). Sin embargo, el impacto de la actividad humana y en especial el avance de la frontera agropecuaria modificaron ampliamente las características del paisaje original sobre el cual está basada la clasificación de las regiones fitogeográficas, dando lugar a zonas transformadas de acuerdo con el uso de la tierra (Pengue, 2005). De acuerdo a lo anterior, es posible identificar cuatro regiones bien diferenciadas en el territorio provincial:

1.- Zona Norte: parte de la fitoregión Chaqueña, es atravesada por un gradiente de humedad y temperatura que define dos regiones, Chaco seco y Chaco húmedo y que la convierte en la zona más heterogénea (Arzamendia & Giraudó, 2004). La temperatura media anual es de 20,5 °C y la precipitación media anual de 1325 mm en la región más húmeda (Giorgi *et al.*, 2008) y entre los 500 y 700 mm anuales en la región seca (Burkart *et al.*, 1999). La superficie agrícola ocupa entre 3,4 y 20 % del total. De acuerdo con la zonificación agro-económica de INTA se clasifica como zona ganadera y mixta del norte y como sub-zona mixta del noreste (Giorgi *et al.*, 2008). Son tierras de aptitud media con fuertes restricciones para el uso agrícola y de uso mayoritario ganadero en las zonas de aptitud baja, con participación

predominantemente agrícola cerca de la zona de Reconquista y aumento de la importancia del girasol, al que se agregan la caña de azúcar y el algodón, junto con los cultivos comunes al resto de la provincia (soja, trigo y maíz).

2.- Zona Centro: parte de la fitoregión del Espinal (Arzamendia & Giraudó, 2004). Más del 42% de su superficie está destinada a la actividad agrícola. De acuerdo con la zonificación agro-económica de INTA se clasifica como zona mixta del centro y como sub-zona mixta del centro-oeste. De acuerdo con esta clasificación, la temperatura media anual es de 18 °C y la precipitación media anual de 1025 mm. Son tierras de aptitud heterogénea, con predominio general de tierras con aptitud agrícola media y alta. El uso mayoritario está destinado a la ganadería intensiva (tambo e invernada sobre pasturas de alfalfa), con participación agrícola de los cultivos de soja de 2^{da}, trigo, maíz y girasol, en tierras con alta capacidad productiva (Giorgi *et al.*, 2008).

3.- Zona Sur: parte de la fitoregión Pampeana. De acuerdo con la zonificación agro-económica de INTA se clasifica como zona agrícola y como sub-zona agrícola de la Pampa. Con base en esta clasificación, la temperatura media anual es de 16,5 °C y la precipitación media anual de 1025 mm. Las tierras de aptitud agrícola ocupan el 75 % de la superficie total, con predominio de las de alta capacidad productiva. El uso mayoritario está destinado a cultivos de soja, seguidos por trigo y maíz, secundariamente pasturas de base alfalfa (Giorgi *et al.*, 2008).

4.- Zona de Costa: eco-región Deltas e islas del Paraná. La presencia de cuerpos de agua genera efectos climáticos locales, caracterizados por un alto valor de humedad ambiente y atemperamiento de los extremos de temperatura diarios y estacionales. Solo el 21% de su superficie es utilizada en agricultura. De acuerdo con la zonificación agro-económica de INTA se clasifica como zona ganadera y como sub-zona ganadera del Bajo de los Saladillos. De acuerdo con esta clasificación, la temperatura media anual es de 19,5 °C y la precipitación media anual de 1200 mm. Caracterizado por una

depresión de los suelos, ocupada por praderas húmedas, praderas saladas y montes espinosos, dedicados a la ganadería de cría extensiva. En las elevaciones del terreno se realiza un uso más intensivo, además tienen importancia la horticultura, cultivo de arroz y la silvicultura (Giorgi *et al.*, 2008).

En este contexto ambiental y productivo se inserta la apicultura como actividad complementaria, lo que define en tiempo y espacio el marco de la producción apícola caracterizado por la disponibilidad de alimento, el desarrollo del nido de cría, exposición a factores de *stress* y el periodo de cosecha de miel.

Diagnóstico de Varroosis

A nivel epidemiológico, para estimar la presencia de una enfermedad se requiere de una prueba diagnóstica que sea, en la medida de las posibilidades, rápida, económica y confiable (Tarabla & Signorini, 2013).

El ciclo de vida de *Varroa destructor* presenta dos fases (forética y reproductiva), lo que define dos posibles pruebas para evaluar el nivel de infestación en las colmenas. La fase forética sólo es llevada a cabo por hembras adultas, que se localizan sobre las obreras y zánganos de *Apis mellifera* y que permiten la transmisión horizontal de la enfermedad mediante la deriva o el “pillaje” (Fries & Camazine, 2001). La fase reproductiva (acoplada con la presencia de cría de abejas) implica el ingreso de las hembras adultas a las celdas de cría y el comienzo de la reproducción del parásito (Donzé & Guerin, 1994).

Aunque realizar ambas pruebas en paralelo es una medida óptima para estimar el grado de parasitación en las colmenas, no es posible aplicarlo a gran escala y de manera sistemática. La llamada “prueba del frasco” para estimar el porcentaje de *Varroa* en abejas adultas es una técnica relativamente sencilla y poco invasiva, que se ajusta en gran medida a las necesidades de un estudio epidemiológico. Para establecer que esta prueba es un buen indicador del nivel de infestación con *V.*

destructor, es necesario conocer con qué grado de precisión este parámetro refleja el estado de la enfermedad en su fase reproductiva.

Parámetros reproductivos de Varroa destructor en las diferentes zonas de Santa Fe.

La reproducción es un componente clave en el crecimiento de las poblaciones de *V. destructor* (Harris *et al.*, 2003). En todas las colmenas infestadas, existe una cierta proporción de ácaros que no pueden reproducirse o que no lo hacen exitosamente (Harbo & Harris, 1999). Por lo tanto, diferentes porcentajes de infestación pueden ser el resultado de diferentes tasas de reproducción. Las causas de infertilidad pueden ser diversas (Kirrane *et al.*, 2011; Wendling *et al.*, 2014) así como el conjunto de variables que afectan las condiciones reproductivas del parásito, relacionados en parte a los factores ambientales (Harris *et al.*, 2003). Múltiples estudios se han enfocado en estudiar los mecanismos por el cual la reproducción de *V. destructor* es interrumpida o alterada (Garrido & Rosenkranz, 2003; Frey *et al.*, 2013), lo cual excede el objetivo de esta tesis. Independientemente de la causa puntual, desde el punto de vista de un estudio epidemiológico a escala regional, resulta fundamental conocer si la capacidad reproductiva del ácaro es homogénea a lo largo del área de estudio.

Con base en lo anteriormente mencionado, el diseño de un estudio epidemiológico requiere identificar previamente factores que pudieran influir en los resultados obtenidos y que deben considerarse para no introducir errores en la interpretación de los mismos. En este sentido, describir las características de cada zona de la región de estudio, tanto con relación a las prácticas apícolas como a la reproducción del parásito, así como seleccionar una prueba de diagnóstico de la enfermedad adecuada, resultan ser actividades preliminares esenciales.

OBJETIVOS

- Caracterizar las zonas agroecológicas tradicionales de Santa Fe desde el punto de vista de la actividad apícola.

- Evaluar el potencial de la determinación del porcentaje de parasitación con *Varroa destructor* en abejas adultas como herramienta apropiada de diagnóstico en un sistema de vigilancia epidemiológica a nivel provincial.
- Determinar los parámetros reproductivos de *Varroa destructor* en cada zona de la provincia de Santa Fe.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de las zonas de estudio dentro de la provincia de Santa Fe.

Se delimitaron cuatro zonas de estudio de acuerdo con la clasificación de Argentina en eco-regiones (Burkart *et al.*, 1999) y la clasificación agroeconómica de la provincia de Santa Fe realizada por INTA (Giorgi *et al.*, 2008). Sobre la base de ambas clasificaciones, y con el objetivo de incluir el manejo apícola, durante el año 2012 se realizaron en total 25 encuestas semi-estructuradas (Figura 1.1) distribuidas entre los asesores técnicos correspondientes a cada zona dentro del Programa Federal de Reconversión Productiva para la Pequeña y Mediana Empresa Agropecuaria (INTA-Cambio Rural). La encuesta (Anexo 1) relevó los siguientes datos: periodo anual de floración con especificación de entrada de polen y de néctar, momento (especificando al menos por mes o quincena) de finalización de cosecha de miel (bajada a cámara) y comienzo de tratamientos terapéuticos, momento de desarrollo del nido de cría en las colmenas y aplicación de tratamientos post-ivernales.

Es posible que el conocimiento de la flora apícola no sea equivalente entre todos los encuestados. Para unificar la información referida a entrada de polen y néctar en las colmenas se pidió a cada técnico que realizara una valoración cualitativa para cada mes del año, en donde asignaran el valor 10 a el/los mes/es con mayor entrada y 0 aquellos sin entrada. Esta consigna permitió relativizar los conocimientos sobre flora apícola de cada técnico y evitar potenciales confusiones sobre distintos nombres vulgares.

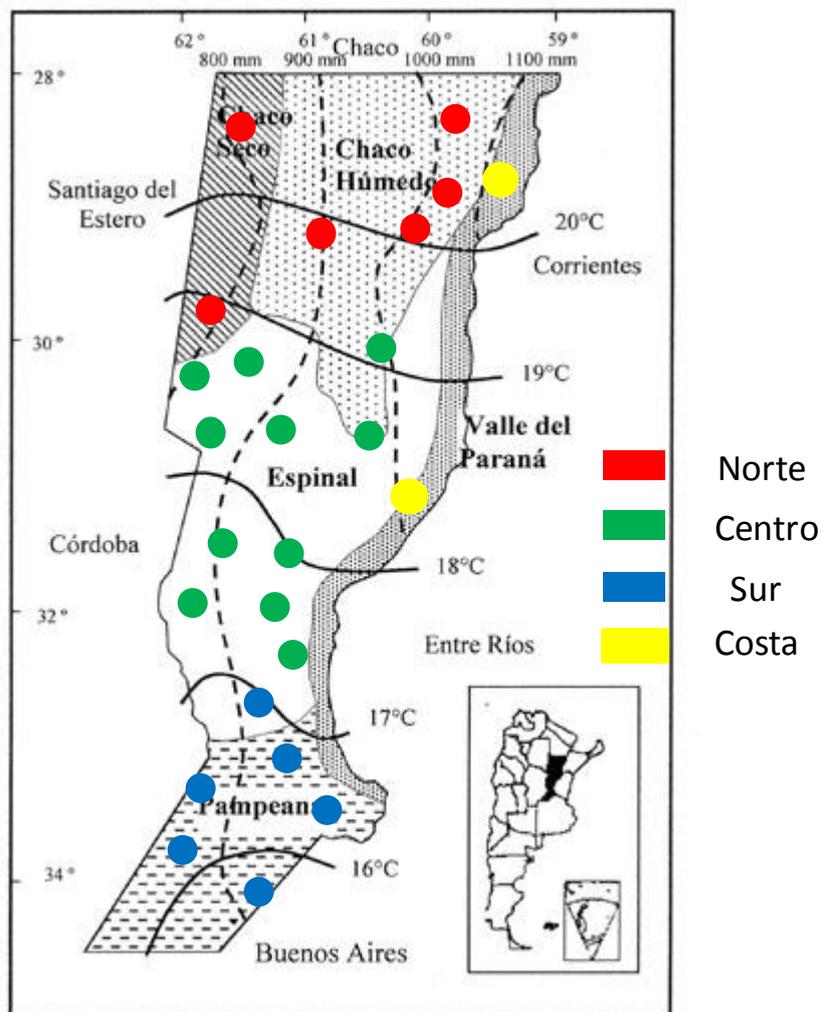


Figura 1.1 Distribución de las encuestas de curva de floración por zona de la provincia de Santa Fe con relación a las regiones fitogeográficas (Extraído y modificado de Arzamendia & Giraud, 2004)

La información referida al flujo de néctar y polen se analizó cuantitativamente utilizando la mediana de los datos como medida de tendencia central y los cuartiles 25 y 75% como medida de dispersión con el fin de obtener un valor resumen para cada zona. El resto de las preguntas se analizaron cualitativamente con el objetivo de describir, sobre los flujos de néctar y polen, los momentos destacados del manejo apícola en la zona. Para el caso puntual de la zona de la costa, la encuesta fue contestada únicamente por dos técnicos, cada uno perteneciente a diferentes departamentos y los resultados serán presentados por separado.

Diagnóstico de Varroosis

Se seleccionaron tres apiarios, uno por cada zona (Tabla 1.1). En la zona de la costa no fue posible implementar los muestreos debido a la dificultad para realizar visitas periódicas en lugares de difícil acceso.

Se realizaron cuatro muestreos a lo largo del 2012-2013 para estimar el porcentaje de Varroa correspondientes a: Inicio de la temporada de producción de miel (primavera), fecha anterior y posterior al tratamiento con acaricidas durante el otoño y una muestra invernal (julio).

Se relevaron 20 colmenas por apiario donde se tomaron, a campo, los siguientes datos de acuerdo con el protocolo consensuado por miembros del PE N° 123022 del Programa Nacional Apícola de INTA: se cuantificó el número de cuadros cubiertos con abejas (CCA), cuadros cubiertos con cría (CCC), cuadros cubiertos con polen y con miel (CCP y CCM, respectivamente) y se estimó el porcentaje de Varroa en cría de abejas (VC) y en adultas (VF) (ver metodología detallada en materiales y métodos generales).

Tabla 1.1. Ubicación geográfica de los apiarios distribuidos en las zonas de la provincia de Santa Fe.

Zona	Localidad	Localización geográfica	
		Latitud	Longitud
NORTE	Reconquista	29° 08' 40,91" S	59° 38' 36,74" O
CENTRO	Rafaela	31° 11' 02,19" S	61° 29' 51,37" O
SUR	Casilda	33° 02' 54,82" S	61° 08' 53,82" O

La asociación entre los porcentajes de VC y VF para las tres regiones y entre los niveles de Varroa y los parámetros de fortaleza de la colmena se analizaron mediante correlación de Spearman.

Se establecieron categorías para ambos parámetros (VC y VF) con base en su significancia para el manejo de las colmenas (Bulacio Cagnolo, 2011). Se consideró que aquellas colmenas que presentaban porcentajes de infestación en VF y en VC menores al 3% se encontraban en un estado sanitario muy bueno. Todos los casos que presentaron valores entre 3 y 10% se consideraron como estado sanitario bueno, dado que probablemente se corregirían con un tratamiento acaricida. Por último, aquellos casos donde los valores de infestación en abejas adultas y en cría superaron el 10% fueron calificados como estado sanitario regular dado que aun aplicando un producto acaricida, existía un daño potencial por los altos niveles de parasitación pre-tratamiento. Se analizó la proporción de colmenas que fueron categorizadas en el mismo estado sanitario de acuerdo con su porcentaje de VF y VC mediante Chi-cuadrado de Pearson y el estimador Kappa (Cohen, 1960), que indica cuál es el grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas más allá del azar.

Parámetros reproductivos de Varroa destructor en las diferentes zonas de Santa Fe.

Los muestreos fueron realizados durante el mes de febrero de 2013 en los mismos apiarios utilizados en el punto anterior (Tabla 1.1). Se seleccionaron al azar cinco cuadros provenientes de cinco colmenas diferentes en cada apiario y se llevaron al laboratorio. Con la ayuda de una pinza se desopercularon, bajo lupa (6X), celdas de cada cuadro hasta contabilizar 25 familias de Varroa (o hasta 200 celdas por cuadro) provenientes de pupas de aproximadamente 16-18 días con ojos lilas y tórax pigmentado (Eguaras *et al*, 1994). De cada una de estas celdas se extrajo la hembra fundadora y todos los individuos de su descendencia, los que fueron clasificados en protonifa, deutoninfa, hija joven y macho, según Rosenkranz *et al.*, 2010 (Figura 1.2).

Se calculó la tasa de incremento (N° total de hembras maduras en la descendencia/ N° de ácaros parentales), la tasa de reproducción (N° total de progenie del ácaro/ N° de ácaros parentales) y la proporción de hembras infértiles (Ifantidis, 1984). Además, se determinó la viabilidad de la descendencia de acuerdo con los estadios inmaduros que estaban presentes en cada celda. La clasificación de cada celda quedó determinada de la siguiente manera:

- Celdas que solo presentaron la hembra fundadora: hembras no reproductivas (HNR)
- Celdas que presentaron la fundadora y descendencia: hembras reproductivas (HR)
- Celdas con HR que sólo presentaron protoninfas o no presentaban macho: descendencia no viable (DNV).
- Celdas con HR que presentaban el macho y al menos una deutoninfa: descendencia viable (DV) (Martin, 1994).

El número de familias contabilizadas en Casilda (zona sur) durante el 2013 fue muy bajo ($n=4$). Por lo tanto, durante el mes de febrero de 2014 se efectuó un segundo muestreo en ese mismo apiario ($n=40$). Se registraron los datos de temperatura y humedad para ambos períodos de estudio en todas las zonas.

Las tasas de incremento y de reproducción y las proporciones de hembras no reproductivas y con descendencia no viable se compararon entre las zonas de la provincia mediante análisis de Kruskal Wallis y Chi-cuadrado (análisis univariante).



Figura 1.2 Familia completa de *Varroa destructor*. Arriba de izquierda a derecha: Protoninfa, deutoninfa, deutocrisálida. Abajo de izquierda a derecha: hija joven, hembra fundadora o madre, macho adulto (Extraído de Rosenkranz *et al.*, 2010)

RESULTADOS

Caracterización de las zonas de estudio dentro de la provincia de Santa Fe de acuerdo con las encuestas realizadas a los técnicos de Cambio Rural.

La zona norte de la provincia presentó un periodo de ausencia de flujo de néctar y polen más corto en comparación con el centro y el sur (Figura 1.3). El comienzo del período de mayor ingreso de néctar se registró en octubre en el norte, mientras que en el centro fue durante diciembre y en el sur durante noviembre (Figura 1.5).

Para la costa la situación fue completamente diferente dado que el principal flujo de néctar se reportó a partir de enero (Figura 1.4). Respecto al polen, tanto en el centro como en el sur se mencionó la ausencia total en el período mayo-julio, con un aumento aparente a partir de agosto. Para la zona norte por el contrario este periodo abarcó los meses de junio y julio (Figura 1.3).

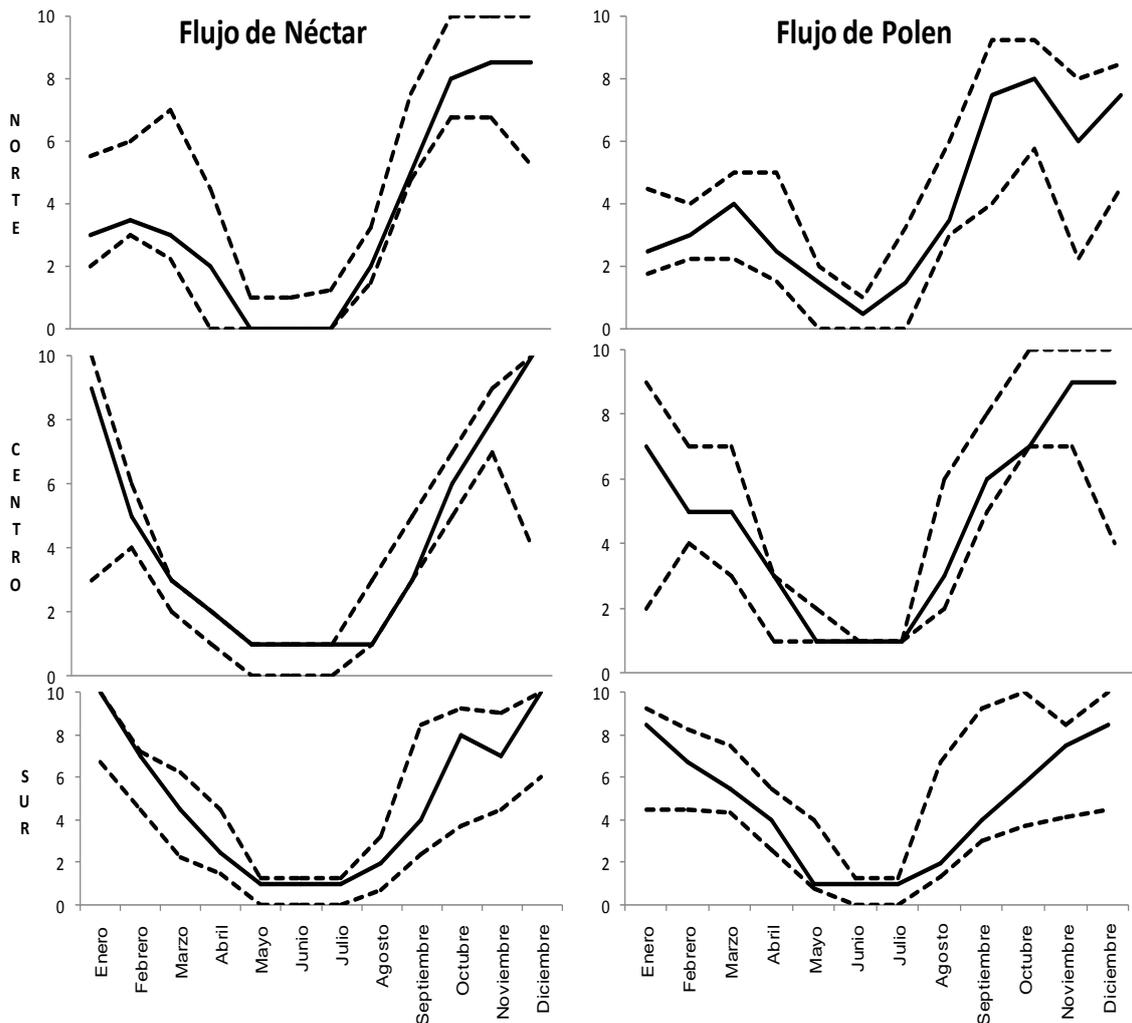


Figura 1.3 Caracterización del flujo de polen y néctar para la zona norte, centro, sur y costa, de acuerdo con las encuestas realizadas a técnicos de Cambio Rural.

Mediana (—); primer y tercer cuartil (.....)

En el departamento General Obligado en la zona norte de la costa se reportó ausencia de polen entre los meses de junio y agosto, mientras que la entrada de polen en el departamento Garay, hacia el centro de la costa de la provincia, fue continua durante el año con una reducción en los meses del invierno (Figura 1.4).

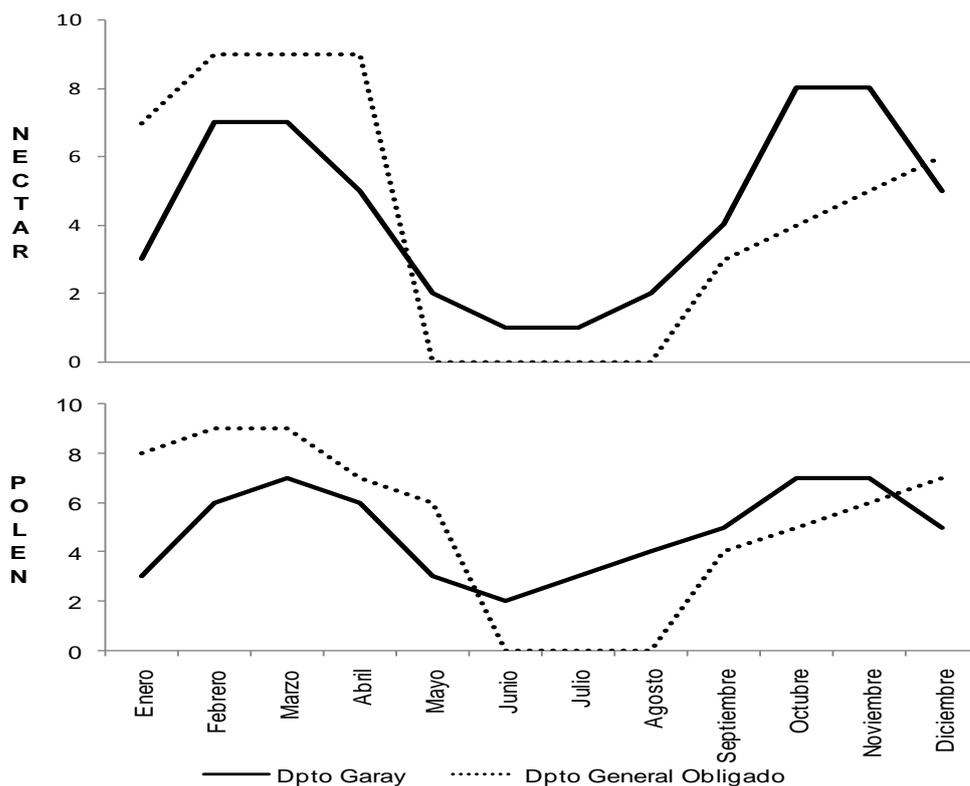


Figura 1.4 Caracterización del flujo de polen y néctar para la zona de costa de la provincia de Santa Fe, de acuerdo con las encuestas realizadas a técnicos de Cambio Rural.

Los técnicos mencionaron en las encuestas que la apertura del nido de cría comienza más temprano en el norte y en la costa en comparación con el centro y sur de la provincia, donde ocurre hacia el inicio de la primavera (Figura 1.5)

Diagnóstico de Varroosis

Se encontró una buena correlación positiva ($r > 0,6$) entre el porcentaje de VC y VF en todas las zonas, ajustándose mejor la registrada en la zona sur. En relación a los parámetros de fortaleza de la colmena, si bien en algunos casos fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$), los coeficientes de correlación con los porcentajes de infestación con Varroa tendieron a ser bajos ($r < 0,6$) en todos los casos (Tabla 1.2).



Figura 1.5 Calendario de las principales actividades/condiciones relacionadas con la actividad apícola para las distintas zonas de la provincia de Santa Fe, de acuerdo con las encuestas realizadas a técnicos de Cambio Rural.

En la zona norte, el grado de correlación en cada temporada fue baja, sin embargo el grado de correlación global, sin considerar las estaciones climáticas, arrojó una buena correlación ($r= 0,744$; $P< 0,01$). En el caso de la zona centro se encontró que la mejor correlación fue durante la etapa pre-tratamiento ($r=0,653$; $P< 0,01$), presentado valores de correlación muy bajos en el resto de las estaciones. Por último en la zona sur el grado de correlación fue bueno durante el invierno ($r=0,740$; $P< 0,01$) y la etapa pre-tratamiento ($r=0,743$; $P< 0,01$). Asimismo, el grado de correlación global de la zona fue muy bueno ($r=0,808$; $P< 0,01$) (Tabla 1.3).

Tabla 1.2 Correlación de Spearman entre los porcentajes de Varroa Forética (VF) y Varroa en Cría (VC) y los parámetros de colmenas: cuadros con abejas (CCA), cuadros con cría (CCC), cuadros con polen (CCP) y cuadros con miel (CCM), para las tres zonas evaluadas en la provincia de Santa Fe.

Parámetros	Coeficiente de correlación de Spearman/Zona		
	Norte	Centro	Sur
VF-VC	0,744**	0,613**	0,808**
VF-CCA	0,213	0,431**	-0,491**
VC-CCA	0,278*	0,245*	-0,401**
VF-CCC	0,365**	0,570**	-0,519**
VC-CCC	0,365**	0,346**	-0,446**
VF-CCP	-0,266*	-0,071	-0,420**
VC-CCP	-0,151	-0,176	-0,315
VF-CCM	0,370**	0,025	0,305**
VC-CCM	0,331**	0,021	0,272*

** Correlaciones significativas con $P < 0,01$

*Correlaciones significativas con $P < 0,05$

Se evaluó la correlación entre ambos parámetros (VF vs. VC) en cada una de las estaciones, dado que la fluctuación estacional es un componente importante en la dinámica de la enfermedad. De esta manera se observó que los coeficientes fueron muy bajos en las etapas post-tratamiento ($r=0,350$; $P < 0,01$) y al inicio de la temporada ($r=0,326$; $P < 0,05$). Por otro lado, en la etapa de pre-tratamiento ($r= 0,785$; $P < 0,01$) y durante el invierno ($r=0,583$; $P < 0,01$), el grado de correlación fue muy bueno y aceptable, respectivamente (Tabla 1.3). A pesar de la variabilidad, correlaciones marginales (estación por estación independientemente del sitio o sitio por sitio sin considerar la estación) se observó una buena correlación entre VF y VC ($r= 0,673$; $P < 0,01$).

Tabla 1.3. Correlación de Spearman entre los porcentajes de Varroa Forética (VF) y Varroa en Cría (VC), para las tres zonas evaluadas en la provincia de Santa Fe, durante cuatro momentos de monitoreo clave para el desarrollo de la enfermedad.

	Invierno	Inicio de Temporada	Pre-tratamiento	Post-tratamiento	Todas las estaciones
Norte	$r=0,408$	$r=0,392$	$r=0,524^*$	$r=0,243$	$r=0,744^{**}$
Centro	$r=0,064$	$r=-0,041$	$r=0,653^{**}$	$r=0,381$	$r=0,613^{**}$
Sur	$r=0,740^{**}$	$r=-----$	$r=0,743^{**}$	$r=0,1$	$r=0,808^{**}$
Todas las regiones	$r=0,583^{**}$	$r=0,326^*$	$r=0,785^{**}$	$r=0,350^{**}$	$r=0,673^{**}$

** Correlaciones significativas con $P < 0,01$

*Correlaciones significativas con $P < 0,05$

Evaluamos el porcentaje de colmenas calificadas en la misma categoría para ambos parámetros de infestación (Tabla 1.4). Cuando el porcentaje de infestación en VF fue $<3\%$ (muy bueno), el 97% de las mismas presentaron un nivel de Varroa en cría concordante ($<3\%$). Para el caso de las colmenas que presentaron un estado sanitario bueno evaluando VF (entre 3 y 10%), se podría haber sobrestimado el estado sanitario de la cría dado que un 32,1% de los casos presentaron $<3\%$ en cría. De la misma forma, más del 50% colmenas que tuvieron $>10\%$ de infestación en abejas adultas (categoría regular) presentaron porcentajes de infestación en cría más bajos. El test de concordancia arrojó un valor del estimador Kappa = 0,652 (IC95% 0,547 – 0,758; $P < 0,0001$).

Tabla 1.4 Proporción de casos en cada una de las categorías de porcentaje de infestación con Varroa en estado forético y en estado reproductivo.

		Categorías de Varroa en Cría			
		Hasta 3%	3% -10%	Más de 10%	Total
Categorías de Varroa Forética		192	6	0	198
	Hasta 3%	97,0%	3,0%	0%	100,0%
		9	18	1	28
	3%-10%	32,1%	64,3%	3,6%	100,0%
		1	6	5	12
	Más de 10%	8,3%	50,0%	41,7%	100,0%
	202	30	6	238	
Total	84,9%	12,6%	2,5%	100,0%	

Parámetros reproductivos de Varroa destructor en las diferentes zonas de Santa Fe.

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de reproducción (U de Mann-Whitney= 73,5; $P= 0,79$), la tasa de incremento (U de Mann-Whitney= 70; $P=0,46$), la proporción de HNR ($\chi^2=0,044$; $P=1,000$) y la DNV ($\chi^2= 1,8$; $P= 0,24$) cuando se compararon los parámetros reproductivos en ambos años en Casilda (zona sur). Cuando comparamos los datos de Rafaela (zona centro) y Reconquista (zona norte) con los datos de Casilda 2014, encontramos que la tasa de incremento fue similar en todas las zonas ($\chi^2= 0,73$; $gl= 2$; $P= 0,694$) mientras que la tasa de reproducción fue menor en esta ultima ($\chi^2= 6,15$; $gl= 2$; $P= 0,046$). De la misma manera, la proporción de hembras no reproductivas fue mayor en la zona sur (30%; $\chi^2= 16,898$; $P= 0,001$) pero la proporción de DNV fue similar en las tres zonas ($\chi^2= 3,051$; $P= 0,384$) (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Comparación de la tasa de incremento, tasa de reproducción, la proporción de hembras no reproductivas y la descendencia no viable de individuos de *Varroa destructor* entre la zona norte, centro y sur de la provincia de Santa Fe.

Parámetros	Casilda 2014	Casilda 2013	Rafaela	Reconquista
Reproductivos				
T. I	0,11±0,31	0,0±0,0	0,10±0,30	0,09±0,36
Casilda 2014	-----	0,46	0,86	0,41
Casilda 2013	-----	-----	0,72	0,84
Rafaela	-----	-----	-----	0,47
Reconquista	-----	-----	-----	-----
T.R.	1,5±1,29	1,25±0,96	2,03±1,11	2,14±1,23
Casilda 2014	-----	0,79	0,027*	0,03*
Casilda 2013	-----	-----	0,21	0,23
Rafaela	-----	-----	-----	0,88
Reconquista	-----	-----	-----	-----
N	40	4	62	44
HNR	12/40 30%	1/4 25%	5/62 8,1%	1/44 2,3%
<i>P</i> (pearson- χ^2)			0,001*	
DNV	20/28 71,4%	1/3 33,3%	35/57 61,4%	31/43 72,1%
<i>P</i> (pearson- χ^2)			0,384	

T.I: Tasa de incremento- T.R: Tasa de reproducción

HNR: Proporción de hembras no reproductivas- DNV: descendencia no viable.

Las temperaturas máxima y media diaria promedio fueron similares en las tres zonas (F= 0,95; gl= 2; P= 0,9 y F= 0,47; gl= 2; P= 0,6; respectivamente) (Tabla 1.6). La temperatura mínima fue menor en la zona de Rafaela (F= 6,36; gl= 2; P= 0,002). Respecto al porcentaje de humedad relativa (HR) diaria promedio, fue significativamente mayor en el sur de la provincia (F= 60,43; gl= 2; P< 0,0001).

Tabla 1.6. Temperatura máxima, mínima y media diaria y humedad relativa (media \pm desvío estándar) para el periodo enero-febrero 2013 en Reconquista y Rafaela y enero-febrero 2014 en Casilda.

	T-Max	T-Min	T-Media	HR (%)
Reconquista	30,89 \pm 3,74 ^a	19,67 \pm 2,90 ^a	25,29 \pm 2,91 ^a	69,08 \pm 9,42 ^a
Rafaela	30,61 \pm 4,38 ^a	17,72 \pm 2,71 ^b	25,32 \pm 3,41 ^a	67,98 \pm 10,22 ^a
Casilda	30,90 \pm 4,18 ^a	19,18 \pm 3,57 ^a	24,78 \pm 3,88 ^a	84,63 \pm 7,65 ^b

ANOVA –Test de Tuckey Letras diferentes expresan diferencias significativas (P<0,05)

DISCUSIÓN

El diseño de un estudio epidemiológico se basa en información previamente generada sobre el área de estudio, las características del agente etiológico y las pruebas diagnósticas para la estimación de la prevalencia en la población (Smith, 2006).

A pesar de que el ambiente dentro de una colmena es estable, algunos factores como la humedad y la disponibilidad de alimento varían considerablemente de acuerdo con condiciones locales y estacionales, las que también influyen sobre el crecimiento de las poblaciones de *V. destructor* (García Fernández, 1997). La variable zona presenta múltiples componentes, entre los que se encuentran los patrones climáticos, el uso de la tierra y la actividad apícola característica de cada lugar. Este conjunto de factores afectan el desarrollo de las colmenas de *A. mellifera* y por lo tanto también influyen sobre las poblaciones de *V. destructor*. Al mismo tiempo, los cambios estacionales en las colmenas pueden afectar directa o indirectamente las poblaciones de ácaros (Moretto *et al.*, 1991; Moretto & Leonidas, 2003).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, la zona norte presentó un periodo privado de polen y néctar más corto, dado en parte porque la temperatura y precipitación media anual es más alta que en el resto de la provincia. Estas mismas condiciones también determinan en parte que la apertura del nido de cría se dé previamente en esa zona. El clima influye sobre la producción de polen y néctar y por lo tanto sobre las actividades y el desarrollo de las colmenas de *A. mellifera* (Le Conte & Navajas, 2008). Si bien la temperatura media en la costa fue similar al centro y sur de la provincia, según los técnicos encuestados, el periodo sin alimento también es breve o directamente no hay una interrupción marcada en el flujo de néctar y polen. La zona de la costa presenta mayor diversidad y abundancia de flora apícola, tanto por la influencia de los cuerpos de agua (mayor humedad en el ambiente) como por una menor explotación agrícola-ganadera (solo el 21 % de su territorio es apto para la actividad agropecuaria). La variación estacional de la floración afecta inevitablemente el desarrollo de las colmenas, lo que al mismo tiempo afecta el desarrollo y la proliferación del parásito (García Fernández, 1997).

Las encuestas realizadas a los asesores de los productores apícolas aportaron información clave sobre la dinámica ambiental y productiva de cada zona dentro del área de estudio. De esta manera se pudo establecer un cronograma de monitoreo adaptado a cada zona, determinando la fecha estimada del inicio de una temporada de cosecha e inicio de tratamientos tanto en otoño como en invierno-primavera.

La forma más precisa de estimar el nivel de infestación con *V. destructor* en colmenas de *A. mellifera* es evaluar simultáneamente la presencia de ácaros en las celdas de cría y en las abejas adultas. Sin embargo, esta metodología genera un gran impacto sobre la colmena, demanda mucho tiempo y requiere de cierta práctica.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que existe una buena correlación entre la estimación de la parasitación con *Varroa* en abejas adultas y en

cría. Esto habilitaría el uso únicamente de la prueba del frasco como prueba diagnóstica para estimar el nivel de parasitación de las colmenas, especialmente en el marco de un estudio epidemiológico. Esta relación, observada durante la etapa de pre-tratamiento, resulta útil desde el punto de vista productivo y sanitario. Es imprescindible contar con una buena herramienta de estimación de la enfermedad en abejas adultas (Branco *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010) que esté altamente correlacionada con los niveles en cría y que permita tomar decisiones de manejo apropiadas durante el momento clave para aplicar un tratamiento acaricida (Delaplane *et al.*, 2005). Asimismo es posible sugerir que, dada la practicidad y simpleza de la prueba del frasco, los productores apícolas pueden aplicarla en sus apiarios para monitorear la enfermedad a lo largo del año (Lee *et al.*, 2010).

El grado de correlación entre los porcentajes de infestación estimados por ambos métodos no fue igual en distintos momentos del año. La relación entre ambos parámetros fluctúa dado que el desarrollo de las poblaciones de *V. destructor* está acoplado a la estacionalidad del ciclo reproductivo de las abejas (Martin, 1994; Garrido & Rosenkranz, 2003; Frey *et al.*, 2013). Esto implica que el ratio de parasitación entre las abejas adultas y las celdas de cría dependerá en parte de la dinámica estacional de las colmenas (Martin, 1998; Rosenkranz & Renz, 2003).

La mejor correlación se obtuvo durante la etapa previa al tratamiento acaricida de otoño. Este es el momento del año donde el parásito se encuentra en niveles poblacionales altos en abejas adultas y con disponibilidad de cría para su reproducción (Rosenkranz *et al.*, 2010; Antunez *et al.*, 2015). Debido a que los acaricidas actúan exclusivamente sobre la carga parasitaria en fase forética (Martin, 1998; MAF, 2001) luego de un tratamiento, se produce un desequilibrio en la correlación entre los niveles de parasitación estimados según cada parámetro. En este mismo sentido, la reducción del nido de cría durante el invierno producirá un efecto similar pero opuesto,

concentrando la población de ácaros en la población de abejas adultas (Calderon & van Veen, 2008).

Un parámetro no incluido en las mediciones realizadas en este estudio fue la cuantificación de celdas de zánganos en las colmenas. Esta variable podría influir en el desarrollo poblacional debido a que la duración del periodo de operculado en las celdas de zángano permite un mayor número promedio de hijas por hembra fundadora. Si bien es un componente de la dinámica poblacional, Mondragón *et al.* (2005) sugirieron que la exclusión de la cuantificación de ácaros provenientes de las celdas de zángano no influye significativamente en la estimación total del crecimiento de las poblaciones en la colmena.

Una gran proporción de colmenas presentaron la misma categoría cuando se comparó el estado sanitario asignado según el porcentaje de VF y VC. De acuerdo con el valor del estimador Kappa, el grado de concordancia entre ambas técnicas es sustancial (Landis & Koch, 1977). Resulta altamente probable que al asignar una categoría sanitaria muy buena a una colmena de acuerdo con su porcentaje de VF esto coincida con el estado sanitario de la colmena de acuerdo con el porcentaje de cría. El 64% de las colmenas clasificadas como estado sanitario bueno (entre 3 y 10%) según su infestación en abejas adultas, presentaban la misma condición según el porcentaje de infestación estimado en la cría. Del resto, solo el 3,6% presentaban una condición sanitaria en cría más grave que en adultas. En la mayoría de los casos donde no concordó el estado sanitario de la colmena según ambos parámetros, el grado de infestación en cría estaría sobreestimado si se considera solo la infestación en abejas adultas, lo que no conduciría a mayores problemas sanitarios.

Estos resultados refuerzan la posibilidad de utilizar el porcentaje de Varroa en abejas adultas (VF) como un estimador preciso, rápido y económico de la prevalencia de Varroosis en el marco de un estudio epidemiológico.

Parámetros reproductivos de Varroa destructor en las diferentes zonas de Santa Fe.

El clima puede influir en la tasa de mortalidad general de las hembras adultas, dado que los ácaros de *Varroa* comienzan a morir cuando la temperatura es mayor a 38 °C (Le Conte *et al.*, 1990). Si bien las condiciones ambientales internas de una colmena son estables (García Fernández, 1997), la influencia del clima en la tasa de crecimiento puede ir más allá de efectos directos (Harris *et al.*, 2013).

La tasa de reproducción (Nº total de progenie del ácaro/Nº de ácaros parentales) fue más baja en la zona sur. Posiblemente cambios en las abejas mediados por las condiciones climáticas tengan un efecto en la reproducción y supervivencia del ácaro (Moretto *et al.*, 1991). Durante enero y febrero 2014, la HR en la zona sur fue mayor, cercana a un promedio diario de 85%. Si bien este valor es ligeramente superior al promedio dentro de las celdas de cría de abejas (Wohlgemuth, 1957) y al porcentaje de HR apropiado para la reproducción de *V. destructor*, las abejas tienden a implementar mecanismos para mantener condiciones estables en la colmena (Jones & Oldroyd, 2006). Otros estudios sugieren, por el contrario, que diferencias de 9–25% en HR tienen un impacto negativo sobre la reproducción bajo ciertas condiciones ambientales, dado que altas temperaturas combinadas con alta HR no permiten a las abejas controlar las condiciones apropiadamente (Kraus & Velthuis, 1997).

Históricamente, la zona sur presenta una temperatura media anual aproximadamente 2°C más baja (Arzamendia & Giraud, 2004), pero durante el período de estudio no se registraron diferencias entre el sur y el resto de las zonas. Quizá la mayor diferencia entre las zonas radique en la presencia de extensos cultivos de soja adaptados a lo largo de toda la región pampeana argentina incluyendo el sur de Santa Fe (Pengue, 2005; Giorgi *et al.*, 2008). La deficiencia nutricional inducida por un monocultivo estacional, seguidos de ausencia total de recursos forrajeros puede afectar el

desarrollo de las colmenas (Keller *et al.*, 2005; Brodschneider & Crailsheim, 2010) y consecuentemente la reproducción del parásito.

La proporción de hembras no reproductivas fue mayor en la zona sur en comparación con los datos obtenidos en el resto de las zonas de la provincia y también con datos previamente publicados (Martin *et al.*, 1997; Wendling *et al.*, 2014). El efecto indirecto de factores climáticos en la producción de cría de abejas puede jugar un rol importante en la fertilidad del ácaro (De Jong, 1984; Marcangeli *et al.*, 1992b). Variables dependientes de las condiciones climáticas como el inicio y finalización de la temporada de forrajeo y desarrollo de cría de abejas son dos de los factores más importantes que influyen sobre el crecimiento de las poblaciones de *V. destructor* (Wilkinson & Smith, 2002).

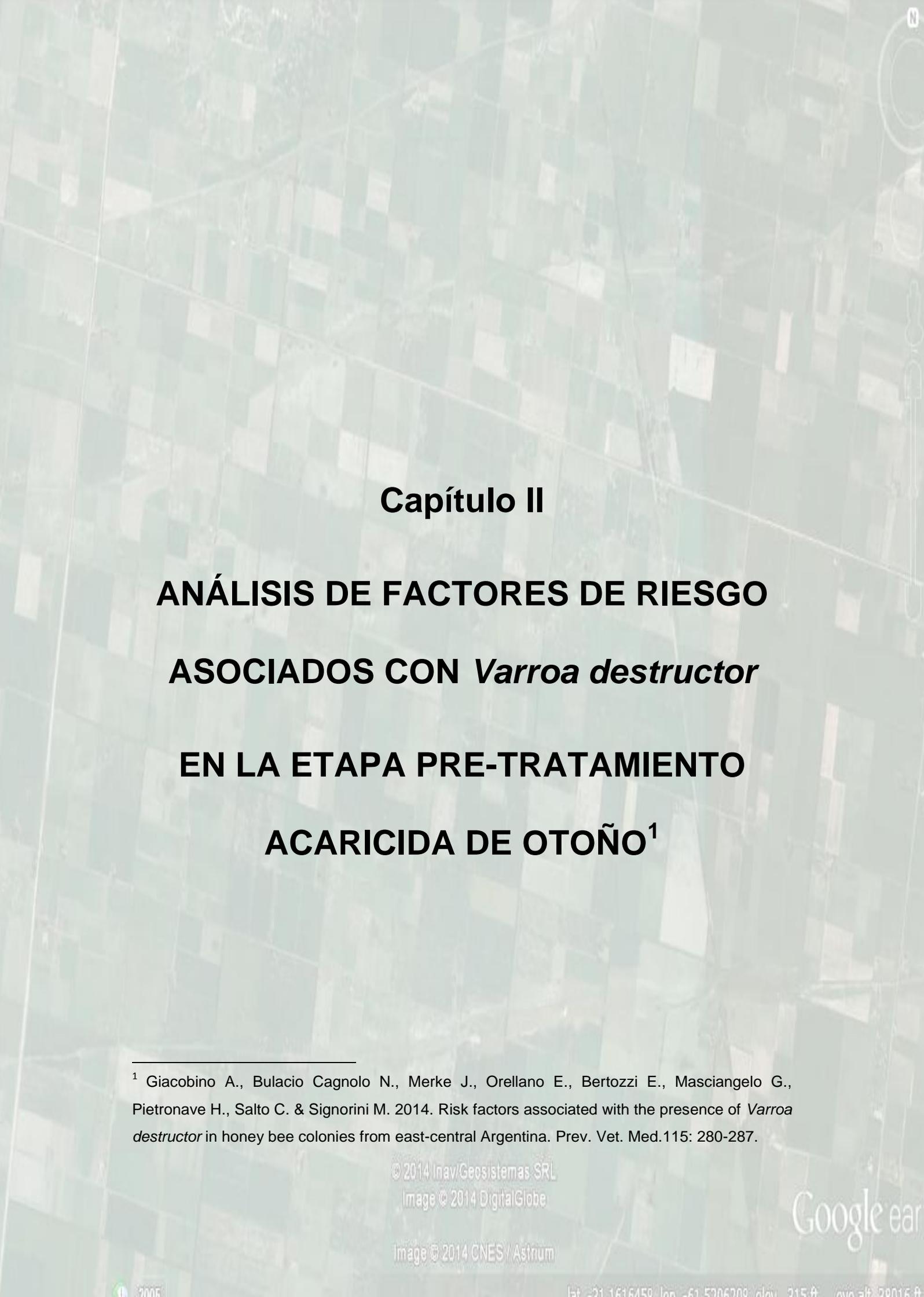
Nuevos estudios son necesarios para identificar las características de la zona sur que tienen un impacto negativo sobre la reproducción de *V. destructor*, especialmente para determinar si estas diferencias se mantienen a lo largo del tiempo. No obstante, profundizar sobre las diferencias regionales en este sentido no fue objetivo de este estudio.

Los resultados obtenidos implican que a lo largo de la provincia de Santa Fe la reproducción del ácaro puede no ser uniforme, al menos durante el otoño en la etapa previa al tratamiento acaricida. Las condiciones ambientales (clima + actividades agropecuarias) influyen de manera directa o indirecta sobre el desarrollo de las poblaciones de *Varroa*. Estas diferencias deben tenerse en cuenta tanto al diseñar como al analizar los resultados obtenidos mediante estudios a escala regional.

CONCLUSIONES

- Las zonas agroecológicas establecidas para la provincia de Santa Fe estuvieron signadas por las condiciones ambientales, el uso de la tierra y el calendario de prácticas apícolas.

- El porcentaje de infestación con *Varroa destructor* en abejas adultas (forética) es un buen estimador de la situación sanitaria de las colmenas y permite evaluar la prevalencia de la enfermedad mediante un monitoreo sistemático a nivel provincial.
- Es necesario considerar las diferencias en la tasa de reproducción y la proporción de hembras no reproductivas de *Varroa destructor* registradas a lo largo de la provincia de Santa Fe en el diseño y análisis de un estudio epidemiológico a escala regional.



Capítulo II

ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO

ASOCIADOS CON *Varroa destructor*

EN LA ETAPA PRE-TRATAMIENTO

ACARICIDA DE OTOÑO¹

¹ Giacobino A., Bulacio Cagnolo N., Merke J., Orellano E., Bertozzi E., Masciangelo G., Pietronave H., Salto C. & Signorini M. 2014. Risk factors associated with the presence of *Varroa destructor* in honey bee colonies from east-central Argentina. *Prev. Vet. Med.* 115: 280-287.

INTRODUCCIÓN

Varroa destructor (Anderson and Trueman) (Acari: Mesostigmata) es un ectoparásito obligado de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Actualmente, es considerado de distribución cosmopolita (Oldroyd, 1999; Rosenkranz *et al.*, 2010) y una de las principales amenazas a la apicultura mundial (Genersch, 2010). Durante los estadios de larva y pupa de las abejas, los ácaros ingieren hemolinfa causando pérdida de peso (Duay *et al.*, 2003), malformación de las obreras y debilidad general en las colmenas (Marcangeli *et al.*, 1992a; Garedew *et al.*, 2004) y una reducción en el tiempo de vida de las abejas (Amdam *et al.*, 2004). Además, *V. destructor* actúa como vector de varios virus presentes en las abejas melíferas (Chen & Siede, 2007) y es sugerido como la principal causa asociada a la pérdida de colmenas durante el invierno (Guzmán Novoa *et al.*, 2010).

En Argentina, el control de *V. destructor* es especialmente importante, dado que se exporta alrededor del 95% de la producción nacional de miel y contribuye con el 6% de la producción mundial (SAGPYA, 2009). Dado que numerosos cultivos dependen de las abejas para la polinización, la pérdida de colmenas es además un problema económico a escala global.

Se cree que las prácticas apícolas son en parte responsable de mantener las formas más virulentas de los patógenos, especialmente porque contribuyen a su transmisión horizontal (Fries & Camazine, 2001). Además, ciertas prácticas en la apicultura, como tener colmenas trashumantes o no rotar los acaricidas, revelarían que los factores socioeconómicos tienden a mejorar artificialmente el rendimiento de ciertas enfermedades.

La disponibilidad de recursos para las abejas depende de las condiciones ambientales de cada zona geográfica (Murray *et al.*, 2009). Al igual que en otros países, en Argentina, la cantidad y calidad de las fuentes de alimento ha decrecido notablemente (vanEngelsdorp & Maixner, 2010). La reducción de la diversidad de flores se debe en

gran medida a cambios en el uso de la tierra (Kremen *et al.*, 2007), promovidos por el avance tecnológico y los precios de mercado. El comportamiento de “robbing” o “pillaje” consiste en el robo de miel entre colmenas, lo cual es muy frecuente cuando los recursos alimenticios se vuelven escasos y termina impactando en la transmisión horizontal de *V. destructor* (Fries & Camazine, 2001).

Todo esto sugiere que la apicultura se ve amenazada por múltiples y complejas variables que involucran factores biológicos, ecológicos y socio-económicos. Recientemente, una revisión de trabajos sobre las pérdidas de colmenas acontecidas en Europa, Japón y los EE.UU. sugirió que si bien *V. destructor* juega un papel central no puede explicar por sí solo las pérdidas reportadas (Neumann & Carreck, 2010). A escala regional, junto con la pérdida de colonias, el desarrollo de poblaciones resistentes a los acaricidas y la falta de tratamientos coordinados son algunos de los problemas más graves en materia de control de la población de ácaros (Frigoli & Poffer, 2013).

En este contexto, deben considerarse estrategias alternativas o complementarias al control químico, incluyendo los programas de prevención y control de enfermedades. Estos programas se basan en estudios epidemiológicos que identifican factores que pueden explicar o contribuir a los brotes de enfermedades (vanEngelsdorp *et al.*, 2013). En los apiarios de América del Sur no se conocen los factores de riesgo asociados con la infestación de *V. destructor*.

OBEJTIVOS

- Estimar la prevalencia de colmenas con porcentajes de infestación con *Varroa destructor* superiores al umbral de daño establecido para la etapa pre-tratamiento acaricida durante el otoño.

- Identificar los factores de riesgo asociados con colmenas cuyos porcentajes de infestación con *Varroa destructor* superen el umbral de daño durante el otoño previo a la aplicación de un tratamiento acaricida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y tamaño de muestra

Se realizó un estudio observacional transversal entre febrero y mayo de 2013 en la provincia de Santa Fe. El porcentaje de infestación con *V. destructor* fue estimado luego de la cosecha de miel y antes de la aplicación de un tratamiento acaricida dado que tanto el monitoreo como los tratamientos son practicas claves para garantizar buenas condiciones sanitarias para el invierno (Currie & Gatién, 2006). El marco temporal del estudio (casi 5 meses) abarcó en su extensión las fechas de finalización de cosecha e inicio de tratamientos de todos los apiarios, que varían ampliamente de acuerdo a las zonas dentro de la provincia. Este período se caracteriza por presentar altas cargas parasitarias en las colmenas, debido a que los factores ambientales como el clima y el flujo de néctar son favorables para el crecimiento de las poblaciones del ácaro (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Trabajos previos han determinado un umbral de daño de 3% (3 ácaros por 100 abejas adultas) para la provincia de Santa Fe (Bulacio Cagnolo, 2011) o condiciones ambientales similares. Cuando los niveles de infestación superan este valor, se recomienda tratar las colmenas para evitar pérdidas severas durante el invierno.

Se analizaron en total 63 apiarios pertenecientes a diferentes apicultores. El tamaño de la muestra se estimó (nivel de confianza del 95% y una precisión en la estimación <10,5%) teniendo en cuenta que había en total 3735 apiarios en la provincia de Santa Fe con una prevalencia esperada de 74% de colmenas con un porcentaje de infestación >3% (SENASA, 2007; Departamento de Agricultura de Santa Fe, 2008). Se definieron cuatro zonas con base en el período de flujo de néctar y el calendario de

prácticas de manejo, la categorización de eco-regiones (Burkart *et al.*, 1999; Arzamendia & Giraud, 2004) y el uso de la tierra (Giorgi *et al.*, 2008): norte, centro, costa y sur (Figura 2.1).

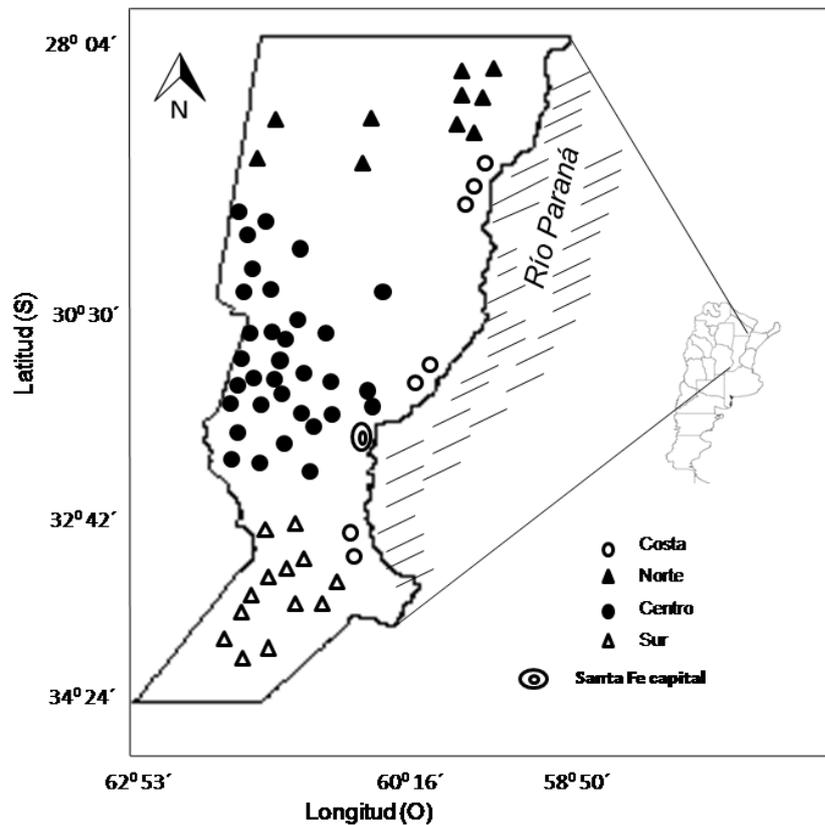


Figura 2.1 Distribución por zona de los apiarios incluidos en los monitoreos de la etapa pre-tratamiento en la provincia de Santa Fe.

El número de apiarios por zona fue asignado de acuerdo con la proporción de apiarios distribuidos en la provincia (Moher *et al.*, 2010), dado que la estratificación espacial es utilizada en estudios de gran escala para asegurar un número insesgado de unidades por zona. Dentro de cada apiario, se seleccionaron al azar un mínimo de 6 colmenas o el 10% del total de colmenas en apiarios con más de 60 colmenas (Lee *et al.*, 2010). Las colmenas incluidas en el monitoreo fueron manejadas por el apicultor de acuerdo con el manejo convencional aplicado al resto del apiario.

Toma de muestras: Fortaleza de la colmena y diagnóstico de infestación con V. destructor

Para estimar el porcentaje de infestación se tomó una muestra de abejas adultas o Varroa Forética (VF) en cada colmena. Además, se midieron los parámetros de fortaleza de la colmena (CCA, CCC, CCP y CCM) por estimación visual de acuerdo con la metodología detallada en materiales y métodos generales.

Encuesta de prácticas de manejo

La información sobre los potenciales factores de riesgo fue obtenida a través de una encuesta semi-estructurada (Anexo 2) completada por todos los apicultores que participaron del monitoreo. La encuesta incluyó 37 preguntas divididas en tres partes principales: datos generales del apiario, prácticas de manejo y tratamientos contra Varroa. El resumen completo de las variables derivadas de la encuesta y analizadas se mostró en materiales y métodos generales.

Análisis estadístico

De acuerdo con el porcentaje de infestación antes del tratamiento, se categorizaron todas las colmenas en dos niveles: alto ($> 3\%$) y bajo ($\leq 3\%$) nivel de infestación (Bulacio Cagnolo, 2011), siendo ésta la variable de respuesta. De aquí en adelante nos referiremos a la proporción de colmenas que presentaron un porcentaje de infestación $> 3\%$ como prevalencia de colmenas con $>3\%$.

En un primer paso, se realizó un análisis descriptivo para identificar variables con gran cantidad de observaciones perdidas o poca variabilidad. Luego de esta validación, se analizaron de manera individual todas las asociaciones entre las variables independientes y la prevalencia de colmenas con *V. destructor* ($> 3\%$) utilizando el test Chi-cuadrado de Pearson (χ^2) o correlación de Spearman, según correspondiese. Todas las variables con un valor $P < 0,15$ fueron seleccionadas para incluirse en un

modelo logístico multivariado. Previamente la colinealidad entre los potenciales factores de riesgo se evaluó mediante una prueba de Chi-cuadrado de Pearson. Cuando dos variables independientes estuvieron asociadas, sólo una fue incluida en el análisis multivariado (la que presentó menor valor de P en el análisis bivariado). Se ajustó un modelo mixto de regresión logística (distribución binomial, función de vínculo logit) con la variable apiario como factor aleatorio, dado que la unidad de análisis (colmenas) está agrupada. Se identificaron los factores de riesgo, las variables que presentaron un valor de $P < 0,05$ (test de Wald) en el modelo final. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con software R (versión 2.15.3).

RESULTADOS

Datos descriptivos

La mayoría de los productores encuestados desarrollan la apicultura como actividad secundaria, manejan menos de 200 colmenas y tienen más de 10 años de antigüedad en la actividad (12 ± 8 años). El tamaño medio de los apiarios monitoreados fue 43 ± 18 colmenas, con una mortalidad de colmenas promedio de los últimos tres años de $15,67 \pm 8,50\%$ colmenas por año y una producción promedio de miel de $30,43 \pm 11,01$ kilogramos por colmena/año.

La prevalencia de colmenas con infestación con *V. destructor* mayor a 3% fue 54,4% (209 de 384 colmenas). La parasitación promedio en la etapa pre-tratamiento de otoño fue $5,7 \pm 6,3\%$. El tamaño medio de la colmena fue $8,7 \pm 1,38$ CCA. No se encontró una correlación significativa entre CCA ($n = 375$; $r = 0,037$; $P = 0,47$), CCC ($n = 375$; $r = -0,088$; $P = 0,09$) y CCP ($n = 345$; $r = 0,079$; $P = 0,14$) y el porcentaje de infestación con *Varroa*. Aunque se encontró una correlación significativa entre la infestación y CCM ($n = 345$; $r = 0,188$; $P < 0,0001$), el coeficiente de correlación fue bajo y el valor de P fue influenciado por el tamaño de la muestra. Debido a que el momento de muestreo en los apiarios (entre febrero y mayo) influyó sobre el nivel de infestación registrado ($X^2 =$

21,88; $P < 0,0001$), fue incluido como variable en el modelo de regresión final. Tres niveles fueron definidos para la variable momento de muestreo: 1) febrero y la primera quincena de marzo; 2) la segunda quincena de marzo y la primera de abril y 3) la segunda quincena de abril y la primera de mayo (Tabla 2.1).

La mayoría de los apiarios fueron alimentados con alguna fuente de carbohidratos durante el otoño (88,5%) y la primavera (86,8%). La suplementación con alguna fuente de proteína, fue más utilizada durante la primavera (85,7%) en comparación con el otoño (54,1%), pero sólo el 39% de los apicultores lo aplicó en ambas estaciones. La suplementación proteica basada en polen incrementó significativamente el tamaño de las colmenas ($9,25 \pm 0,99$ CCA; $P = 0,036$) en comparación con las colmenas que recibieron algún otro tipo de suplementación o no recibieron ninguna ($8,66 \pm 1,40$ CCA). Las colmenas monitoreadas respetaron la proporción en la distribución de acuerdo con las zonas geográficas (norte= 60; centro= 204; sur 78 y costa= 42) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Definición y distribución de las variables seleccionadas de acuerdo con el análisis bivariado ($P < 0,15$), como potenciales factores de riesgo asociados con altos porcentajes de infestación con *V. destructor* (>3%).

Variables	Nivel	Nº de colmenas (%)	Porcentaje de colmenas >3%	valor <i>P</i>
Momento de muestreo	febrero y primera quincena de marzo	228 (59,3)	45,6	<0,0001
	Segunda quincena de marzo y primera de abril	114 (29,7)	62,3	

		Segunda quincena		
		de abril y primera	42(11)	81
		de mayo		
Suplementación proteica	No-Otros	354 (93,7)	55,9	0,003
	Polen	24 (6,3)	25	
Alimentación c/ carbohidratos	No-Sacarosa	318 (84,1)	55,7	0,013
	JMAF	24 (6,4)	25	
	Ambos	36 (9,5)	58,3	
Zona	Norte	60 (15,6)	65,0	0,007
	Centro	204 (53,2)	47,1	
	Sur	78 (20,3)	56,4	
	Costa	42 (10,9)	71,4	
Frecuencia de recambio de reinas (*)	No recambia	129 (34,1)	58,1	0,121
	Todos los años	60 (15,9)	60	
	Cada dos años	147 (38,9)	46,3	
	Más de dos años	42 (11,1)	59,5	
% de reemplazo de reinas	No o \leq 50 %	349 (92,3)	55,9	0,010
	> 50 %	29 (7,7)	31,0	
Desinfección del material post-cosecha	No	126 (33,3)	67,5	<0,0001
	Si	252 (66,7)	47,2	
Monitoreo de	No	48 (12,7)	68,8	0,028

colmenas previo al tratamiento	Si	330 (87,3)	51,8	
Monitoreo de colmenas posterior tratamiento	No	84 (22,3)	71,4	<0,0001
	Si	294 (77,7)	49	
Aplicó acaricida aprobado en 2012	No	18 (5)	72,2	0,099
	Si	348 (95)	52,3	
Aplicó acaricida aprobado en 2013	No	30 (8,5)	70	0,061
	SI	324 (91,5)	52,2	

(*) Colinelidad con porcentaje de reemplazo de reinas, excluido del modelo logístico final.

JMAF: jarabe de maíz de alta fructosa.

Análisis multivariado

Diez de las 37 potenciales variables evaluadas fueron seleccionadas de acuerdo con el análisis bivariado ($P < 0,15$; Tabla 2.1) para ser incluidas en el modelo multivariado. La frecuencia y el porcentaje de reemplazo de reinas estuvieron asociadas ($\chi^2 = 29,79$; $P < 0,0001$). Por lo tanto, sólo el porcentaje de reemplazo de la reina (proporción de colmenas en cada apiario en el que la reina se sustituye por una nueva durante una temporada) se incluyó en el modelo. Para el análisis de factores de riesgo, se utilizó el 95,3% de los datos provenientes de colmenas para las cuales todas las variables tenían respuesta (366 de 384 colmenas). De acuerdo con el modelo multivariado final, se identificaron cinco variables asociadas con la prevalencia de colmenas con >3% de infestación con *V. destructor* (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Modelo mixto de regresión logística para factores de riesgo asociados con la prevalencia de colmenas con altos porcentajes de *V. destructor* (>3%) al finalizar la temporada de cosecha y previo al tratamiento acaricida de otoño (n=384; Santa Fe, 2013).

Variable	Nivel	Odds ratio	IC 95% (O.R.)	Valor P
Suplementación proteica	No –Otros*	----	----	----
	Polen	0,348	0,129-0,941	0,037
Alimentación c/ carbohidratos	No-Sacarosa*	----	----	----
	JMAF	0,108	0,032-0,364	<0,0001
	Ambos	0,971	0,379-2,568	0,952
% de reemplazo de reinas	> 50 %*	----	----	----
	No o ≤ 50 %	3,280	1,208-10,158	0,027
Desinfección del material post-cosecha	Si*	----	----	----
	No	2,722	1,380-5,565	0,005
Monitoreo de colmenas post-tratamiento	Si*	----	----	----
	No	2,305	0,944-5,629	0,067

Intercepto: 0,203 ($P= 0,147$); radio de verosimilitud del modelo: 71, 825: $P<0,0001$; IC 95%: intervalo de confianza para *Odds ratio*.

*Categoría de referencia. JMAF: jarabe de maíz de alta fructosa.

No se encontró un efecto significativo del factor aleatorio ($P= 0,715$). La ocurrencia de colmenas con >3% de infestación con *Varroa* disminuyó cuando las colmenas fueron suplementadas con polen (OR=0,348; IC95%: 0,129-0,941; $P= 0,037$) y cuando el porcentaje de reemplazo de reinas superó el 50% de colmenas en cada apiario (OR=0,305; IC 95%: 0,107-0,872; $P= 0,027$).

Colmenas manejadas por apicultores que indicaron no desinfectar el material de madera después de su uso (pregunta 6, Anexo 2) presentaron una mayor probabilidad de ocurrencia de infestación mayor >3% (OR=2,722; IC95%:1,380-5,565; $P<0,005$). Adicionalmente, se encontró que los apicultores que indicaron hacer seguimiento regular los niveles de Varroa luego de aplicar un tratamiento (pregunta 9, Anexo 2) mostraron menores niveles de parasitación que aquellos que indicaron no controlar las colmenas tras la aplicación acaricida (OR= 2,305; IC 95%: 0,944-5,629; $P= 0,067$). Por otra parte, la prevalencia de colmenas con >3% de infestación disminuyó cuando se suministró exclusivamente jarabe de maíz de alta fructosa como fuente de carbohidrato (JMAF) (OR= 0,108; IC 95%: 0,032- 0,364; $P< 0,0001$) (Tabla 2.2).

Por otro lado, la zona centro presentó los apiarios más grandes ($49,22 \pm 19,49$ colmenas por apiario) donde se utilizaba con mayor frecuencia el polen como suplemento ($\chi^2= 21,86$; $P< 0,001$), el JMAF como fuente de carbohidrato ($\chi^2= 90,87$; $P< 0,001$) y el monitoreo de los niveles de ácaros después del tratamiento ($\chi^2= 46,63$; $P< 0,001$) en comparación con el resto de las zonas. Además, apiarios ubicados en el norte y en el centro reemplazaban las reinas en un mayor porcentaje de colmenas ($\chi^2= 13,67$; $P= 0,003$). Por último, apiarios ubicados en la región central y en la zona de la costa desinfectan frecuentemente los materiales de madera antes de almacenarlos ($\chi^2= 60,79$; $P< 0,001$). Otros factores, como el uso de productos aprobados en los últimos años, el monitoreo de colmenas antes del tratamiento y el momento de muestreo estuvieron asociados con los factores de riesgo identificados (Figura 2.2).

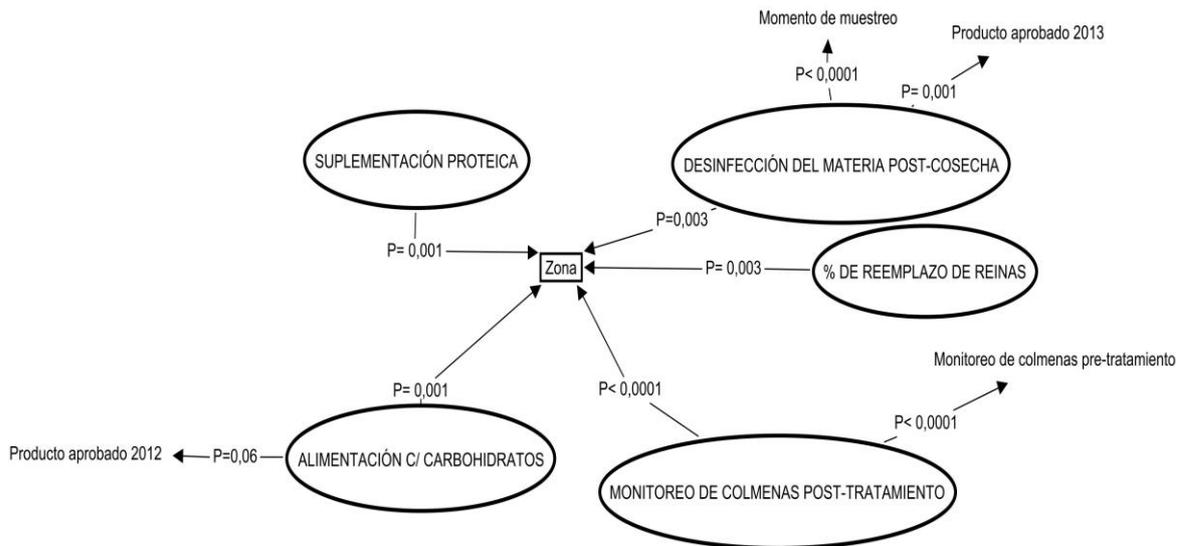


Figura 2.2 Esquema de interacción entre los factores de riesgo identificados en el modelo de regresión logística mixto asociados con la prevalencia de colmenas con >3% de VF en etapa pre-tratamiento y las variables que fueron excluidas por el ajuste en el análisis multivariado.

DISCUSIÓN

La presencia de *Varroa destructor* es una de las principales amenazas a escala global tanto para las poblaciones de *Apis mellifera* como para la producción de miel (Generch, 2010; Higes *et al.*, 2010; Le Conte *et al.*, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2008; 2009). Identificar y prevenir la ocurrencia de factores de riesgo asociados con el manejo apícola puede evitar profundizar este problema poniendo el foco sobre la intervención del hombre en la transmisión de esta enfermedad. Los resultados del presente estudio muestran cómo ciertas prácticas de manejo se correlacionan con un mayor nivel de infestación con Varroa.

El porcentaje de infestación en las colmenas al final de la temporada de cosecha y previo al tratamiento de otoño fue, en promedio, mayor al 3% establecido como umbral en la provincia de Santa Fe (Bulacio Cagnolo, 2011). Sin embargo, la parasitación registrada en este estudio fue inferior a los umbrales establecidos para que las colmenas sobrevivan el invierno propuestos para otras regiones, los cuales varían

entre 6 y 10% de infestación (Liebig, 2001; Fries *et al*, 2003; Currie & Gatién, 2006; Genersch *et al*, 2010; Rosenkranz *et al*, 2010). Esto puede explicarse en parte debido a que el impacto de *V. destructor* en las colmenas de abejas melíferas varía según las condiciones climáticas y en diferentes regiones (Currie & Gatién, 2006). Cinco factores de riesgo se encontraron asociados a la prevalencia de colmenas con >3% de infestación con *V. destructor*.

En primer lugar, el uso de polen como suplemento proteico presentó menor probabilidad de ocurrencia de colmenas con >3% de infestación. El polen es más adecuado para las colmenas ya que se consume más fácilmente que otros sustitutos (DeGrandi Hoffman *et al.*, 2008; Brodschneider & Crailsheim, 2010; Basualdo *et al.*, 2013). Aunque algunos estudios sugieren que las colmenas suplementadas durante el otoño no se desempeñan mejor en la primavera siguiente (Mattila & Otis, 2006), en la apicultura comercial se considera que la disponibilidad de polen previa al invierno para el desarrollo de las colmenas podría influir en el desarrollo durante la temporada siguiente. Por otra parte, a principios de la primavera, la alimentación suplementaria es una práctica corriente para mejorar el crecimiento de colonias cuando el polen es escaso (Keller *et al.*, 2005, Mattila & Otis, 2006). En cualquier caso, el uso de suplemento de proteínas es una práctica frecuente en el manejo apícola y de acuerdo con los resultados aquí presentados el tipo de suplemento influye sobre los niveles de infestación. El uso de polen aumenta el tamaño de las colmenas, lo que, combinado con la disminución en el número de ácaros por aplicación de un tratamiento, reduce el porcentaje de parasitación ya que es una variable que se mide como el número de ácaros por abeja. Además, un menor almacenamiento de proteínas en abejas parasitadas por *V. destructor* explica en parte el grave impacto del ácaro en las poblaciones post-invernales de las zonas templadas (Amdam *et al.*, 2004). Dado que la susceptibilidad a diversos patógenos, incluido *V. destructor*, depende en alguna medida de la nutrición (Field *et al.*, 2002; Basualdo *et al.*, 2014), es probable que

colmenas suplementadas con polen mejoren su respuesta al impacto negativo producido por la parasitación (Rinderer & Rothenbuhler, 1974; Rinderer & Elliott, 1977; De Grandi Hoffman *et al.*, 2010).

El uso de jarabe de maíz de alta fructosa como fuente de carbohidrato también estuvo asociado con una menor probabilidad de ocurrencia de colmenas con >3% de infestación. Un alto porcentaje de colmenas (96,8%) incluidas en este estudio fueron alimentadas con alguna fuente de hidratos de carbono, una práctica muy común luego de la cosecha de miel o durante períodos de escasez de alimento (Brodschneider & Crailsheim, 2010). El uso de jarabes alternativos para incorporar hidratos de carbono puede tener diferentes efectos (Neupane & Thapa, 2005). El uso de JMAF como fuente de carbohidratos puede disminuir el comportamiento "*robbing*" o "pillaje" entre colmenas (Barker & Lehner, 1978) y consecuentemente disminuir la transmisión horizontal de patógenos (Fries & Camazine, 2001). Aunque colonias suplementadas con JMAF durante el otoño tienen menos cría operculada en primavera que aquellas alimentadas con sacarosa, el tipo de jarabe parece no afectar la producción de miel al final de la temporada de cosecha en climas templados (Severson & Erikson, 1984). El uso de JMAF ofrece algunas ventajas tales como la reducción de costos y la facilidad de su aplicación (Standifer *et al.*, 1977; Somerville, 2000). La principal desventaja es que requiere de un manejo adecuado para evitar altos niveles de hidroximetilfurfural, un complejo formado por la deshidratación de los azúcares, donde la fructosa es 40 veces más reactiva que la glucosa como precursor de dicho compuesto (Le Blanc *et al.*, 2009; Ruiz Matute *et al.*, 2010). Además, la mayor prevalencia de colmenas con >3% de *Varroa* en aquellas que recibieron jarabe de azúcar común pudo deberse a que las abejas alimentadas con sacarosa producen un mayor número de celdas de cría (Neupane & Thapa, 2005) y por lo tanto proporcionan una buena oportunidad para la reproducción de *V. destructor*. Es importante que los apicultores consideren que las presiones nutricionales impuestas en la apicultura comercial forman parte del estrés

frecuente al que están sometidas las colmenas, lo que afecta la productividad de miel y la capacidad de supervivencia de las colmenas (Mattila & Otis, 2006).

Otra práctica de manejo importante para destacar es el reemplazo periódico de la reina en la colmena. Aunque no se ha estudiado como un posible factor de riesgo particularmente asociado con *V. destructor*, se han publicado varios estudios sobre la ventaja de realizarlo en apicultura (Tarpy *et al.*, 2000; Invernizzi *et al.*, 2006; Scheneider & DeGrandi Hoffman, 2008; Botías *et al.*, 2012). De manera similar a la reportado en Uruguay (Invernizzi *et al.*, 2006), en Argentina se considera que una reina puede mantener una colmena fuerte por aproximadamente dos temporadas. Se recomienda el recambio de reinas para evitar la enjambrazón y mejorar el comportamiento higiénico y la productividad de miel. Además, las colmenas con reinas nuevas disminuyen las tasas de infecciones con *Nosema* spp. (Botias *et al.*, 2012). Akyol *et al.* (2007) reportaron que las colmenas con reinas “jóvenes” tienden a presentar menor intensidad de infestación con *Varroa*. Según los resultados del presente estudio, cuanto mayor es el porcentaje de colmenas que recambian la reina al mismo tiempo, menor es el nivel de infestación con *V. destructor* en el apiario. Es probable que el efecto del porcentaje de recambio se explique en función de una menor probabilidad de ocurrencia de colmenas débiles al finalizar la cosecha. Cuando las colmenas se enferman y se debilitan, su vigilancia y defensa se vuelve inefectiva y son fácilmente “pilladas” por abejas provenientes de colmenas más fuertes (Fries & Camazine, 2001). Estas abejas pueden transportar ácaros foréticos prendidos en su cuerpo hacia su propia colmena favoreciendo la transmisión horizontal del parásito.

El monitoreo y la desinfección del material de madera sin utilizar son recomendadas entre las mejores prácticas de manejo (Heintz *et al.*, 2011). El artículo número 4.14.4 de la Organización oficial para la vigilancia sanitaria permanente de apiarios en el Código Sanitario para Animales Terrestres (OIE, 2012) establece que la aplicación de medidas de higiene, en particular, el tratamiento de las colmenas y la desinfección del

equipamiento son tareas obligatorias para garantizar la rápida erradicación de cualquier brote de una enfermedad. Aunque estas prácticas no tienen un efecto biológico sobre la parasitación con *Varroa* como la alimentación o el reemplazo de reina, los apicultores que desinfectan el material de madera o frecuentemente monitorean sus colmenas parecen ser más rigurosos en todas sus prácticas de manejo, incluidas aquellas con efecto directo. Los resultados del presente estudio muestran que los apicultores que indicaron monitorear sus colmenas luego de la aplicación de un tratamiento acaricida presentaron menores niveles de *Varroa* que aquellos que no lo hacen. El monitoreo post-tratamiento permite revelar fallas en el control de *Varroa* debido a la falta de eficacia de un producto o el aumento de la población post-tratamiento por re-invasión proveniente de colmenas no tratadas (Renz & Rosenkranz, 2001). Consiguientemente, la detección de dicha situación se puede corregir mediante la aplicación de otro tratamiento los niveles de *Varroa* antes de la llegada del invierno. Esta variable estuvo asociada a otras prácticas de manejo como el monitoreo anterior a la aplicación acaricida y el uso de productos comerciales aprobados por SENASA en 2012 y 2013. Esto es probablemente debido a que, en general, los apicultores que incorporan un programa de manejo, implementan prácticas recomendadas en dichos programas, que en conjunto mejoran la productividad de las explotaciones apícolas.

Los factores ambientales pueden afectar indirectamente el estado del parásito, a través de su influencia sobre el hospedador (Rosenkranz *et al.*, 2010). La influencia de la zona geográfica puede abarcar un efecto indirecto del clima y otras condiciones ambientales como la disponibilidad de recursos forrajeros y el uso de pesticidas sobre la tasa de crecimiento del parásito mediado por su fertilidad (Harris *et al.*, 2003). Se ha reportado en climas templados que un aumento evidente en la infestación de abejas adultas surge cuando la cría disminuye durante la transición hacia el invierno (Moretto *et al.*, 1991). Sin embargo, en este estudio, las colmenas más infestadas no

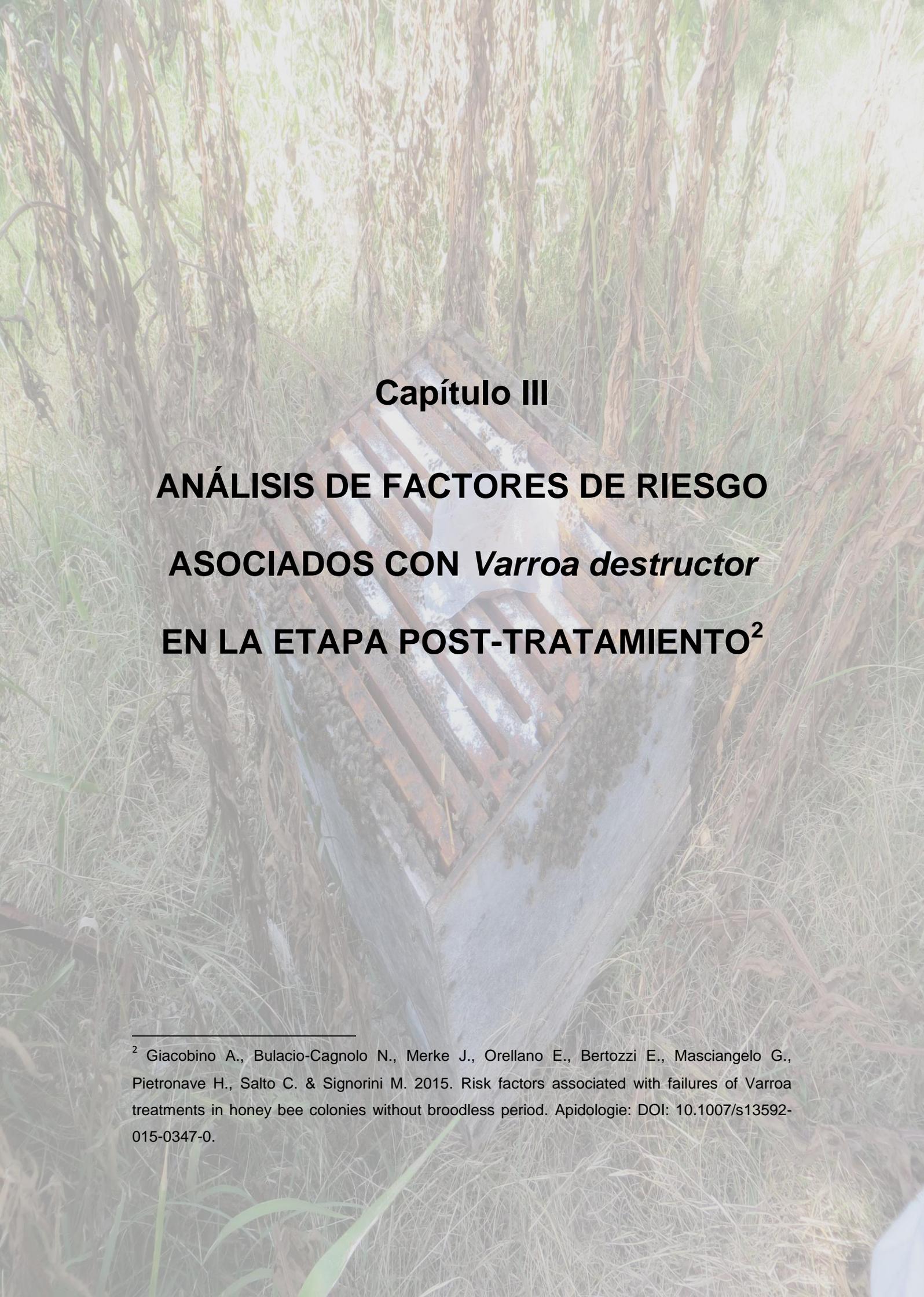
presentaron una reducción significativa en área de cría. Por el contrario es posible que los apiarios situados cerca del río Paraná comenzaran sus tratamientos con mayores niveles de infestación con *V. destructor* dado que el flujo de néctar se prolonga por lo menos hasta mediados del otoño (finales de abril) en esa zona. El clima de la zona costa tiene características "tropicales" debido a su cercanía al río Paraná, por ejemplo, presenta una humedad relativa más alta. Estas diferencias en las condiciones climáticas pueden implicar un periodo de disponibilidad de polen más largo y consecuentemente períodos más largos de desarrollo de cría (Mattila & Otis, 2006). Además, se observó que el efecto de la variable zona se asoció con el momento de muestreo probablemente debido a que el criterio definido para el muestreo (fin de temporada de cosecha de miel e inicio de tratamientos) varía según las diferentes zonas. Sin embargo, en el modelo multivariado la prevalencia de colmenas con >3% de infestación no se asoció a la región geográfica. Probablemente la influencia de la zona sobre la infestación con *V. destructor* se relacione más con sus prácticas de manejo o la densidad de colmenas que con los factores ambientales ya que se encontraron asociaciones entre la zona y el tamaño de los apiarios. Además, variables de manejo centrales como el tipo de suplementación proteica, la fuente de carbohidrato y el monitoreo variaron de acuerdo con las zonas dentro de la provincia.

CONCLUSIONES

- La prevalencia de colmenas con una infestación mayor al 3% resultó ser menor que la esperada considerando estudios previos realizados en la misma región.
- La prevalencia de colmenas con una infestación mayor al 3% en las abejas adultas parece estar asociado con múltiples factores, lo que ilustra la complejidad de la epidemiología de *V. destructor*.
- Suplementar con polen, alimentar con jarabe de maíz de alta fructosa y reemplazar la reina en altos porcentajes de colmenas son prácticas que

reducen la probabilidad de presentar altas tasas de infestación con *V. destructor*.

- El monitoreo de los niveles de *V. destructor* después del tratamiento acaricida de otoño y la desinfección del equipamiento de madera son prácticas de manejo que indirectamente influyen sobre la prevalencia de colmenas con altos porcentajes infestación.
- Independientemente de sus limitaciones, los estudios de campo son importantes porque permiten reunir información sobre las colmenas en condiciones reales y manejadas por los apicultores.



Capítulo III

ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO

ASOCIADOS CON *Varroa destructor*

EN LA ETAPA POST-TRATAMIENTO²

² Giacobino A., Bulacio-Cagnolo N., Merke J., Orellano E., Bertozzi E., Masciangelo G., Pietronave H., Salto C. & Signorini M. 2015. Risk factors associated with failures of *Varroa* treatments in honey bee colonies without broodless period. *Apidologie*: DOI: 10.1007/s13592-015-0347-0.

INTRODUCCIÓN

La producción apícola global está amenazada por el ácaro ectoparásito *Varroa destructor* (Anderson & Trueman), ya que su distribución geográfica se ha extendido con éxito en todo el mundo (Oldroyd, 1999; Rosenkranz *et al.*, 2010). Los tratamientos contra *Varroa* se han convertido en una herramienta básica entre las prácticas apícolas (Genersch, 2010), principalmente para mantener los porcentajes de parasitación durante el otoño por debajo de los niveles indicados para evitar grandes pérdidas invernales (Genersch *et al.*, 2010; Bulacio Cagnolo, 2011). Existen diversas estrategias de control de las poblaciones de *V. destructor* en las colmenas productoras de miel (Rosenkranz *et al.*, 2010), siendo el uso de sustancias químicas las más utilizadas (Ruffinengo *et al.*, 2014). Tanto la facilidad de su aplicación como la ventaja económica, hacen que muchos apicultores utilicen al menos un tratamiento químico en el año (Lodesani *et al.*, 2009). Sin embargo, existen algunas limitaciones como el surgimiento de poblaciones resistentes (Milani, 1999; Elzen *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2005, Maggi *et al.*, 2011) y la variabilidad en la eficacia (Underwood & Currie, 2003; Aldea *et al.*, 2012; Dietemann *et al.*, 2012).

Una gran variedad de tácticas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) han sido propuestas y probadas para el control de *V. destructor* (Imdorf *et al.*, 2003; Calderone, 2005; Delaplane *et al.*, 2005; Currie & Gatién, 2006). Mientras que erradicar el control químico resulta un objetivo difícil de alcanzar, debería reducirse la frecuencia de aplicación de los acaricidas sintéticos buscando maximizar su eficacia. Por ejemplo, se deberían considerar las diferencias estacionales (Currie & Gatién, 2006), ajustarse a las instrucciones del marbete de cada producto, rotar los principios activos utilizados (Rosenkranz *et al.*, 2010) y vigilar el estado sanitario de las colmenas son alguno de los principales factores que pueden afectar el resultado final de un tratamiento de control. De la misma manera, la efectividad del control de *V. destructor* en climas templados puede depender de la disponibilidad de cría en las colmenas. La simulación

de la dinámica poblacional de *Varroa* predice una menor cantidad de ácaros para una temporada corta y con un corte definido en la postura de cría durante el invierno en comparación con una larga temporada de disponibilidad de celdas con cría (Vetharaniam, 2012).

Además, para identificar zonas con mayor probabilidad de fallas en el control es necesario utilizar un enfoque de análisis espacial, que considere a lo largo de una región, la variación en los factores ambientales o en las prácticas de manejo.

OBJETIVOS

- Estimar la prevalencia de colmenas con porcentajes de infestación con *Varroa destructor* superiores al umbral de daño establecido para la etapa post-tratamiento acaricida durante el otoño.
- Identificar los factores de riesgo asociados a la falla en el control de *Varroa destructor* durante el tratamiento acaricida de otoño en apiarios de la Provincia de Santa Fe.
- Analizar la distribución espacial de las colmenas con fallas en el control de *Varroa destructor* en la provincia de Santa Fe.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y tamaño de muestra

Se realizó un estudio observacional transversal entre abril y junio de 2013 en la provincia de Santa Fe. El momento de muestreo estuvo determinado por la finalización del periodo de tratamiento acaricida de otoño (45 días posteriores al inicio del tratamiento), para evaluar los niveles de infestación de las colmenas antes del comienzo del invierno. El marco temporal del monitoreo fue de aproximadamente tres meses debido a la variación en las fechas de inicio de los tratamientos de acuerdo a las zonas dentro de la provincia.

Si bien se respetó el tamaño de la muestra estimado (nivel de confianza del 95% y una precisión en la estimación <10,5%), se analizaron 62 de los 63 apiarios monitoreados en el primer muestreo (capítulo 2), con un total de 377 colmenas. La definición de zonas geográficas y el número de apiarios por zona fue asignado de acuerdo con la proporción de apiarios distribuidos en la provincia (Moher *et al.*, 2010), de la misma manera que en la etapa de monitoreo pre-tratamiento (capítulo 2). Dentro de cada apiario, se seleccionaron al azar un mínimo de 6 colmenas o el 10% del total de colmenas en apiarios con más de 60 colmenas (Lee *et al.*, 2010).

Toma de muestras: Fortaleza de la colmena y diagnóstico de infestación con V. destructor

Para estimar el porcentaje de infestación se tomó una muestra de abejas adultas o Varroa Forética (VF) en cada colmena. Además, se midieron los parámetros de fortaleza de la colmena (CCA, CCC, CCP y CCM) por estimación visual de acuerdo con la metodología detallada en materiales y métodos generales.

Del diagnóstico de Varroa Forética de las 377 colmenas analizadas, se estimó la prevalencia de colmenas con más de 1% de VF (1 ácaro por 100 abejas adultas) luego

del tratamiento acaricida de otoño. Estas colmenas (>1% de VF) fueron consideradas como colmenas con fallas en el tratamiento (FT) para controlar Varroa. De aquí en adelante nos referiremos a la proporción de colmenas que presentaron un porcentaje de infestación > 1% post-tratamiento como prevalencia de colmenas FT.

Esta condición es importante en colmenas provenientes de clima templado que no presentan un corte definido en la postura dado que la proporción de ácaros en las celdas de cría es un predictor lineal significativo de la tasa de crecimiento (Harris *et al.*, 2003). El umbral fue definido asumiendo que si durante el invierno las colmenas presentan celdas de cría disponibles, deberían mantener niveles de Varroa post-tratamiento de otoño cercanos a 0%. El 85–90% de Varroa está en las celdas durante un ciclo de cría (Vetharanim, 2012) y por lo tanto estarían afectando el desarrollo de la población de abejas de la siguiente primavera.

Las variables analizadas como potenciales factores de riesgo para las colmenas con FT fueron la condición de parasitación con Varroa pre-tratamiento y la fortaleza de la colmena en dicho momento (derivados del monitoreo anterior) y los datos sobre el manejo del apiario recolectados en la encuesta pre-tratamiento (Anexo 2). Se recopiló información sobre: 1) características generales del apiario (localización geográfica, número de colmenas, producción de miel y mortalidad promedio de los últimos tres años); 2) Prácticas de manejos comúnmente aplicadas (alimentación con carbohidratos, suplementación proteica, monitoreo de colmenas realizado por los apicultores, reemplazo de reinas, división de colmenas mediante núcleos, trashumancia) y 3) tratamientos acaricidas para controlar Varroa (principio activo, fecha de tratamiento, rotación durante los últimos 4 años). Además durante el monitoreo post-tratamiento se consultó con el apicultor el producto y la fecha de aplicación del tratamiento acaricida aplicado durante el otoño 2013 (Anexo 3).

Análisis estadístico

La relación entre todas las variables independientes (potenciales factores de riesgo) y la prevalencia de colmenas con FT (parasitación >1%) fue analizada mediante el test de Chi cuadrado de Pearson (χ^2). Se seleccionaron todas aquellas variables con valores de significancia $P < 0,15$ en el análisis bivariado y que no presentaban colinealidad entre sí. Cuando dos potenciales factores estuvieron asociados, se seleccionó el de menor valor P para incorporar al análisis multivariado.

Se ajustó un modelo de regresión logística mixto con las variables seleccionadas en el paso anterior como factores fijos y el apiario como factor aleatorio. Se identificaron los factores de riesgo, las variables que presentaron un valor de $P < 0,05$ (test de Wald) en el modelo final. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con software R (versión 2.15.3).

Análisis espacial

Los registros de parasitación posterior al tratamiento acaricida fueron utilizados para analizar la distribución espacio-temporal de las colmenas con fallas en el control. Se asumió una distribución de Bernoulli para las colmenas con FT clasificadas como “casos” (casos >1%; controles $\leq 1\%$). El set completo de datos fue escaneado para determinar agrupaciones de colmenas con mayor o menor probabilidad de presentar fallas en el control utilizando el método de detección de *cluster* local de *Spatial Scan Statistic*. El análisis es definido por una ventana circular con radio variable centrada alrededor de uno de los múltiples centroides posibles a lo largo de la región de estudio, de manera que se obtienen infinitos círculos solapados de diferente tamaño (Kulldorff *et al.*, 1998). Se calculó la razón de verosimilitud (LR por *likelihood ratio*) para cada agrupación o *cluster* propuesto, con límite superior de escaneo fijado sobre el 50 % del total de la población en riesgo analizada. Se reportaron el *cluster* más probable y los

cluster secundarios significativos según el LR (Kulldorff, 2014). El análisis espacial fue realizado utilizando el software SaTScan versión 9.2 (www.satscan.org).

RESULTADOS

Un total de 76 (20,2%) de las 377 colmenas presentaron niveles de infestación mayores al 1% luego del tratamiento contra *V. destructor* y fueron consideradas colmenas con FT. La parasitación con *V. destructor* promedio por colmena previo al tratamiento fue 5 ± 6 % de VF. Antes de la aplicación, las colmenas presentaban $8,70 \pm 1,39$ CCA y $4,63 \pm 1,87$ CCC. El número de CCC pre-tratamiento fue similar ($P=0,192$) entre las colmenas con FT ($4,43 \pm 1,44$) y las colmenas con infestación $<1\%$ post-tratamiento ($4,7 \pm 1,96$). El promedio de CCM y CCP antes de la aplicación fue $2,97 \pm 1,62$ y $0,86 \pm 0,66$ cuadros, respectivamente.

Al finalizar el tratamiento, las colmenas tenían $7,32 \pm 1,78$ CCA, $1,46 \pm 1,18$ CCC, $3,56 \pm 1,80$ CCM y $0,58 \pm 0,69$ CCP. El principio activo más utilizado en el otoño 2013 fue Flumetrina (43 de los 62 apicultores), seguido por Amitraz (10 apicultores), Ácido Oxálico (cinco apicultores) y Cumafós (4 apicultores). La mayoría de los apicultores (90,5%) utilizó un acaricida comercial aprobado por SENASA: 69,8% aplicó Flumevar® (tiras de flumetrina 0,34g/ 100g de producto), 14,3 % utilizó Amivar® (tiras de amitraz 4,13 g/ 100g de producto), 3,2% Cumavar® (tiras de Cumafós 8,5 g/ 100g de producto) y el 3,2% Oxavar® (polvo de ácido oxálico 97 g/100 g de producto). Un grupo reducido de apicultores (9,5%) utilizó formulaciones caseras.

Luego del análisis bivariado y el test de colinealidad, 14 del total de variables independientes evaluadas fueron incluidas en el modelo de regresión logística mixto (valor $P < 0,15$). Las variables seleccionadas fueron: porcentaje de VF pre-tratamiento, alimentación con carbohidratos, suplementación proteica, producto acaricida y fecha del tratamiento de otoño, rotación de principios activos, tratamiento de primavera, monitoreo de los niveles de *Varroa* por parte del apicultor, zona, antigüedad en

apicultura, reemplazo de reinas, división mediante núcleos, trashumancia y porcentaje de recambio de cuadros (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Modelo de regresión logística mixto para los factores asociados con la prevalencia de colmenas con FT (>1% VF) luego de la aplicación de un tratamiento contra *V. destructor* en otoño (efecto aleatorio: apiario; n=377).

Variable	Nivel	Valor P	Odds ratio	IC 95% (O.R.)	Valor P
Análisis	Bivariado		Multivariado		
Suplementación proteica	No*	<0,0001	----	----	----
	Si		----	----	0,639
Alimentación c/ carbohidratos	No-Sacarosa*	0,007	----	----	----
	JMAF		----	----	0,924
Reemplazo de reinas	Si*	<0,0001	----	----	----
	No		8,849	2.551-30.303	0,001
Parasitación pre-tratamiento otoño	Menos de 3%*	0,007	----	----	----
	3% o más		4,884	1.820-13.102	0,002
Monitoreo previo al tratamiento otoño	Si*	0,001	----	----	----
	No		----	----	0,591
Zona	Costa*	<0,0001	----	----	----
	Norte		----	----	0,995

	Centro		----	----	0,971
	Sur		----	----	0,971
Antigüedad en apicultura	Hasta 10 años*	<0,0001	----	----	----
	Más de 10 años		----	----	0,147
% del apiario que divide por núcleos	Menos de 50%*	<0,0001	----	----	----
	50% o Más de 50%		----	----	0,944
Recambia cuadros por colmena	Hasta 3 cuadros*	0,036	----	----	----
	Más de 3 cuadros		----	----	0,941
Trashumancia	No*	0,007	----	----	----
	Si		----	----	0,922
Rotación de acaricidas (últimos dos años)	No *	<0,0001	----	----	----
	Si		----	----	0,979
Realiza tratamiento en primavera	No *	0,015	----	----	----
	Si		----	----	0,983
Producto acaricida en otoño	Orgánicos*	<0,0001	----	----	----
	Flumetrina/amitraz		----	----	0,972
	Cumafós		----	----	0,999

Fecha de tratamiento	Feb./mar.*	<0,0001	----	----	----
otoño	Abr./may.		----	----	0,903

Intercepto: $34,833 \pm 323,577$; ($P= 0,914$). IC 95%: intervalo de confianza para Odds ratio.

*Categoría de referencia. JMAF: jarabe de maíz de alta fructosa.

El modelo multivariado final identificó dos variables asociadas con la prevalencia de colmenas con FT (Tabla 3.1). El factor aleatorio apiario tuvo un efecto significativo ($P < 0,01$). La probabilidad de ocurrencia de colmenas con FT aumentó cuando no se realizó recambio de reinas (OR= 8,849; IC95%: 2,551-30,303; $P= 0,001$), así como cuando el porcentaje de VF pre-tratamiento fue del 3% o superior (OR= 4,884; IC95%: 1,820-13,102; $P= 0,002$) (Tabla 3.1). Además, se encontró que las variables que fueron removidas del modelo multivariado final estuvieron asociadas con el reemplazo de reinas y/o con el porcentaje de VF pre-tratamiento (Figura 3.1). El tratamiento de primavera ($\chi^2= 8,52$; $P= 0,007$), la rotación de principios activos ($\chi^2= 11,33$; $P= 0,002$), la división mediante núcleos ($\chi^2= 24,29$; $P < 0,0001$), la trashumancia ($\chi^2= 13,18$; $P < 0,0001$), el porcentaje de recambio de cuadros ($\chi^2= 7,68$; $P= 0,007$) y la suplementación proteica ($\chi^2= 52,27$; $P < 0,0001$), estuvieron asociadas con el reemplazo de reinas.

Por otro lado, la fecha de tratamiento de otoño ($\chi^2= 11,70$; $P= 0,001$) estuvo asociada con el porcentaje de VF pre-tratamiento. Además, el monitoreo previo al tratamiento de otoño ($\chi^2= 11,29$; $P= 0,001$ y $\chi^2= 4,74$; $P= 0,03$), la zona ($\chi^2= 96,68$; $P= 0,001$ y $\chi^2= 10,24$; $P= 0,017$), la alimentación con carbohidratos ($\chi^2= 11,29$; $P < 0,0001$ y $\chi^2= 7,75$; $P= 0,008$) y el producto acaricida de tratamiento de otoño ($\chi^2= 72,58$; $P < 0,0001$ y $\chi^2= 6,06$; $P= 0,048$) estuvieron asociados con ambos factores, el reemplazo de reinas y nivel de VF pre-tratamiento, respectivamente. La antigüedad en apicultura no estuvo asociada al reemplazo de reinas ($\chi^2 < 0,001$; $P=0,99$) ni al nivel de VF pre-tratamiento ($\chi^2= 0,31$; $P= 0,6$).

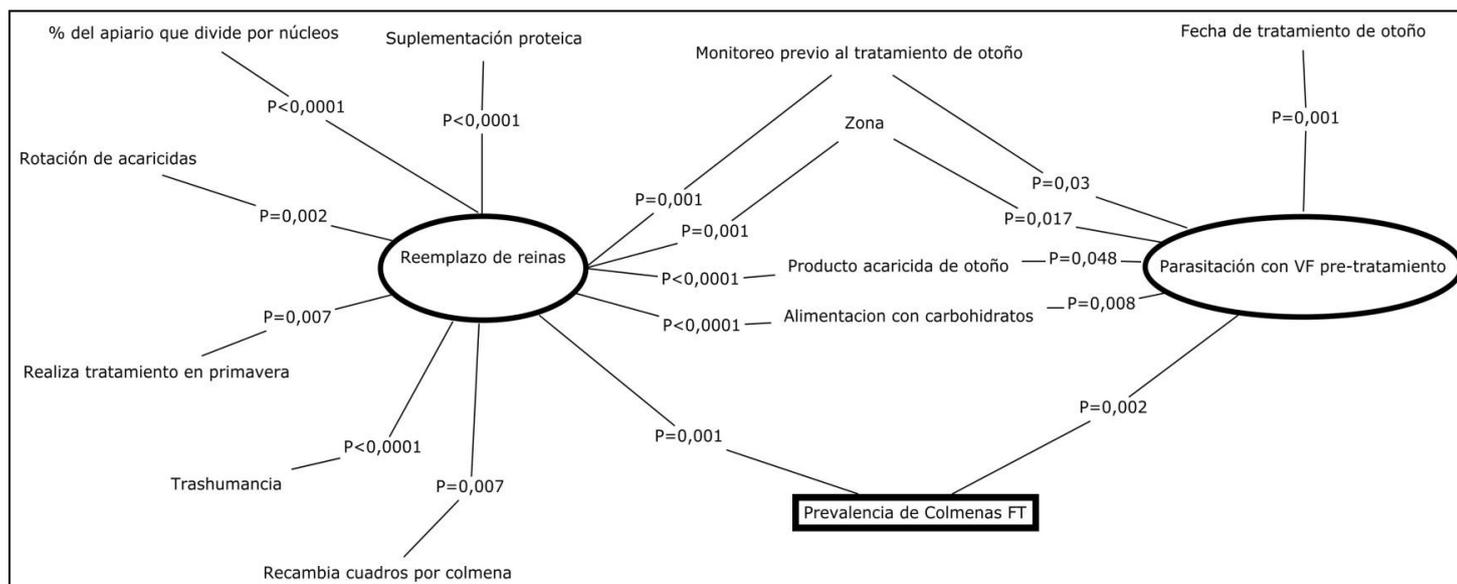


Figura 3.1 Esquema de interacción entre los factores de riesgo asociados con la prevalencia de colmenas con FT identificados en el modelo de regresión logística mixto y las variables que fueron excluidas por el ajuste en el análisis multivariado.

Se detectaron dos *cluster* significativos a lo largo del rango geográfico (Tabla 3.2). El *cluster* más probable (número de ID= 1) fue el más extenso, abarcando aproximadamente 115 Km de radio. Se localizó en el sur de la provincia de Santa Fe (Figura 3.2A) y presentó un riesgo relativo de 3,78 (*cluster* de alta tasa). Todas las colmenas que se encontraban dentro de este *cluster* tuvieron probabilidades casi cuatro veces mayores de presentar fallas en el control de Varroa.

Tabla 3.2 Distribución espacial: *Cluster* de alta y baja tasa de colmenas con fallas en el control de *Varroa destructor*.

<i>Cluster</i>	ID	Radio del <i>Cluster</i> (Km)	Número de Colmenas	Riesgo Relativo	Valor <i>P</i>
Más probable	1	114,46	123	3,78	<0,0001
Secundarios	2	39,59	64	0	<0,0001

Riesgo Relativo:<1 baja tasa de colmenas FT; >1 alta tasa de colmenas FT; n: 62; total población: 379; total número de colmenas FT: 76; tamaño máximo del *cluster* espacial: 50% de la población en riesgo, número de iteraciones: 999

Asimismo, todas las colmenas que estuvieron comprendidas en el *cluster* de baja tasa recibieron un tratamiento con acaricidas sintéticos aprobados ($P < 0,0001$), en una fecha temprana ($P < 0,0001$) y pertenecían a apiarios donde usualmente se rotan los principios activos ($P < 0,0001$). Un total de 60,5% de las colmenas con $>3\%$ de VF pre-tratamiento estuvieron significativamente asociadas con el hecho de pertenecer a un *cluster* de alta tasa de colmenas con FT ($P = 0,01$) (Figura 3.2B). Por el contrario, no se encontró una relación entre el reemplazo de reinas y los *cluster* de alta o baja tasa de colmenas con FT ($P = 0,626$) (Figura 3.2C).

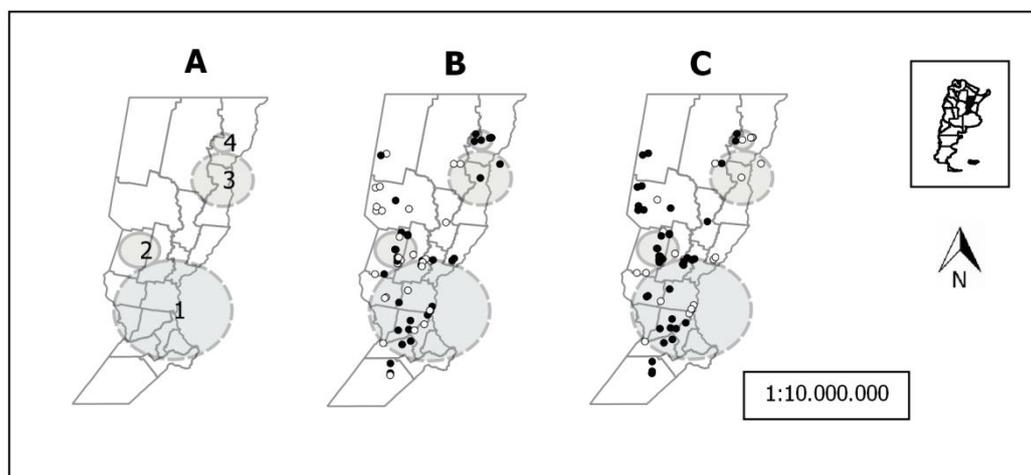


Figura 3.2 Distribución de apiarios monitoreados en la provincia de Santa Fe ($n=62$). **A)** Distribución de *cluster* (puramente espacial) posterior al tratamiento acaricida, de alta tasa (1 y 3) y baja tasa (2 y 4) de infestación con *Varroa destructor*. **B)** Asociación espacial entre *cluster* y la distribución de apiarios de acuerdo con el porcentaje de infestación con *V. destructor* previo al tratamiento acaricida de otoño (Círculo negro: tasa superior al 3%; círculo Blanco: tasa menor o igual al 3%). **C)** Asociación espacial entre *cluster* y la distribución de apiarios de acuerdo con la aplicación de recambio de reina (Círculo negro: recambia; círculo Blanco: no recambia).

DISCUSIÓN

Muchas veces los tratamientos acaricidas fallan en el control de *Varroa destructor* principalmente como consecuencia del desarrollo de resistencia (Lodesani *et al.*, 1995; 2009; Goodwin *et al.*, 2005). La mala aplicación de los productos comerciales

aprobados y el uso de acaricidas caseros (Higes *et al.*, 2010) aumentan la frecuencia de aparición de poblaciones de ácaros resistentes a los principios activos. La resistencia también favorece el uso de dosis crecientes en las aplicaciones químicas y aumenta los residuos de acaricidas en los productos apícolas (Tremolada *et al.*, 2004; Bogdanov, 2006; Le Conte *et al.*, 2010). En este contexto, el ajuste de algunas prácticas de manejo en apicultura asociados con la mejora en los resultados de un tratamiento acaricida puede ayudar a reducir el desarrollo de resistencia a los compuestos (Lodesani *et al.*, 2009) y evitar la aparición de residuos en los productos de la colmena. Además, dado que la flumetrina fue el principio activo más utilizado durante el 2013 y hasta el momento no se han detectado poblaciones de *Varroa* resistentes en la Argentina, la falla de los tratamientos parece ser un fenómeno multicausal.

Las colmenas con problemas de control acaricida (colmenas con FT) tenían 4,9 veces más riesgo de ocurrir cuando el porcentaje de infestación con *Varroa* antes del tratamiento fue superior al 3%. Sin embargo, evitar porcentajes de VF >3% es muy difícil, ya que el tratamiento sólo puede llevarse a cabo luego de la cosecha y a menudo los niveles de VF son muy elevados (Le Conte *et al.*, 2010). Existen prácticas de manejo que favorecen la ocurrencia de niveles de infestación con *Varroa* más bajos hacia el final del verano, tales como la suplementación proteica, la alimentación con carbohidratos, el monitoreo de las colmenas y la desinfección del material inerte (Giacobino *et al.*, 2014). Estrategias integradas que incluyan mantener colmenas con abejas sanas y bien nutridas, monitoreos del nivel de infestación con *Varroa* y la aplicación, si se requiere, de acaricidas orgánicos durante la primavera (Giovenazzo & Dubreuil, 2011) son clave para mejorar el resultado global de un tratamiento. Mantener niveles de infestación bajos durante el otoño es fundamental dado que la presencia de *Varroa destructor* es una de las principales causas de mortalidad invernal en las

colmenas de abejas melíferas (Genersch *et al.*, 2010; Guzmán-Novoa *et al.*, 2010; Le Conte *et al.*, 2010).

El recambio de reina tuvo también un efecto significativo como factor de riesgo asociado con la ocurrencia de colmenas FT. Estudios previos sugieren que el recambio es una característica central asociada con la salud de las abejas (Tarpy *et al.*, 2000; Invernizzi *et al.*, 2006; Schneider & DeGrandi Hoffman, 2008; Botias *et al.*, 2012). Además, apiarios donde comúnmente no se recambia la reina, el riesgo de alcanzar porcentajes de VF mayores al 3% durante el otoño es mayor (Giacobino *et al.*, 2014). La salud y la aptitud de una colmena depende en gran medida de la calidad de la reina (Botias *et al.*, 2012), ya que la variación en su potencial reproductivo afecta a toda su organización (Tarpy *et al.*, 2000). Asimismo, en colmenas con reinas jóvenes, el daño causado tanto por altos niveles de Varroa (Akyol *et al.*, 2007) como por la infección con *Nosema* sp. (Botias *et al.*, 2012) es menor. Dado que se recomienda el recambio de reinas para mejorar el comportamiento higiénico, una posible interacción con la aplicación de un tratamiento acaricida podría disminuir la probabilidad de la ocurrencia de colmenas con FT.

La disminución en la ocurrencia de colmenas FT se asocia con algunas prácticas de manejo, ya que éstas mejoran la eficacia global de una estrategia de control que incluye un tratamiento químico. Generalmente, los apicultores que adhieren a un programa de manejo mantienen niveles aceptables de Varroa durante el otoño y después del tratamiento (Giacobino *et al.*, 2014). La alimentación con carbohidratos podría influir indirectamente en los niveles de parasitación de otoño, ya que abejas mejor nutridas responden mejor a las tensiones nutricionales acumuladas en colmenas comerciales (Mattila & Otis, 2006). Por otro lado, si el tratamiento es aplicado a principios del otoño la ocurrencia de colmenas con FT es menor (sólo 10% de colmenas FT), debido a que la fecha de tratamiento tiene efectos significativos en la tasa de mortalidad de colmenas, los niveles de ácaros y el área de cría en la

primavera siguiente (Strange & Sheppard, 2001). Asimismo, las colmenas que son tratadas temprano en la temporada de otoño tienen un menor nivel de infestación con *Varroa* durante el desarrollo de la población de abejas de invierno (Pohorecka *et al.*, 2014).

La parasitación con *V. destructor* previo a la aplicación de un acaricida registrada en este estudio fue menor que lo esperado para el mismo periodo en trabajos anteriores (Liebig, 2001; Fries *et al.*, 2003; Currie & Gatién, 2006; Rosenkranz *et al.*, 2010). Sin embargo, el porcentaje de VF pre-tratamiento estuvo altamente asociado con la probabilidad de ocurrencia de colmenas FT, sugiriendo que a medida que el nivel de *Varroa* post-cosecha aumenta durante el otoño, el control de las poblaciones se ve más comprometido.

Del mismo modo, el criterio del 1% establecido para las colmenas FT estuvo por debajo del umbral de daño económico en relación con la pérdida invernal de colmenas en Alemania (Genersch *et al.*, 2010). Tal vez, la principal diferencia se deba al hecho de que las colmenas de otoño en Alemania ya han producido su población de abejas de invierno y por lo general tienen poco o no tienen cría (Genersch *et al.*, 2010). La relación de ácaros vivos/muertos cambia entre períodos en que la cría de abejas está presente o ausente (Martin, 1998). Países del norte de Europa tienen un verano más corto, lo que resulta en un período de cría acotado y un menor número de ciclos de reproducción de ácaros, lo que lleva a un menor riesgo de pérdidas relacionadas con *Varroa* (van der Zee *et al.*, 2014). Además, prácticamente toda la población se encuentra en fase forética durante el invierno y por lo tanto vulnerables a los productos químicos de control. Por el contrario, si las colmenas no son tratadas a finales del verano, el aumento relativo de la infestación con *Varroa* impacta negativamente en el desarrollo, la salud y longevidad de la población de abejas de invierno (Genersch *et al.*, 2010). En contraste, la situación en Argentina es muy diferente principalmente debido a que en la mayoría de regiones no hay un período sin cría de abejas

disponible (Marcangeli *et al.*, 1992b). Nueva Zelanda presenta condiciones similares con largas temporadas en que la postura continúa durante todo el invierno (Vetharanim, 2012). El período de tiempo durante el cual las celdas de cría están disponibles ejerce el mayor efecto sobre el crecimiento poblacional del ácaro, por lo tanto la infestación con *Varroa* será más severa en condiciones con largas temporadas de disponibilidad de cría (Wilkinson & Smith, 2002).

Los métodos para detección de *cluster* son las herramientas más comunes para evaluar patrones de distribución espacial no aleatorias (Auchincloss *et al.*, 2012). El uso de métodos de detección local como *Spatial Scan Statistic* que ponen a prueba grupos específicos a pequeña escala, son adecuados dado que el radio de alcance estimado para la propagación de *V. destructor* fue de 19 km (Stevenson *et al.*, 2005).

La distribución espacial de las colmenas con TF se asoció con el porcentaje de *Varroa* antes del tratamiento, independientemente del producto acaricida aplicado. El tratamiento químico *per se* no es suficiente para garantizar que los niveles de *Varroa* se reduzcan convenientemente antes del invierno. Consiguientemente, tanto la prevención de la ocurrencia de altos niveles de *Varroa* a finales del verano como el monitoreo de colmenas después del tratamiento son herramientas clave para mantener una población saludable de abejas invierno. Por otro lado, las colmenas pertenecientes al *cluster* de baja tasa se asociaron con algunas prácticas de manejo recomendadas como la aplicación temprana de algún producto acaricida que se encuentre dentro de un esquema de rotación. Esto apoya la idea de que la influencia de la zona geográfica en la ocurrencia de colmenas con FT se explica mejor por una estrategia de control coordinada, que por un efecto climático directo.

Por el contrario los *cluster* de alta o baja tasa no se asociaron con el recambio de reina a pesar de que ha sido identificado como un factor de riesgo para la ocurrencia de colmenas FT. Posiblemente, no hay una agregación espacial de apicultores que

decidan simultáneamente llevar a cabo la sustitución de las reinas. Ambos *cluster* (alta y baja tasa) incluyen apiarios que recambian y que no recambian la reina en las colmenas. Tal vez, la decisión de llevar a cabo o no el recambio de reinas está restringida por factores económicos particulares y por lo tanto no es posible encontrar un patrón espacial.

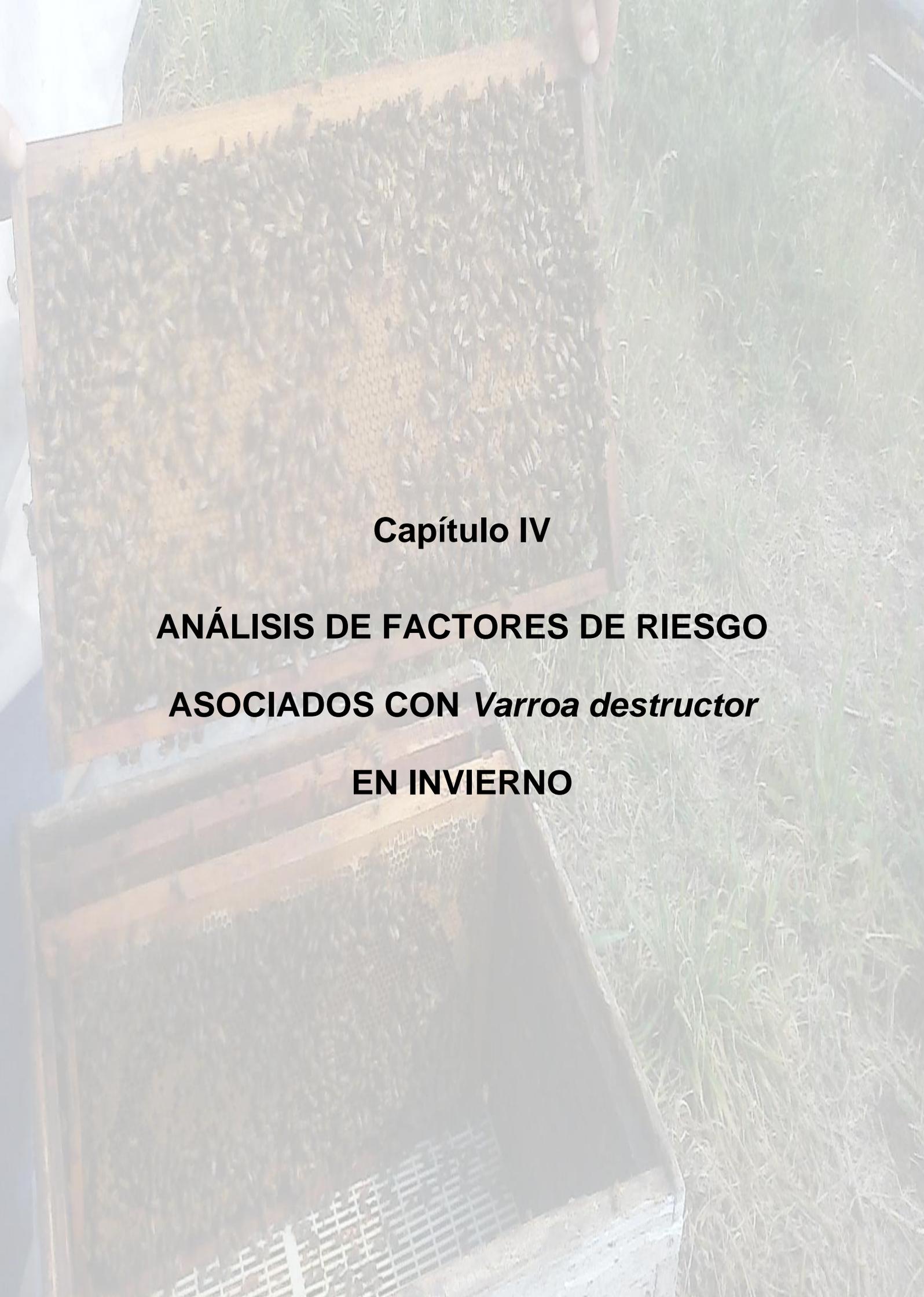
Los factores ambientales pueden actuar indirectamente sobre las poblaciones de *Varroa* (Rosenkranz *et al.*, 2010). La influencia de la zona geográfica sobre los factores de riesgo, como el recambio de reina y el porcentaje de VF antes del tratamiento podría indicar un efecto directo del clima sobre la fertilidad del ácaro (Moretto *et al.*, 1991; Harris *et al.*, 2003). También como se indicó anteriormente, el efecto de la zona pueda deberse a una respuesta regional coordinada de los apicultores en relación con las medidas de control de *Varroa destructor*. Independientemente, la zona geográfica es una variable multifactorial que exige un esfuerzo de investigación constante y reflexivo más allá de los resultados de este estudio.

CONCLUSIONES

- El porcentaje de infestación con *V. destructor* antes del tratamiento y el recambio de reina son factores asociados a la ocurrencia de colmenas con fallas en el control de ácaros durante el otoño.
- La incorporación de prácticas de manejo adecuadas es esencial para mejorar la eficacia global de las estrategias de control aplicadas y por lo tanto para mantener las poblaciones de ácaros en niveles tolerables durante el invierno.
- Mientras que el uso de acaricidas sintéticos sigue siendo la opción preferida en la apicultura comercial, estrategias para el manejo eficiente y adecuado del control químico en las colmenas de *A. mellifera* son primordiales. Las prácticas de manejo que ayudan a evitar fallas en los tratamientos deberían ser incluidas

en la apicultura a nivel global, especialmente en condiciones de clima templado y sin período de corte de postura.

- Las agrupaciones espaciales de colmenas con fallas en el control de ácaros se encuentran asociadas con gran parte de las buenas prácticas de manejo identificadas en este estudio, lo que constituye un aporte central en el estudio epidemiológico de Varroosis.



Capítulo IV

ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO

ASOCIADOS CON *Varroa destructor*

EN INVIERNO

INTRODUCCIÓN

El invierno es una etapa desfavorable para las colmenas de *Apis mellifera* debido a la escasez de néctar y polen, las bajas temperaturas y la reducción en su tamaño poblacional. El impacto negativo se profundiza si la presencia de *Varroa destructor* hacia el final del otoño es elevada, afectando en última instancia a las poblaciones de invierno y de la primavera siguiente (Guzmán Novoa *et al.*, 2010; van Dooremalen *et al.*, 2012).

Varroa destructor es el principal factor de mortalidad invernal de colmenas debido tanto a que provoca una reducción en la vida media de la abeja como a su rol como vector del virus de las alas deformes (DWV por su nombre en inglés), que se replica en los tejidos cuando se producen las abejas de invierno (Dainat *et al.*, 2012). Van Dooremalen *et al.* (2012) encontraron que bajos niveles de infestación con *V. destructor* durante el desarrollo de las abejas de invierno resultan en un aumento de la esperanza de vida en comparación con colmenas que no fueron tratadas y que presentaban altos niveles de infestación. Además, hay una correlación entre los niveles de infestación en otoño y el número de ácaros sobre las abejas en invierno (Korpela *et al.*, 1992), lo que resalta la importancia del control en esta época del año.

La mala aplicación o la ausencia de un tratamiento acaricida puede ser una causa importante de pérdida de colmenas de *A. mellifera* (Currie & Gatién, 2006). Aun cuando los apiarios son tratados, evitar la pérdida de las colmenas durante el invierno depende de un manejo apropiado por parte del apicultor, especialmente con relación a los fenómenos de re-infestación por el “pillaje” de colmenas débiles y por deriva (Sammataro *et al.*, 2000). Comúnmente, las colmenas son alimentadas artificialmente para afrontar este periodo evitando el estrés nutricional (Unger & Poffer, 2012). Además, invernar colmenas fuertes con reinas jóvenes aumenta la probabilidad de que sobrevivan durante el invierno (Genersch *et al.*, 2010; van der Zee *et al.*, 2014).

La disminución en la población y la falta de reservas alimenticias durante el invierno comprometen el tamaño y el desarrollo poblacional de *A. mellifera* en primavera y en verano y consecuentemente la productividad de la colmena (Guzmán-Novoa *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que la presencia de *V. destructor* agrava profundamente esta situación adversa, es preciso mantener controlada la población de ácaros en las colmenas durante el invierno. Esto requiere de estrategias basadas en prácticas de manejo que complementen el control químico aplicado durante el otoño para disminuir el impacto de *Varroa destructor* en la población de primavera.

OBJETIVOS

- Estimar el nivel de infestación con *Varroa destructor* durante invierno en las colmenas de los apiarios de la provincia de Santa Fe.
- Identificar los principales factores asociados a la presencia de *Varroa destructor* durante el invierno en apiarios de la Provincia de Santa Fe.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el invierno de 2013 (hacia finales de julio y principios de agosto) se realizó un monitoreo en 330 colmenas distribuidas en 56 apiarios. En cada uno se tomaron muestras en el 10% de las colmenas o un mínimo de 6 en aquellos apiarios con menos de 60 colmenas. Se relevaron a campo el número de cuadros cubiertos con abejas (CCA), con cría (CCC), con polen (CCP) y con miel (CCM) y se realizó la prueba del frasco, para estimar el porcentaje de *Varroa* en fase forética (la metodología utilizada se detalla en materiales y métodos generales). Se consultó con cada productor apícola o responsable del apiario el tipo de jarabe utilizado para alimentar las colmenas durante el otoño y la producción promedio en Kg/colmena durante la última cosecha (Anexo 4).

Se utilizaron los datos de campo de las dos etapas de muestreo anteriores (anterior y posterior al tratamiento acaricida de otoño) para establecer el grado de asociación de la fortaleza de la colmena y los niveles de *Varroa* en otoño con el porcentaje de parasitación durante el invierno mediante correlación de Spearman. Además, se identificaron los factores de manejo (derivados de las dos encuestas aplicadas previamente) asociados a los niveles de *Varroa* en invierno mediante un análisis bivariado (Mann Whitney y Kruskal Wallis). Del total de colmenas monitoreadas, se utilizaron los datos provenientes de 280 distribuidas en 48 apiarios, las cuales presentaban datos completos en las etapas de monitoreo anteriores.

Las variables asociadas ($P < 0,15$) con el porcentaje de parasitación con *Varroa* en Invierno y que no mostraron una correlación significativa entre sí (colinealidad) fueron incluidas en un modelo lineal generalizado mixto (MLGM), con la variable apiario como factor aleatorio, distribución Normal y función de vínculo Identidad. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con software R (versión 2.15.3).

RESULTADOS

La parasitación con *Varroa destructor* durante el invierno fue de $0,74 \pm 2,06\%$ de VF y la producción promedio de miel para el otoño 2013 fue de $16,27 \pm 9,96$ kg de miel por colmena. La producción de miel varió de acuerdo a la zona geográfica ($P < 0,0001$). La mayor producción se registró en el centro ($18,06 \pm 0,77$ kg/colmena), seguida por la costa (17 kg/colmena) y el sur ($14,37 \pm 0,53$ kg/colmena) y por último la zona norte ($10,37 \pm 1,13$ kg/colmena). En promedio las colmenas presentaban $6,37 \pm 1,69$ CCA y $2,08 \pm 1,51$ CCC.

Se analizaron en total 26 variables considerando los porcentajes de parasitación con *Varroa* previo y posterior al tratamiento acaricida, la fortaleza de la colmena durante el otoño (Tabla 4.1) y los factores de manejo frecuentemente aplicados en el apiario (Tabla 4.2).

Tabla 4.1 Asociación de variables generales del apiario, fortaleza de la colmena y parasitación con *Varroa* en otoño con el porcentaje de *Varroa destructor* durante el invierno en colmenas de la provincia de Santa Fe.

	Variable	N	Coefficiente de correlación*	P-valor
Datos generales	Antigüedad en apicultura	275	-0,004	0,954
	Tamaño de apiario	280	-0,105	0,078
Pre-tratamiento	Población abejas	280	-0,032	0,592
	Cría operculada	280	-0,175	0,003
	Polen	280	-0,011	0,858
	Miel	280	-0,042	0,488
	Parasitación con <i>Varroa</i>	280	-0,007	0,902
Post-tratamiento	Población abejas	279	-0,066	0,275
	Cría operculada	279	0,091	0,129
	Polen	279	0,154	0,01
	Miel	279	-0,018	0,765
	Parasitación con <i>Varroa</i>	280	0,152	0,011

*Correlación de Spearman

Las variables continuas tamaño del apiario, la cantidad de cría operculada pre-tratamiento y post-tratamiento, polen y parasitación con *Varroa* post-tratamiento presentaron coeficientes de correlación muy bajos a pesar de la significancia, la cual está probablemente influida por el tamaño de la muestra. Por lo tanto, las variables continuas que resultaron significativas en este análisis (Tabla 4.1) fueron categorizadas según se indica en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Asociación de los factores de manejo y categorías de fortaleza de la colmenas durante el otoño con el porcentaje de *Varroa destructor* durante el invierno en colmenas de la provincia de Santa Fe.

Variable	Niveles de la variable	% Infestación invierno (Media+DS)	P-valor*
Parasitación con Varroa post-tratamiento	≤ 1% VF	0,54 ± 1,40	0,066
	>1% VF	2,32 ± 4,15	
Cría operculada pre-tratamiento	≤ 3 cuadros	0,83 ± 2,21	0,669
	4 y 5 cuadros	1,12 ± 2,68	
	> 5 cuadros	0,42 ± 1,07	
Cría operculada post-tratamiento	< 1 cuadro	0,75 ± 2,26	0,341
	1 y 2 cuadros	0,83 ± 2,08	
	> 2 cuadros	0,99 ± 2,36	
Polen post-tratamiento	≤ 1 cuadro	0,76 ± 1,99	0,538
	> 1 cuadro	1,71 ± 3,88	
Tamaño Apiario	≤ 30 colmenas	1,02 ± 2,69	0,436
	31 y 50 colmenas	0,91 ± 2,39	
	> 50 colmenas	0,54 ± 1,11	
Zona	Norte	1,13 ± 2,68	<0,0001
	Centro	0,95 ± 2,09	
	Sur	0,49 ± 2,18	
	Costa	0,00 ± 0	
Carbohidrato	No usa- usa miel quemada	3,57 ± 4,57	0,018
	Jarabe de azúcar	0,68 ± 1,98	
	JMAF	1,97 ± 1,81	
Suplemento polen	No usa-usa torta	0,83 ± 2,26	0,112
	Polen	0,85 ± 1,30	
Recambio de reina	No	0,71 ± 2,05	0,018**

	Si	0,89 ± 2,26	
	No	0,71 ± 2,04	
Frecuencia de recambio	Todos los años	0,54 ± 2,15	<0,0001
	Cada dos años	0,89 ± 1,90	
	Más de dos años	1,57 ± 3,3	
Porcentaje de recambio	≤ 50%	0,84 ± 2,27	0,768
	> 50%	0,71 ± 1,41	
Núcleos	No	0,51 ± 1,30	0,22
	Si	0,88 ± 2,31	
Recambia cuadros viejos	≤ 3 cuadros/colmena	0,85 ± 2,26	0,573
	> 3 cuadros/colmena	0,56 ± 1,29	
Desinfecta material	No	0,99 ± 2,48	0,185
	Si	0,73 ± 2,00	
Monitoreo previo al tratamiento	No	0,14 ± 0,24	0,024
	Si	0,92 ± 2,31	
Monitoreo posterior al tratamiento	No	0,59 ± 2,43	0,246
	Si	0,89 ± 2,13	
Principio activo de tratamiento de otoño	Amitraz	0,18 ± 0,39	<0,0001
	Cumafós	0,07 ± 0,16	
	Flumetrina	1,06 ± 2,48	
Tratamiento de otoño fecha	Febrero-marzo	0,77 ± 2,07	0,769
	Abril-mayo	1,39 ± 3,12	
Apiarios cercanos	No	0,86 ± 2,75	0,863
	Si	0,85 ± 2,10	

*Mann Whitney / Kruskal Wallis

**Colinealidad con Frecuencia de Recambio

Aquellos factores seleccionados ($P < 0,15$) según el análisis bivariado y chequeados para colinealidad, fueron incluidos en el MLGM final (Tabla 4.3). El modelo ajustado

indicó que la parasitación posterior al tratamiento acaricida y la alimentación de las colmenas con alguna fuente de hidrato de carbono durante el otoño fueron los principales factores asociados al porcentaje de parasitación con *Varroa destructor* en el invierno.

Tabla 4.3 Modelo lineal generalizado mixto para factores asociados con el porcentaje de *Varroa destructor* en colmenas de *Apis mellifera* durante el invierno en la provincia de Santa Fe.

Efectos fijos		F	gl	P-valor
Parasitación con <i>Varroa</i> post-tratamiento		20,520	1	<0,0001
Zona		0,169	3	0,918
Carbohidrato		3,323	2	0,038
Suplemento polen		1,189	1	0,276
Frecuencia de recambio		1,865	3	0,136
Monitoreo previo al tratamiento		3,748	1	0,054
Principio activo de tratamiento de otoño		0,792	2	0,454

Efecto aleatorio	Estimación	E.E	Z	Valor P	Intervalo de Confianza 95%	
					LI	LS
Apiario (Varianza)	3,046	0,284	10,715	<0,001	2,537	3,658

gl: grados de libertad

AIC: 1137,415 BIC: 1144,536

La parasitación de las colmenas durante el otoño influyó significativamente en los niveles de parasitación registrados durante el invierno. Colmenas que presentaron menos de 1% en post-tratamiento tuvieron en promedio $0,5 \pm 0,73\%$ durante el invierno mientras que aquellas que presentaban 1% o más luego del control de *Varroa* tuvieron en promedio $2,27 \pm 0,79\%$ en el invierno (Figura 4.1).

Por otro lado, aquellas colmenas que recibieron algún tipo de alimentación con carbohidratos durante el otoño presentaron en promedio menores porcentajes de parasitación durante el invierno independientemente de la fuente (Jarabe de azúcar: $0,242 \pm 0,56\%$ VF y JMAF: $1,12 \pm 1,02\%$ VF; $P= 0,254$). Por el contrario, las colmenas que no fueron alimentadas o se alimentaron con miel quemada tuvieron porcentajes significativamente superiores ($2,78 \pm 1,2\%$ VF; $P= 0,02$).

El efecto de los factores seleccionados en el análisis bivariado que no resultaron asociados en el modelo multivariado final estuvo confundido por alguno de los factores principales identificados en el modelo (Figura 4.2).

Con relación a la alimentación con carbohidratos, todos los apiarios ubicados en las zonas centro, sur y costa recibieron algún tipo de carbohidrato mientras que el 23% de las colmenas del norte no recibieron alimentación o fueron alimentadas con miel quemada ($\chi^2= 72,22$; $P= 0,017$). Además, todos los apicultores que realizaron recambio anual de reinas o lo hicieron cada dos años, alimentaron las colmenas con alguna fuente de carbohidrato. Por el contrario, el 12% de los apiarios donde no se recambia la reina tampoco se alimentó las colmenas o lo hizo con miel quemada ($\chi^2= 36,99$; $P< 0,0001$).

El 45% de los apiarios que recibieron miel quemada o no recibieron carbohidrato y que al mismo fueron suplementadas con torta o no recibieron suplemento proteico, superaron el 1% de infestación con *Varroa destructor* en el invierno. Por otro lado, solo el 13,3% y el 26,3% de los apiarios que recibieron JS y JMAF superaron el umbral y el 25% que recibió JS fue suplementado con polen ($\chi^2= 10,01$; $P= 0,007$). Con respecto a la parasitación posterior al tratamiento de otoño, solo el 14% de colmenas que son frecuentemente monitoreadas antes de la aplicación de un acaricida presentaron 1% o más de parasitación con *Varroa* post-tratamiento, en comparación con el 31,3% con más de 1% alcanzado por aquellas que no son monitoreadas ($\chi^2= 6,17$; $P= 0,02$).

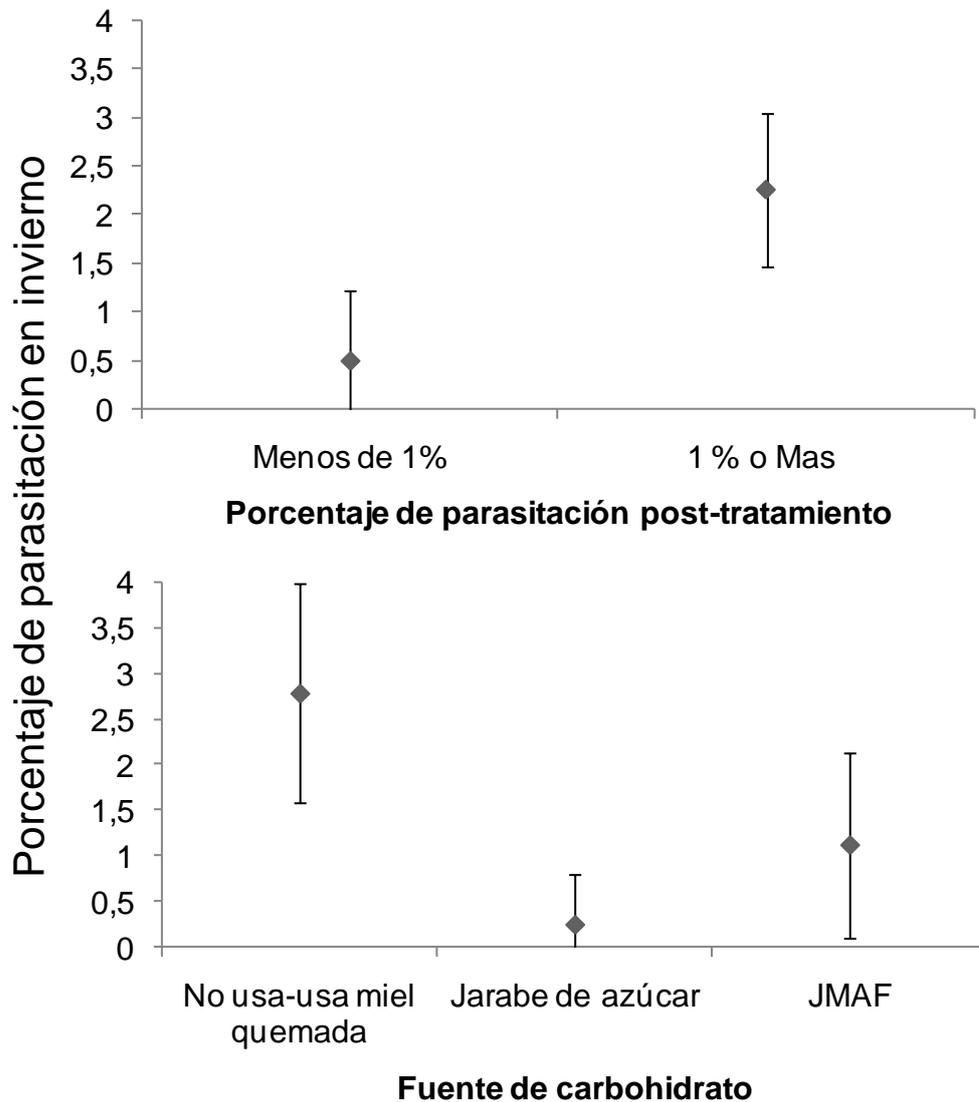


Figura 4.1 Efecto de la parasitación post-tratamiento acaricida y la alimentación con hidratos de carbono sobre la parasitación con *Varroa destructor* durante el invierno en colmenas de la provincia de Santa Fe.

Del total de colmenas que fueron tratadas con cumafós, el 63,6% alcanzó valores de infestación del ácaro superiores al 1%, mientras que sólo el 4,2% y el 13,8% lo hicieron cuando se aplicó amitraz o flumetrina respectivamente ($\chi^2=42,74$; $P< 0,0001$).

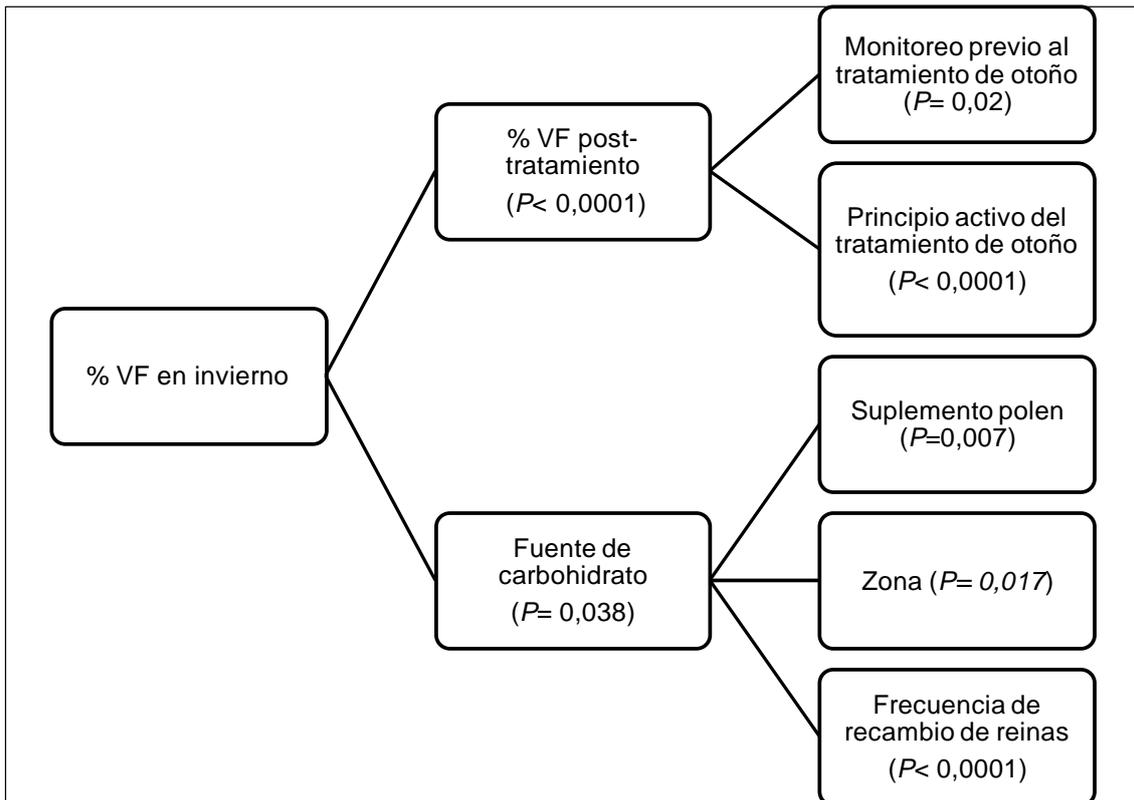


Figura 4.2 Factores de confusión. Asociación entre las variables seleccionadas en el análisis bivariado y los factores principales identificados el modelo multivariado final.

DISCUSIÓN

La parasitación con *Varroa destructor* durante el invierno no superó, en promedio, el umbral de 1% de VF establecido para el post-tratamiento (Giacobino *et al.*, 2015). Esto implicaría que bajo ciertas condiciones se pueden mantener las poblaciones del ácaro bajo control durante esta etapa desfavorable para las colmenas. Sin embargo, el rango de variación del porcentaje de infestación entre los apiarios indica que ciertas prácticas de manejo o condiciones de la población de abejas pueden llevar a que las colmenas atraviesen el invierno con altos porcentajes de VF. Entre ellos, se identificaron la falla en el control de *Varroa* durante la etapa post-tratamiento (colmenas con >1% de VF) y la falta de alimentación con fuentes de carbohidratos, como factores principales que explicaron el aumento de las poblaciones del parásito durante el invierno.

El porcentaje de VF remanente en las colmenas luego del tratamiento de otoño es la base de la próxima población de Varroa en las colmenas (Charriere & Imdorf, 2002). La población de ácaros que sobrevive al tratamiento de otoño, se verá afectada durante la temporada invernal por una disminución en su reproducción debido al corte definido de la postura de cría de abejas (Martin, 2001; Vetharaniem, 2012). Contrariamente a lo esperado, los apiarios de la provincia de Santa Fe presentaron en promedio dos cuadros con cría operculada durante el invierno. La interrupción en la postura de cría durante el invierno desacelera el crecimiento de la población de Varroa en regiones templadas, pero en climas más cálidos o temporadas atípicas, las colmenas pueden ser destruidas en cuestión de meses (Sammataro *et al.*, 2000). La disponibilidad de cría combinada con porcentajes de VF superiores al 1% post-tratamiento pueden favorecer el crecimiento de la población de Varroa en las colmenas durante el invierno. Estos resultados refuerzan la importancia de comprobar la eficacia de la estrategia de control utilizada durante el otoño, realizando un monitoreo luego de la aplicación de un producto acaricida y considerando los umbrales post-tratamiento (Boecking & Genersch, 2008).

Un segundo factor identificado fue la alimentación de las colmenas con carbohidratos durante el otoño. Independientemente de la fuente utilizada, los porcentajes de parasitación fueron menores en aquellas colmenas que recibieron suplementación con carbohidratos. Los niveles de parasitación más altos en colmenas no alimentadas probablemente se deba al impacto negativo que la deficiencia nutricional tiene sobre las colmenas (Brodschneider & Crailsheim, 2010). El stress nutricional favorece la transmisión de parásitos, mediante cambios en el comportamiento, dado que la escasez de alimentos induce a las obreras jóvenes a iniciar prematuramente la actividad de forrajeo (Schulz *et al.*, 1998).

La relación entre los niveles de parasitación con Varroa y el manejo de colmenas en la producción apícola es un fenómeno complejo que incluye factores antrópicos,

biológicos y ambientales. El efecto significativo del factor “apiario” en el modelo multivariado refleja en parte esa complejidad. Además, muchas de las variables analizadas resultaron no tener un efecto directo sobre la parasitación invernal pero sí estar asociadas con los factores principales identificados, lo que es una clara expresión de dicha complejidad.

Muchas prácticas en apicultura están muy influenciadas por factores regionales (van der Zee *et al.*, 2014) y socio-económicos (Vanbergen *et al.*, 2014). La relación establecida entre la variable zona y la parasitación de invierno se explica más por un efecto de manejo que por influencia ambiental, dado que la alimentación con carbohidratos no fue igual a lo largo de toda la región. En la zona norte se registraron apiarios que no recibieron jarabe o recibieron solo miel quemada. Se denomina miel quemada a los restos de miel recolectados después de fundir el opérculo de cera de los panales durante el proceso de extracción de la miel que se comercializa. No se recomienda alimentar con miel quemada debido a que los azúcares estuvieron expuestos a altas temperaturas y pueden resultar tóxicos para las abejas (Unger & Poffer, 2012) y porque el uso de miel promueve la transmisión de enfermedades (Protocolo Nacional de calidad de miel, 2005).

En general hay apicultores que manejan sus apiarios de manera uniforme con relación a la aplicación conjunta de prácticas recomendadas (Giacobino *et al.*, 2014). Este estudio refleja que una gran proporción de apicultores que alimentan sus colmenas también recambian frecuentemente las reinas y utilizan polen como suplemento proteico. Muchas de las causas de pérdida de colmenas identificadas por los propios apicultores están directamente asociadas a las estrategias de manejo implementadas en el apiario (vanEngelsdorp *et al.*, 2012a). Los principales factores comúnmente señalados como responsables son: fallas en la reina, falta de alimentación, *Varroa destructor* y colmenas débiles durante el otoño (vanEngelsdorp *et al.*, 2008; 2010; 2012a; Spleen *et al.*, 2013).

El estado nutricional de las colmenas, conjuntamente con la presencia de una reina joven, probablemente determine que esas colmenas se encuentren mejor preparadas para soportar el invierno y consecuentemente los efectos negativos de *Varroa*. En condiciones ambientales extremadamente adversas el desarrollo de las colmenas puede ser limitado a pesar de alimentación con carbohidratos (Ruiz Martínez & Gutiérrez Tirado, 2012). En este sentido, si las colmenas pasan demasiado tiempo en condiciones de bajo nivel nutricional, sumado al impacto negativo de *Varroa*, tomará mucho tiempo para recuperarse en la primavera y aprovechar los recursos disponibles en la próxima temporada (Somerville, 2000).

Este estudio mostró que un bajo porcentaje de los apicultores que habitualmente realizan un monitoreo de sus colmenas antes de aplicar un tratamiento acaricida presentan altos valores de VF al finalizar dicho tratamiento. El monitoreo pre-tratamiento debería ser considerado como una herramienta útil para tomar una decisión de manejo apropiado en un contexto de control basado en MIP (Ruffinengo *et al.*, 2014). Es probable que si un productor monitorea sus colmenas antes de aplicar un tratamiento y los resultados indican altos niveles de parasitación decida aplicar una acaricida de síntesis dado que son asociados con una mayor eficacia (Marcangeli *et al.*, 2005). Los apicultores que participaron de este monitoreo forman o formaron parte de grupos asesorados por técnicos apícolas de INTA y si bien no adhieren completamente a un sistema de MIP, tienden en muchos casos a tomar decisiones de manejo basadas en los resultados del monitoreo pre-tratamiento.

Por otro lado, valores de *Varroa* superiores al 1% post-tratamiento estuvieron asociados al principio activo utilizado en el control. La eficacia de los productos depende entre otras cosas del principio activo utilizado. Momentáneamente no se recomienda el uso de cumafós en ciertas zonas de Argentina dado que existen reportes de casos de poblaciones resistentes (Maggi *et al.*, 2008). Incluso en poblaciones que resultaron susceptibles al principio activo, el porcentaje de mortalidad

del ácaro es menor cuando se utiliza cumafós en comparación con flumetrina o amitraz (ver capítulo 7 de esta tesis). Si bien la resistencia no es la única causa, es una de las principales razones de la disminución de la eficacia de los productos disponibles (Schmidt *et al.*, 2008; Ruffinengo *et al.*, 2014). Independientemente del motivo de la falla, el uso de cumafós aumentó la probabilidad de que las colmenas alcancen valores superiores al 1% post-tratamiento y consecuentemente presenten altos valores de parasitación durante el invierno.

CONCLUSIONES

- El porcentaje de infestación con *Varroa destructor* en las colmenas de la provincia de Santa Fe durante el invierno fue, en promedio, inferior a los umbrales establecidos para esta estación del año.
- Los principales factores asociados al porcentaje de parasitación con *Varroa destructor* durante el invierno son la presencia de colmenas con >1% de VF post-tratamiento y la falta de alimentación con fuentes de carbohidratos durante el otoño.
- Existe una asociación entre ciertas prácticas de manejo como la suplementación nutricional y el recambio de reinas con la zona geográfica, que en conjunto influyen sobre el grado de infestación de las colmenas durante el invierno.
- El monitoreo de colmenas y el uso de ciertos principios activos durante el otoño afectan el porcentaje de *Varroa destructor* post-tratamiento acaricida e indirectamente los niveles de parasitación de las colmenas en invierno.

Capitulo V

ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO

ASOCIADOS CON *Varroa destructor*

AL INICIO DE LA TEMPORADA

PRODUCTIVA



INTRODUCCIÓN

El manejo de las poblaciones de *Varroa destructor* ha aumentado los costos de producción de los apiarios dada la necesidad de aplicar ciertos productos de control (Rosenkranz *et al.*, 2010). Asimismo, los ácaros afectan indirectamente la rentabilidad de los apicultores dado el costo necesario para reemplazar las colmenas perdidas a causa de su presencia (VanEngelsdorp & Meixner, 2010).

En la producción apícola, el inicio de una nueva temporada productiva es una etapa clave, determinada principalmente por el flujo de néctar y las condiciones climáticas. Es un punto crítico tanto desde el punto de vista sanitario como productivo. Por un lado, los tratamientos con productos orgánicos al finalizar el invierno desaceleran el crecimiento de la población de *V. destructor* durante el verano y permiten mantener los niveles de infestación por debajo de los umbrales de daño durante el siguiente otoño (Giovenazzo & Dubreuil, 2011). Además, niveles relativamente bajos de *Varroa* durante la primavera pueden tener un impacto económico considerable en la producción de miel (Currie & Gatién, 2006). Las colmenas que presentan porcentajes de parasitación con *Varroa* mayores al 2 % (2 ácaros cada 100 abejas) durante la primavera deberían ser tratadas para evitar pérdidas significativas (Currie & Gatién, 2006). Es importante efectuar un buen control previo al inicio del flujo de néctar y polen dado que las grandes cantidades de cría de abeja en la colmena durante el verano proveerán condiciones ideales para el desarrollo del ácaro. No hacerlo puede resultar en colmenas que colapsen antes del tratamiento de otoño (Goodwin & Van Eaton, 2001).

Conjuntamente con los tratamientos de otoño y primavera, existen otras prácticas de manejo que directa o indirectamente afectan los porcentajes de infestación con *V. destructor* (Boecking & Genersch, 2008; Giacobino *et al.*, 2014). El recambio periódico de reinas es una actividad fundamental en la apicultura profesional para mantener colmenas fuertes, sanas y productivas (Invernizzi *et al.*, 2006).

La adopción de tecnología depende en parte de aspectos socio-económicos y culturales como la antigüedad de los apicultores en la actividad y el total de colmenas que manejan (Kim *et al.*, 2006). Tanto el uso de acaricidas aprobados por SENASA como el recambio sistemático de reinas pueden ser considerados como tecnología disponible para aumentar la producción de miel y mejorar las condiciones sanitarias. Sin embargo, Feder *et al.* 1985 (en Kim *et al.*, 2006) mencionan la influencia que tienen los costos de adopción, capital humano y acceso a créditos sobre la relación que existe entre la adopción de tecnología y el tamaño “del establecimiento”. La actitud de los apicultores hacia la “nueva tecnología” puede diferir dependiendo también de si son apicultores comerciales o productores que consideran la apicultura como actividad secundaria (Kim *et al.*, 2006).

La alimentación con carbohidratos y la suplementación proteica permiten asegurar un buen estado nutricional en las colmenas cuando los recursos disponibles no son suficientes (Brodschneider & Crailsheim, 2010). El efecto del parasitismo sobre las pupas de *A. mellifera* es en parte compensado si la disponibilidad de polen es buena durante el desarrollo de la cría (Janmaat & Winston, 2000). La salud de una colmena no solo se define por la ausencia de enfermedades sino también por la presencia de individuos bien nutridos capaces de reproducirse y de resistir a factores de estrés como la presencia de *Varroa* (Brodschneider & Crailsheim, 2010).

La temperatura y la humedad tienen un efecto directo sobre el crecimiento de la población de ácaros (Harris *et al.*, 2003). Consecuentemente, el tamaño poblacional de *Varroa* al inicio de la temporada puede estar influenciado por la combinación de condiciones climáticas (Le conte *et al.*, 2010) y alimento disponible característico de una zona o región. En aquellos sitios donde los recursos florales y la disponibilidad de cría de abejas están presentes todo el año, o los inviernos son extremadamente cortos, las poblaciones de *Varroa* pueden crecer mucho más rápido en comparación con regiones donde hay un corte total de postura (Calis *et al.*, 1999). Múltiples

características del ambiente en el que están ubicados los apiarios delimitarán zonas de acuerdo con la actividad productiva predominante (zonas agroecológicas), incluyendo la reducción de biodiversidad y el uso de agroquímicos (van der Zee *et al.*, 2014).

Este conjunto de factores determina la distribución de colmenas con mayor o menor desarrollo de la población de Varroa en el espacio y en el tiempo. El estudio de los factores que explican posibles agrupaciones de una enfermedad es fundamental para el conocimiento de la epidemiología (Pfeiffer *et al.*, 2008). La identificación y el reporte de áreas con mayor incidencia aparente se denomina alarma de *cluster* de enfermedad (*disease cluster alarm*). Permite determinar la localización y características que presentan estas agrupaciones o *cluster* y aportan información acerca de las condiciones que resultan favorables para el desarrollo y dispersión de la enfermedad.

El desarrollo de la población de Varroa debe verse limitado durante toda la temporada como parte de la actividad habitual del apicultor (Boecking & Genersch, 2008). Una baja infestación en primavera podría reflejar el uso exitoso de un acaricida antes o durante el invierno (Ward *et al.*, 2008). Controlar la evolución del porcentaje de parasitación a lo largo del año y especialmente la parasitación durante el invierno puede ser crucial para evitar un crecimiento exponencial de las poblaciones de Varroa durante la primavera y el verano (Charriere & Imdorf, 2002).

Dado el esquema complejo de factores que afectan la presencia de *V. destructor* en primavera, resulta indispensable abordar la problemática desde un enfoque epidemiológico. Un estudio longitudinal es aquel en el que un mismo individuo es observado en más de una ocasión (Cook & Ware, 1983), cuya base es la experiencia de la población a lo largo del tiempo (Delgado Rodríguez & Llorea Díaz, 2004). Dentro de la familia de estudios longitudinales, los modelos de transición realizan una

regresión del resultado presente sobre valores pasados y sobre las exposiciones pasadas y presentes (Delgado Rodríguez & Llorea Díaz, 2004). Este tipo de estudio permite asociar el porcentaje de parasitación registrado en las colmenas al inicio de temporada con los porcentajes de parasitación registrados previamente sobre las mismas colmenas y relacionarlos también con la exposición a distintas variables ambientales y de manejo.

El monitoreo sistemático de las colmenas y la implementación de prácticas de manejo en combinación con los tratamientos acaricidas que tiendan a disminuir la presencia de *V. destructor* en las colmenas permitirá reducir el impacto de la parasitación durante las etapas clave del ciclo productivo.

OBJETIVOS

- Estimar la prevalencia de colmenas con valores superiores al 2% de infestación con *Varroa destructor* al inicio de la temporada productiva en los apiarios de la provincia de Santa Fe.
- Identificar los factores de riesgo asociados a la presencia de *Varroa destructor* al inicio de la temporada productiva en apiarios de la Provincia de Santa Fe.
- Identificar patrones de agrupamiento espacio-temporal de colmenas con niveles de parasitación que superen los umbrales de daño establecidos para las diferentes etapas del ciclo productivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el inicio de temporada de producción de miel 2013-2014 (primavera 2013) se realizó un monitoreo en 330 colmenas distribuidas en 56 apiarios. En cada uno se muestreó el 10 % de las colmenas o un mínimo de 6 en aquellos con menos de 60 colmenas. Las muestras fueron tomadas entre septiembre y diciembre de 2013. Se relevaron a campo el número de cuadros cubiertos con abejas (CCA), con cría (CCC),

con polen (CCP) y con miel (CCM) y se realizó la prueba del frasco para estimar el porcentaje de varroa en fase forética (ver metodología detallada en materiales y métodos generales). Se completó, junto con el productor apícola o el responsable del apiario, una encuesta sobre las prácticas de manejo asociadas con esta etapa del ciclo productivo (Anexo 5).

Para el análisis longitudinal, del total de colmenas monitoreadas al inicio de la temporada se tomaron solamente aquellas que presentaban datos de campo y encuestas completas correspondientes a las tres etapas de muestreo anteriores (anterior y posterior al tratamiento acaricida de otoño y durante el invierno). En total se analizaron 280 colmenas distribuidas en 48 apiarios. Las colmenas evaluadas en primavera fueron clasificadas en dos grupos empleando como valor umbral el porcentaje de infestación con Varroa del 2% que fuera propuesto por Currie & Gatién (2006). De aquí en adelante nos referiremos a la proporción de colmenas que presentaron un porcentaje de infestación $\geq 2\%$ en primavera como prevalencia de colmenas $\geq 2\%$.

Mediante un análisis bivariado (Chi-cuadrado) se identificaron aquellas variables asociadas con la variable de respuesta binaria ($\geq 2\%$; $< 2\%$) y que no mostraron una correlación significativa entre sí (colinealidad) (Tabla 5.1). Las variables analizadas fueron los factores de manejo (derivados de las cuatro encuestas aplicadas) y la fortaleza de la colmena y parasitación con Varroa registrada previamente durante el año (derivadas de los tres monitoreos a campo anteriores). Una vez identificadas y seleccionadas las variables, aquellas que presentaron un valor de $P < 0,15$ fueron incluidas en un modelo lineal generalizado mixto (MLGM), con la variable apiario como factor aleatorio, distribución Binomial y función de vínculo logit. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con software R (versión 2.15.3).

Análisis espacio-temporal

Los registros de parasitación con *Varroa* de todas las colmenas con datos disponibles en los cuatro monitoreos fueron utilizados para analizar la distribución espacio-temporal de la enfermedad. Se clasificaron como “casos” aquellas colmenas que habían superado el umbral establecido para cada etapa y se asumió una distribución de Bernoulli en todas ellas. De esta manera, se clasificaron como casos las colmenas con >3% en la etapa pre-tratamiento, >1% en post-tratamiento e invierno y >2% en primavera. El set completo de datos fue escaneado para determinar agrupaciones de colmenas que presentaran mayor o menor probabilidad de superar los umbrales de daño a lo largo del año utilizando el método de detección de *cluster* local *Space-time Scan Statistics* retrospectivo. El análisis es definido por una ventana cilíndrica con base circular geográfica y altura correspondiente al tiempo. La base con radio variable es centrada alrededor de uno de los múltiples centroides posibles ubicados a lo largo de la región de estudio. La ventana se mueve en tiempo y espacio de manera que para cada posible localización y tamaño, también visita cada intervalo de tiempo. De esta manera se obtiene un infinito número de cilindros solapados de diferente tamaño y forma que en conjunto cubren toda el área de estudio (Kulldorff *et al.*, 1998). Se calculó la razón de verosimilitud para cada agrupación o *cluster* propuesto, con límite superior de escaneo fijado sobre el 50% del total de la población analizada y el 50% del periodo de estudio. El análisis espacio-temporal fue realizado utilizando el software SaTScan versión 9.2 (www.satscan.org).

RESULTADOS

El porcentaje promedio de parasitación al inicio de la temporada fue de $0,93\% \pm 2,07\%$. El promedio de CCA y CCC fueron $10,49 \pm 4,89$ y $6,50 \pm 2,38$, respectivamente. En la cámara de cría las colmenas presentaron en promedio $0,96 \pm 0,57$ CCP y $3,26 \pm 3,82$ CCM. La prevalencia de colmenas con valores de infestación \geq

2% fue de 16,8%. Un total de 32 apiarios (67%) fueron tratados contra Varroa durante o al finalizar el invierno.

Tabla 5.1 Factores de manejo y condiciones de la colmena asociados al porcentaje de parasitación con Varroa durante el inicio de temporada 2013-2014 evaluados en 280 colmenas distribuidas en 48 apiarios de la provincia de Santa Fe.

Factores de manejo	Niveles de la variable	Casos^a por categoría (%)	P-Valor (χ^2)
Población abejas pre-tratamiento otoño	Menos 8 cuadros	31	0,003
	8 cuadros o más	13,1	
Polen en colmena pre-tratamiento otoño	Hasta 1 cuadro	17,5	0,119
	Más de 1 cuadro	13	
Celda de cría post-tratamiento otoño	Menos de 1 cuadro	27	0,003
	1 o 2 cuadros	11,5	
	Más de 2 cuadros	10	
Celda de cría invierno	Menos de 1 cuadro	11,7	0,015
	1 o 2 cuadros	12	
	Más de 2 cuadros	25,2	
Zona	Norte	42,6	<0,0001*
	Centro	15,7	
	Sur	4,4	
	Costa	0	
Parasitación pre-tratamiento otoño	Menos de 3%	14,1	0,265
	3% o más	19,3	
Parasitación post-tratamiento otoño	Menos de 1%	17,4	0,664
	1% o más	13,3	
Parasitación invierno	Menos de 1%	14,5	0,02
	1% o más	28,3	
Antigüedad en apicultura	Hasta 10 años	25	<0,0001
	Más de 10 años	8,9	

Tamaño de apiario	Variable continua	-----	0,722
Suplemento proteico	No	20,3	0,108
	Si	12,6	
Tipo de suplemento proteico	No usa o usa torta	17,2	0,776
	Usa polen	12,5	
Suplemento de Carbohidrato	No usa o miel quemada	36,4	0,172
	Jarabe de Azúcar	15,6	
	JMAF	21,1	
Recambio de Reinas	No	27,2	0,002
	Si	11,7	
Porcentaje de Recambio	Hasta el 50 %	15,9	0,293
	Más del 50%	24,1	
Realiza Núcleos	No	34,9	0,001
	Si	13,5	
Recambia cuadros	Hasta 3 cuadros	17,5	0,273
	Más de 3 cuadros	7,7	
Desinfecta material inerte	No	11,4	0,07
	Si	20	
Monitoreo previo al tratamiento otoño	No	3,1	0,024
	Si	18,5	
Monitoreo posterior al tratamiento otoño	No	24,1	0,154
	Si	15	
Producto de tratamiento otoño	Amivar	7,1	0,05*
	Asuntol	0	
	Amitráz casero	0	
	Cumafós	0	
	Cumavar	0	
Droga de tratamiento otoño	Flumevar	21	0,004*
	Amitraz	6,3	
	Cumafós	0	

	Flumetrina	21	
Fecha de tratamiento otoño	Feb./mar.	16,9	0,995
	Abr./may.	16,1	
Tratamiento en invierno	No	30,4	<0,0001
	Si	10,2	
Fecha de tratamiento invierno	No trata	30,4	<0,0001***
	Julio/agosto	5,8	
	Septiembre	19,1	
Producto de tratamiento en invierno	No trata	31,3	<0,0001**
	Sintéticos	3,9	
	Orgánicos	12,5	
Apiarios Cercanos	No	4,4	0,01
	Si	19,7	
Fecha de Monitoreo en Inicio de temporada	Ago./sept.	4,3	<0,0001
	Nov./dic.	29,7	

^aCasos: colmenas $\geq 2\%$ de infestación con Varroa en inicio de primavera

* Presentan niveles con 0 casos.

**Tiene 3 categorías, pero algunos presentan valores menores a 4.

***Presenta muchos casilleros sin datos y no mejora los indicadores de ajuste del modelo.

De acuerdo con las variables que fueron significativas en el análisis bivariado ($P < 0,15$) se ajustó un MLGM, con la variable apiario como factor aleatorio, distribución Binomial y función de vinculo logit (Tabla 5.2). Aquellas variables que presentaron niveles con 0 casos o presentaron muchos casilleros sin datos no fueron considerados en la selección. De la misma manera, variables con menos de cuatro casos y más de dos categorías, para los cuales no es posible hacer el Test de Fisher, también fueron excluidos del modelo final aun cuando en el análisis bivariado resultaron significativos.

Tabla 5.2. Modelo lineal generalizado mixto (MLGM) ajustado para el porcentaje de parasitación con *Varroa* al inicio de la temporada 2013-2014 en 280 colmenas distribuidas en 48 apiarios de la provincia de Santa Fe.

AIC	BIC	Loglik	Deviance		
203.2963	279.6269	-80.6482	161.2963		
Efecto Aleatorio		Varianza	Desvío Standard		
apiario (Intercept)		1.072	1.149		
Efectos Fijos	Nivel	Exp (Beta)	IC 95%		Pr(> z)
Ordenada		0,004654	0,000020	1,108980	0.05449
Población abejas pre-tratamiento otoño	8 cuadros o más	0,650594	0,151806	2,788232	0,56262
Celda de cría invierno	Menos de 1	0,203881	0,029366	1,415503	0,10773
Celda de cría invierno	1 o 2 cuadros	0,856706	0,257639	2,848743	0,80082
Celda de cría post- tratamiento otoño	Menos de 1	0,911403	0,145747	5,699293	0,92099
Celda de cría post- tratamiento otoño	1 y 2	0,496114	0,108016	2,278625	0,36750
Polen en colmena pre-tratamiento otoño	Hasta 1	0,775490	0,211406	2,844710	0,70141
Antigüedad en apicultura	Más de 10 años	0,445611	0,092910	2,137213	0,31226
Parasitación invierno	Más de 1%	5,696489	1,669218	19,440171	0,00547 **
Suplemento proteico	Si	0,818804	0,100711	6,657064	0,85168
Recambio de reinas	Si	0,658290	0,105069	4,124440	0,65519
Realiza Núcleos	Si	1,740026	0,286799	10,556910	0,54706

Desinfecta material inerte	Si	3,342503	0,354497	31,516061	0,29184
Monitoreo previo al tratamiento otoño	Si	16,171493	0,439545	594,978220	0,13026
Monitoreo posterior al tratamiento otoño	Si	0,146453	0,009365	2,290374	0,17091
Fecha de Monitoreo en Inicio de temporada	Nov-Dic	12,368093	2,116428	72,277509	0,00523 **
Tratamiento en invierno	Si	1,735525	0,107657	3,083887	0,51949
Apiarios Cercanos	Si	0,000001	0,294596	60,240911	0,28936

Las colmenas con más de 1% de infestación durante el invierno tuvieron 5,7 veces más riesgo de superar el umbral de daño en primavera. Al mismo tiempo se observó que el riesgo de superar el umbral de primavera fue 12,4 veces mayor conforme se retrasa la fecha del monitoreo al inicio de la temporada.

Se comparó el modelo ajustado con el siguiente modelo nulo (incluyendo únicamente el factor aleatorio):

Parasitación de inicio de temporada ~ 1 + (1 | apiario)

Modelo	Df	AIC	BIC	LogLik	Deviance	Pr(>Chisq)
Nulo	2	211.94	219.21	-103.968	207.94	0.0004
Ajustado	21	203.30	279.63	-80.648	161.30	

El modelo ajustado redujo significativamente la *deviance* (variabilidad no explicada) respecto del modelo nulo, lo que justifica la complejidad adicionada. Aquellas variables que no resultaron significativas en el modelo final estuvieron asociadas a uno o ambos de los factores de riesgo identificados (Figura 5.1). Se observó una asociación entre la fecha de monitoreo al inicio de la temporada y la población de abejas ($\chi^2 = 23,17$; $P <$

0,0001) y cantidad de polen en la colmena en pre-tratamiento de otoño ($\chi^2= 22,19$; $P< 0,0001$), la cantidad de celdas de cría durante el invierno ($\chi^2= 18,17$; $P< 0,0001$), la antigüedad en apicultura ($\chi^2= 9,86$; $P< 0,0001$), el uso de suplemento proteico ($\chi^2= 21,27$; $P< 0,0001$), la división de colmenas mediante núcleos ($\chi^2= 10,41$; $P= 0,001$), el tratamiento de invierno ($\chi^2= 27,25$; $P< 0,0001$) y la existencia de apiarios cercanos ($\chi^2= 10,15$; $P= 0,002$). Además, la cantidad de celdas de cría post-tratamiento de otoño mostró una leve tendencia a estar asociada con la fecha de monitoreo ($\chi^2= 4,89$; $P= 0,087$).

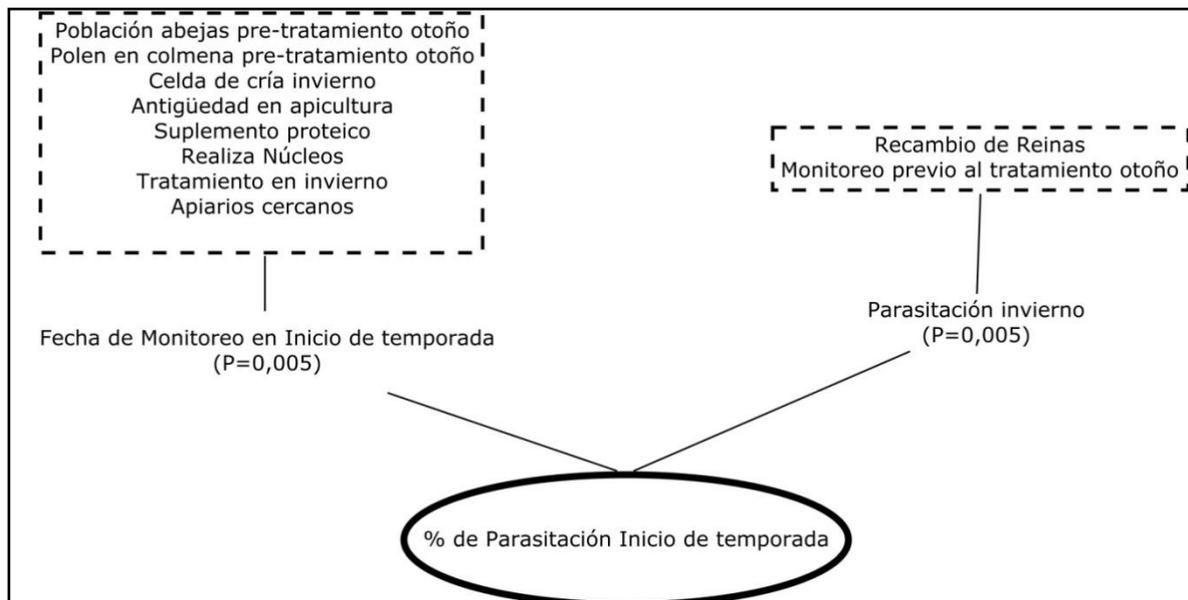


Figura 5.1. Esquema de interacción entre los factores de riesgo identificados en el modelo lineal generalizado mixto (MLGM) y las variables que fueron excluidas por el ajuste en el análisis multivariado.

Por otro lado, la parasitación de invierno se encontró asociada con el recambio de reinas ($\chi^2= 3,08$; $P= 0,05$) y el monitoreo previo al tratamiento de otoño ($\chi^2= 7,10$; $P= 0,002$). Las variables desinfecta material ($\chi^2= 0,012$; $P= 0,91$ y $\chi^2= 2,50$; $P= 0,13$) y monitoreo posterior al tratamiento de otoño ($\chi^2= 0,008$; $P= 0,93$ y $\chi^2= 2,50$; $P= 0,15$) no resultaron asociadas a la fecha de monitoreo en inicio de temporada o la parasitación de invierno, respectivamente.

Análisis espacio-temporal

En el análisis espacio-temporal correspondiente a las cuatro etapas de muestreo se reconocieron dos agrupaciones significativas. Los *cluster* detectados presentaron 2,82 ($P < 0,0001$) y 3,66 ($P < 0,0001$) más riesgo de contener colmenas que superen el umbral establecido para la etapa pre-tratamiento. Alternativamente, dado el efecto significativo del manejo sanitario en la carga parasitaria antes y después del tratamiento, el análisis espacio-temporal se redujo al intervalo entre la etapa post-tratamiento y el inicio de temporada (mayo-diciembre), eliminando la etapa previa al tratamiento acaricida (febrero-abril).

Tabla 5.3. Agrupaciones espacio-temporales de colmenas con alta y baja probabilidad de superar los umbrales de daño a lo largo del ciclo productivo.

Orden de <i>Cluster</i>	Nº de apiarios incluidos	Radio (km)	RR*	Periodo de tiempo	p-valor
1	3	20,18	4,30	Post-tratamiento	0,005
2	2	5,51	3,29	Invierno- Inicio de temporada	0,0066
3**	1	0	6,28	Post-tratamiento	0,011
4	3	28,91	3,05	Invierno- Inicio de temporada	0,03
5	4	16,89	0	Invierno- Inicio de temporada	0,031
6	7	74,37	0	Post-tratamiento	0,031

*RR: riesgo relativo

**No es un *cluster* propiamente dicho porque todas las colmenas pertenecen a un mismo apiario.

Durante el periodo de estudio post-tratamiento-invierno-inicio de temporada, se identificaron seis agrupaciones o *cluster* significativos (Tabla 5.3), en un total de 840

colmenas distribuidas en 48 apiarios (Figura 5.2). El número total de casos en el área de estudio fue de 138 (16,4 %).

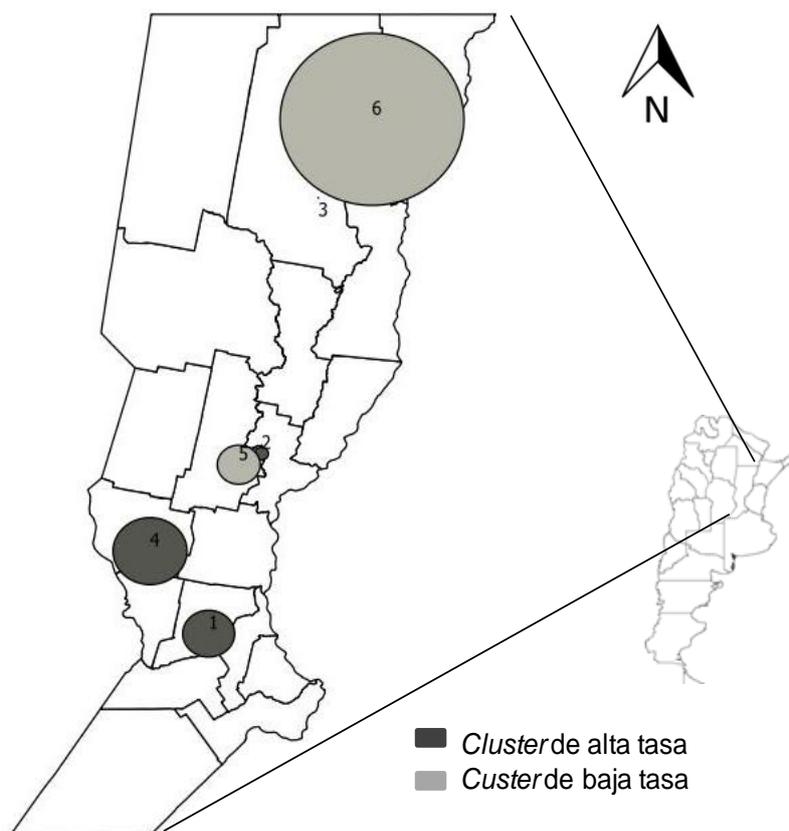


Figura 5.2. Distribución espacio-temporal de colmenas con mayor (alta tasa) o menor probabilidad (baja tasa) de superar los umbrales de daño en el periodo post-tratamiento-invierno-inicio de temporada en la provincia de Santa Fe.

DISCUSIÓN

Varroa destructor es una de las principales causas de mortalidad de colmenas de *Apis mellifera* (Guzmán-Novoa *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2013) y disminución de la producción de miel (Murilhas, 2002; Medina Flores *et al.*, 2011). El control sanitario especialmente al inicio de la etapa productiva resulta fundamental para evitar el crecimiento exponencial de poblacionales al final del verano y el comienzo del otoño, cuando probablemente la población del ácaro haya alcanzado niveles de daño significativos (Le Conte *et al.*, 2010).

En este estudio se identificaron dos variables asociadas con el porcentaje de parasitación con *Varroa* al inicio de la temporada, la parasitación de invierno y la fecha de monitoreo al inicio de la temporada. Además, de acuerdo con los resultados presentados en la Figura 5.1 aquellas variables que fueron excluidas en el modelo final, se encontraron asociadas por lo menos a uno de los dos factores de riesgo identificados en este estudio.

La parasitación durante el invierno fue un factor de riesgo propiamente dicho, dado que el riesgo de superar el umbral de daño en primavera (2%) aumentó casi 6 veces cuando las colmenas superaron el umbral establecido para atravesar el invierno (1%). Esta variable condicionó directamente el porcentaje de parasitación con *Varroa* registrado al inicio de la temporada.

Por otro lado, la fecha en la cual se realizó el monitoreo al inicio de la temporada indicó que la probabilidad de superar dicho umbral aumenta considerablemente a medida que nos acercamos a la etapa más favorable para el desarrollo del parásito. La información aportada por esta variable pone de manifiesto la importancia del monitoreo como herramienta de seguimiento y control de las poblaciones del ácaro en esta etapa clave del ciclo productivo (Imdorf *et al.*, 2003). Dado que existieron 12 veces más riesgo de alcanzar niveles de parasitación superiores al 2% a partir del mes de noviembre y que al mismo tiempo un control químico ya no es posible en este momento del año, una fecha de monitoreo temprana permitiría tomar decisiones de manejo apropiadas en el momento indicado. Las colmenas deberían ser monitoreadas con frecuencia para asegurar que los tratamientos acaricidas son exitosos al mantener los niveles del ácaro por debajo del umbral de daño (Currie & Gatién, 2006). El concepto de monitoreo como instrumento clave en las decisiones de manejo se vio reflejado también en la asociación entre las colmenas que fueron monitoreadas antes y después de los tratamientos de otoño con la parasitación registrada durante el invierno y la fecha de monitoreo de primavera, respectivamente. Disponer de una

estimación precisa del tamaño poblacional de *V. destructor* en las colmenas es una herramienta importante en la aplicación del MIP (Branco *et al.*, 2006). Luego de aplicado el tratamiento, debe corroborarse el nivel de infestación remanente para determinar si el tratamiento fue exitoso (Boecking & Genersch, 2008).

Se evidenció una interacción significativa entre el recambio de reinas y el porcentaje de parasitación de invierno. Observamos que en aquellos apiarios donde efectivamente se realizaba el recambio de las reinas, el 27,8% de los apiarios que superaron el umbral de parasitación durante el invierno (1%) también lo superaron durante la primavera (2%), mientras que el 7,9% solo lo hizo en primavera. Por el contrario, en aquellos apiarios donde no se realizaba recambio de reinas, el 30% de los apiarios superaron el umbral en ambas estaciones, así como el 26,8% de los que no lo superaron en invierno sí lo hicieron en primavera. La edad y calidad de la reina son dos factores altamente influyentes en la producción de cría, la tasa de crecimiento y la productividad de la colmena (Akyol *et al.*, 2007). Ha sido reportado que las colonias de *A. mellifera* con reinas de hasta un año tienen mayor población y producen hasta 40% más de miel en comparación con reinas de dos años (Akyol *et al.*, 2007). Además, el rol de la reina en la renovación de la población de abejas obreras y el remplazo de las pérdidas de población producida por Nosemosis es vital para mantener la homeostasis de la colmena (Botías *et al.*, 2012). Esto indicaría que el estado sanitario general de la colmena se ve favorecido por la presencia de reinas jóvenes.

Simultáneamente se observó que el 60% de los apicultores con menos experiencia en la actividad (menos de 10 años) realizaron el monitoreo recién entre noviembre y diciembre mientras que solo lo hizo el 39% de los apicultores más experimentados (más de 10 años). Una posible explicación podría ser que la experiencia de años anteriores influya en la decisión de realizar un monitoreo en las colmenas al comienzo de la etapa productiva.

Colmenas con poca disponibilidad de polen almacenado pueden impedirle a las abejas adultas alimentar apropiadamente a las larvas (Brodschneider & Crailsheim, 2010), por lo que la suplementación proteica determina indirectamente que existan o no condiciones favorables para la reproducción del parasito. En este estudio se encontró una asociación significativa entre la fecha de monitoreo y la suplementación proteica lo que resulta en colmenas con mayor probabilidad de superar el umbral de primavera dado que han sido alimentadas y que el registro de parasitación se ha realizado hacia el final de dicha estación. Aun más compleja resulta la interacción con la fecha de monitoreo si incluimos la cantidad de polen que presentaban las colmenas en el otoño anterior. Casi el 70% de los apicultores que realizaron el monitoreo en fechas cercanas al verano, tenían colmenas en el otoño anterior con más de un cuadro de polen y realizaron suplementación proteica en algún momento del año. A pesar de que estas resultaron condiciones favorables para las abejas, la combinación de una fecha tardía de monitoreo con condiciones propicias para el desarrollo de *Varroa* resultaron en altas probabilidades de alcanzar el umbral de daño hacia el final de la primavera.

Con relación a la población de abejas de las colmenas previo al tratamiento de otoño, se encontró una asociación significativa con la fecha de monitoreo. De las colmenas que fueron monitoreadas temprano en la primavera, el 90% tuvieron durante el otoño anterior más de 8 cuadros cubiertos con abejas y el 73,8% hasta dos cuadros de cría durante el invierno. En comparación, cerca del 50% de las colmenas que fueron monitoreadas entre noviembre y diciembre presentaban más de dos cuadros con cría en el invierno. En conjunto estos resultados indicarían que si las colmenas tienen menos cría disponible la probabilidad de alcanzar el umbral de daño en la primavera temprana es menor. Por el contrario, largos períodos de cría o ausencia en el corte de postura durante el invierno incrementan drásticamente el tamaño poblacional del ácaro (Calis *et al.*, 1999) dado que el factor que mejor explicaría los niveles de infestación

hacia finales del otoño e inicio del invierno es la producción de cría tardía (Fries *et al.*, 2003).

La división de colmenas mediante núcleos permite reducir la carga parasitaria en las colmenas en términos de porcentaje de infestación en un momento puntual (Wallner & Fries, 2003). Por ejemplo, luego de la división, la infestación de ácaros en la colmena es bastante más baja al momento del desarrollo de la población de abejas de invierno (Boecking & Genersch, 2008). Si bien el objetivo de esta práctica es aumentar o recuperar el número total de colmenas y no es un método de control, disminuye la cantidad de ácaros y otros patógenos de la “colmena madre” que pueden ser controlados en los nuevos núcleos (Boecking & Genersch, 2008). En este trabajo, se encontró que la asociación entre la división mediante núcleos y la fecha de monitoreo está dada porque el 72% de los apicultores que no realizan núcleos, monitorearon sus colmenas entre noviembre y diciembre. Esta condición da como resultado que la proporción de colmenas que han superado el umbral de primavera es mayor. Realizar núcleos requiere de ciertas condiciones que eviten un impacto negativo dado que la división de colmenas contribuye a la transmisión horizontal del parásito permitiendo que se mantengan las formas más virulentas (Fries & Camazine, 2001). Es recomendable realizar núcleos luego de efectuar un monitoreo de la parasitación de las colmenas y aplicar un tratamiento ya que las poblaciones de *Varroa* se mantienen dentro del apiario. Además, las divisiones deben hacerse en colmenas propias de cada apicultor (Boecking & Genersch, 2008), evitando intercambiar material vivo con otros productores. Si bien la división mediante núcleos no es un método de control, divide la población existente de ácaros permitiendo en algunos casos demorar la aplicación del tratamiento (Wallner & Fries, 2003).

Una carga parasitaria baja durante la primavera es clave para la buenas prácticas apícolas (Renz & Rosenkranz, 2001). El monitoreo de las colmenas durante el inicio de la temporada aporta información en este sentido y es una herramienta fundamental

para tomar decisiones de manejo (Currie & Gatién, 2006). En nuestro estudio, el 71,7% de los apicultores que no trataron durante el invierno, realizaron además el monitoreo entre noviembre y diciembre, lo que probablemente derive en una situación sin posibilidad de control químico dado el inicio del flujo de néctar. Es recomendable, que si no se han controlado las poblaciones de *V. destructor* durante el invierno, se realice un monitoreo de las colmenas para conocer la carga parasitaria antes del inicio de la temporada.

Por último, el 52,6% de los apiarios que declararon tener al menos un apiario cerca, realizaron un monitoreo tardío. Cuando el monitoreo de primavera se realiza próximo a los meses de verano coincide con un momento de mayor presión de re-invasión del ácaro (Renz & Rosenkranz, 2001).

La fecha de monitoreo no es *per se* un factor de riesgo, pero aun así estuvo asociado con múltiples factores de manejo que evidentemente se relacionan con la variable de respuesta. Cuando un factor de riesgo es identificado y se encuentra altamente correlacionado con una o más variables independientes, ésta también lo será, independientemente de su asociación biológica con la variable dependiente (Dohoo *et al.*, 1996). Este tipo de situaciones puede surgir cuando múltiples variables independientes son analizadas simultáneamente y separar sus efectos se vuelve complejo.

Análisis espacio-temporal

Identificar agrupaciones de colmenas con mayor riesgo de superar los umbrales de daño a lo largo del ciclo productivo resulta una herramienta fundamental en el control de la difusión de *V. destructor*. Cuando se analizó el intervalo de monitoreo completo sólo se identificaron dos *cluster* de apiarios con alto de riesgo de superar el 3% de infestación con Varroa durante la etapa pre-tratamiento. Este resultado sugiere que se registran grandes diferencias entre la parasitación con Varroa durante la etapa previa

a las aplicaciones sanitarias y el resto del ciclo productivo, debido precisamente al efecto que el tratamiento acaricida tiene sobre la carga parasitaria de las colmenas. La evolución del porcentaje de infestación y la probabilidad de superar los umbrales de daño establecidos pueden visualizarse mejor cuando los datos pertenecientes a la etapa previa al tratamiento son excluidos.

En este estudio se describen seis *cluster* espacio-temporales, cuatro agrupaciones con alto riesgo (*cluster* de alta tasa) y dos con bajo riesgo de superar los umbrales de daño (*cluster* de baja tasa). Los *cluster* de alta tasa presentaban características diferentes dado que dos de ellos se identificaron durante la etapa post-tratamiento exclusivamente (*cluster* #1 y *cluster* #3 compuesto por un solo apiario) y dos de ellos durante el intervalo invierno-inicio de temporada (*cluster* #2 y #4).

En el caso del *cluster* #1 (RR: 4,30) dos de los apiarios incluidos fueron tratados con acaricidas de origen casero a base de cumafós. Consecuentemente, la proporción de colmenas con más de 1% durante la etapa post-tratamiento es más alta que lo esperado por azar. Muchas veces, en respuesta a la aparición de fenómenos de resistencia potenciados por condiciones económicas desfavorables, los apicultores tienden a utilizar productos caseros no autorizados, usualmente en cantidades excesivas (VanEngelsdorp & Meixner, 2010). El uso de acaricidas caseros es cuestionado tanto por la eficiencia en la liberación del principio activo como por el aporte al desarrollo de poblaciones resistentes (Wallner, 1999, Higes *et al.*, 2010). Más aun, en ambos casos el principio activo utilizado fue cumafós para el cual ya han sido reportados casos de resistencia (Pettis, 2004; Maggi *et al.*, 2009; Maggi *et al.*, 2011). El caso del apiario que conforma el *cluster* #3 (RR: 6,28) es un tanto controversial dado que ha sido tratado con un producto aprobado por SENASA, durante abril-mayo al igual que un apiario que pertenece al *cluster* #6 (de baja tasa). Aun cuando ambos apiarios se encontraban próximos entre sí (14,5 km en línea recta) y compartían el mismo asesoramiento técnico la totalidad de colmenas del *cluster* #3 superaron el

umbral de 1% establecido para la etapa post-tratamiento (Giacobino *et al.*, 2015). Probablemente exista alguna característica específica del manejo de este apiario y del ambiente cercano que determina que a pesar de utilizar un producto comercial aprobado, la eficacia del tratamiento fue muy baja.

Los *cluster* de alta tasa para el intervalo invierno-inicio de temporada también presentaron un manejo heterogéneo. El *cluster* #2 (RR: 3,29) estuvo conformado por apiarios que no fueron tratados durante el invierno y cuyos propietarios han reportado tener apiarios vecinos en un radio menor a 2000 metros. El riesgo de presentar colmenas con más de 1 % de infestación durante el invierno aumenta si al final del otoño las colmenas han estado expuestas a la re-invasión de ácaros debido a una mayor densidad de apiarios en la zona. La tasa de re-invasión depende en parte de la densidad de apiarios, dado que los ácaros provenientes de colmenas infestadas que todavía no han sido tratadas pueden invadir las colmenas que ya han recibido un tratamiento (Frey & Rosenkranz, 2014). Además, de acuerdo con nuestro modelo, si al finalizar el invierno no se ha aplicado un tratamiento que permita corregir esta situación, el riesgo de superar el umbral de parasitación durante la primavera aumenta.

El *cluster* #4 (RR: 3,05) exhibió una situación aun más diversa, ya que estuvieron involucrados dos apiarios que habían recibido tratamiento con acaricidas sintéticos durante o al finalizar el invierno y un apiario que no recibió ninguno. Para el caso de los apiarios tratados con flumetrina o amitraz la falta de eficacia puede relacionarse tanto con problemas en la aplicación del producto, la calidad del soporte, como así también con fenómenos de resistencia, si bien se desconoce el producto comercial y el modo de aplicación. Aunque hubo una reducción en la parasitación respecto al invierno, se registró una alta proporción de colmenas con más de 2% durante la primavera. Estos mismos apiarios habían presentado remanentes de *Varroa* durante los tratamientos aplicados en el otoño anterior, con 40% de colmenas con más de 1%

de parasitación post-tratamiento. Es importante destacar que en muchos casos, el desarrollo de poblaciones resistentes de ácaros y la detección de residuos químicos en miel y cera pueden atribuirse a un uso prolongado o incorrecto de los acaricidas disponibles o debido a que algunos apicultores preparan sus propios productos (Wallner & Fries, 2003). Todos los apicultores cuyos apiarios pertenecían a este *cluster* mencionaron tener por lo menos un apiario cerca y la mayoría declaró también haber tenido algún problema en el control de Varroa durante el otoño. Si en zonas de alta densidad de apiarios, además se registran poblaciones significativas de ácaros remanentes luego de un tratamiento, el riesgo de alcanzar umbrales de daño es alto dado que los apiarios están expuestos a re-invasiones masivas (Imdorf *et al.*, 2003). Zonas con alta densidad de apiarios en combinación con un tratamiento ineficaz no sólo aumentan el riesgo de daño en las colmenas (Frey & Rosenkranz, 2014) sino que también ejercen una presión de selección sobre las formas más virulentas del ácaro (Fries & Camazine, 2001). Esta condición en conjunto con la ausencia de tratamientos al finalizar el invierno resulta en altas probabilidades de presentar colmenas con más de 2% de infestación con Varroa al inicio de la temporada.

Se identificaron dos *cluster* de baja tasa, el *cluster* #5 para el intervalo invierno-inicio de temporada y el #6 en la etapa post-tratamiento. Tres de los cuatro apiarios pertenecientes al *cluster* #5 aplicaron un tratamiento orgánico con ácido oxálico durante o al finalizar el invierno. Como estrategia de control alternativa, el tratamiento de invierno es fundamental dado que elimina o reduce los ácaros que contribuirán al desarrollo de las poblaciones durante el próximo verano (Rashid *et al.*, 2012). Además, los apiarios de este *cluster* que habían registrado problemas en el control de Varroa durante el muestreo post-tratamiento realizaron un nuevo tratamiento asegurando cargas parasitarias por debajo del 1% durante el invierno y al inicio de la temporada. El control de Varroa en esta etapa desacelera el desarrollo de poblaciones de ácaros durante el verano evitando mayores daños en las colmenas (Giovenazzo & Dubreuil,

2011). El monitoreo posterior a la aplicación de un tratamiento para evaluar su eficacia (Boecking & Genersch, 2008) combinado con el uso de ácido oxálico durante o al finalizar el invierno (Rashid *et al.*, 2012) pueden colaborar para mantener las poblaciones de *Varroa* por debajo de los umbrales de daño tanto en invierno como en primavera.

El 85% de los apiarios de baja tasa agrupados en el cluster #6 para la etapa post-tratamiento recibieron una aplicación de acaricida a finales de febrero o principios de marzo. Además, todos fueron tratados con el mismo principio activo utilizando un producto comercial aprobado por SENASA y dentro del *cluster* no se registró ningún caso que superara el 1% de infestación con *Varroa* post-tratamiento. Es importante destacar que los programas de manejo basados en el MIP deben ser coordinados regionalmente para reducir la presión de re-invasión en las colmenas (Frey & Rosenkranz, 2014).

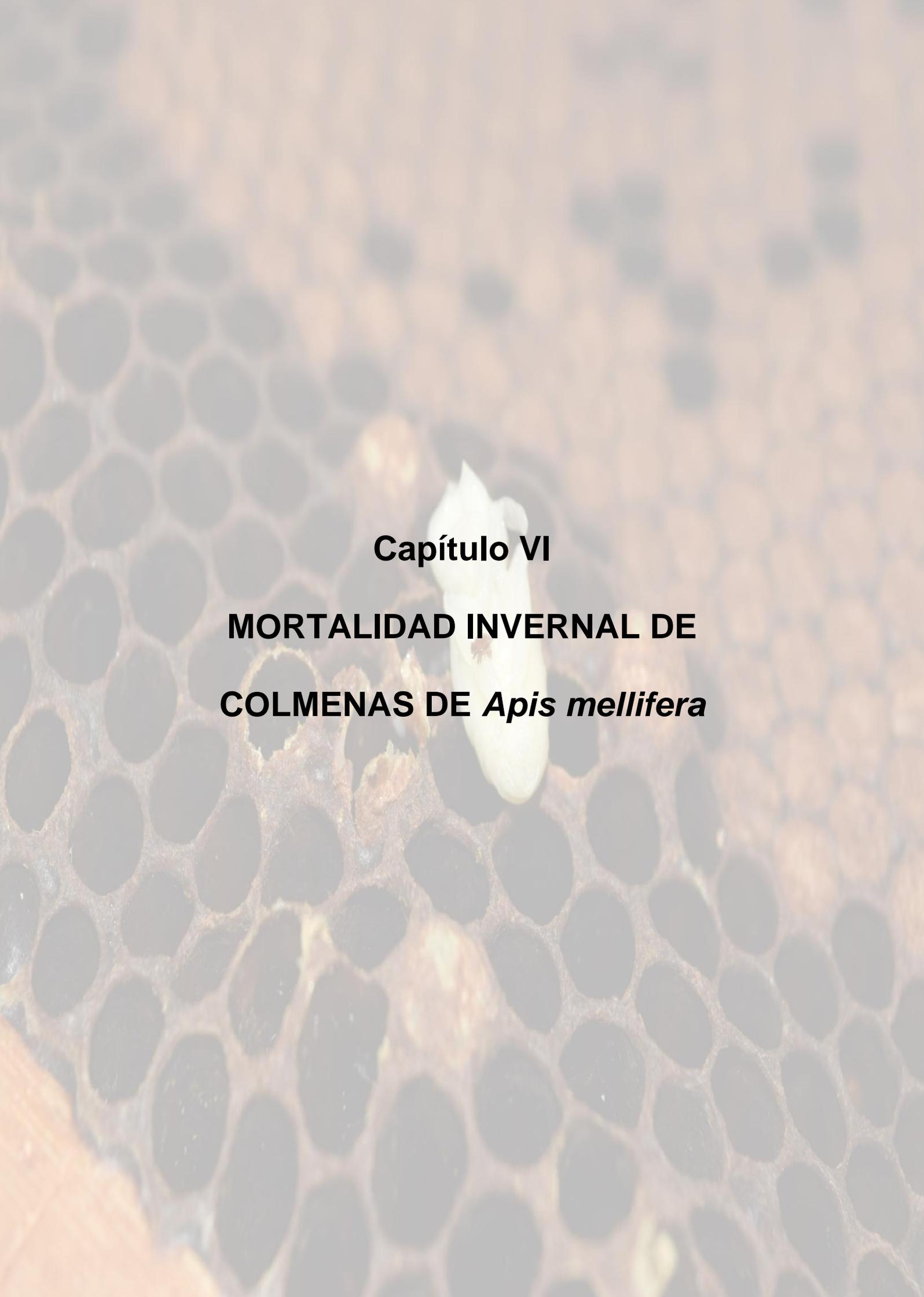
En todos los casos los *cluster* de alta y baja tasa reflejan la marcada influencia que tiene el manejo sanitario sobre las poblaciones de ácaros en las colmenas. La falta de estrategias de tratamientos coordinados e integrales y métodos de control que se implementan a menudo demasiado tarde o sin éxito, dan lugar a la reaparición generalizada de pérdidas de colmenas significativas debido a la presencia de *V. destructor* (Boecking & Genersch, 2008).

CONCLUSIONES

- El porcentaje de infestación con *Varroa* en invierno fue el principal factor de riesgo asociado con la presencia de colmenas que superaron 2% de infestación en primavera.
- Es necesario planificar un monitoreo durante el inicio de la temporada productiva y consecuentemente tomar una decisión de manejo apropiada

previo al periodo de carencia dado que el próximo tratamiento puede aplicarse solamente luego de la cosecha.

- Existen prácticas de manejo que indirectamente tienden a disminuir el porcentaje de infestación con Varroa al inicio de temporada, considerando que mantienen los niveles poblacionales por debajo del umbral en diferentes momentos clave del año.
- Existen asociaciones espacio-temporales de colmenas con mayor riesgo de superar el umbral de daño establecido en cada etapa del ciclo productivo. El manejo sanitario, conjuntamente con otras prácticas de manejo de los apiarios sería un factor preponderante en la formación de dichas agrupaciones.



Capítulo VI
MORTALIDAD INVERNAL DE
COLMENAS DE *Apis mellifera*

INTRODUCCIÓN

Se reportaron altas tasas de pérdida de colmenas de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) durante los últimos inviernos en muchos países, especialmente en Europa y América del Norte (vanEngelsdorp *et al.*, 2008; Neumann & Carreck, 2010; van der Zee *et al.*, 2014). Aunque la situación de la apicultura latinoamericana es diferente (Vandame & Palacio, 2010), durante los últimos años se ha registrado un aumento de las pérdidas durante el invierno.

El ácaro ectoparásito *Varroa destructor*, fallas en las reinas y la mala alimentación son identificadas por los apicultores como las principales causas de estas pérdidas de colmenas en invierno (Guzmán Novoa *et al.*, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2012). Niveles altos de infestación con *V. destructor* durante la transición hacia la población de invierno pueden causar pérdidas de colmenas debido a la disminución de la vida útil de estas abejas (van Dooremalen *et al.*, 2012). La presencia de *Varroa* no sólo causa la pérdida del peso corporal (Duay *et al.*, 2003), malformación en abejas adultas y debilitamiento de colmenas (Marcangeli *et al.*, 1992a; Garedew *et al.*, 2004) y la reducción de la vida útil de las obreras (Amdam *et al.*, 2004) sino que también facilita la interacción con otros patógenos, como por ejemplo el microsporidio *Nosema* spp. y diversos virus (Chen & Siede, 2007; Williams *et al.*, 2010).

El manejo del apiario juega un papel importante en la preparación de las colmenas para que atraviesen el invierno y lleguen a la primavera en buenas condiciones (Topolska *et al.*, 2008). Muchos de los factores clasificados como posibles causas de mortalidad están estrechamente vinculados al manejo más que a condiciones ambientales o biológicas; considerando la intervención humana como contribuyente importante de la ocurrencia de mortalidad invernal (VanEngelsdorp *et al.*, 2010).

Los síntomas y las causas de la pérdida de colmenas pueden variar de acuerdo con la región, dado que las condiciones ambientales, las prácticas de manejo apícolas y los patógenos no son las mismas (Neumann & Carreck, 2010). La mortalidad invernal

podría explicarse por interacciones complejas entre diversos factores, encabezados por los niveles de *Varroa* y el manejo inadecuado del apiario.

OBJETIVOS

- Estimar el porcentaje de mortalidad invernal de colmenas de *Apis mellifera* en apiarios de la provincia de Santa Fe.
- Identificar los factores de riesgo asociados con las pérdidas de colmenas de *Apis mellifera* durante el invierno en una región de clima templado en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y tamaño de muestra

De acuerdo la cantidad de apiarios registrados en la provincia de Santa Fe (Departamento de Agricultura de Santa Fe, 2008), un total de 62 apiarios (n=3735; para intervalo de confianza de 95%; precisión en la estimación <10, 5%) fueron incluidos en una encuesta sobre mortalidad de colmenas. La definición de zonas geográficas y el número de apiarios por zona fue asignado de acuerdo con la proporción de apiarios distribuidos en la provincia (Moher *et al.*, 2010), de la misma manera que en las etapas de monitoreo pre-tratamiento (capítulo 2) y post-tratamiento (capítulo 3).

Toma de muestras: Fortaleza de la colmena y diagnóstico de infestación con V. destructor

Dentro de cada apiario se tomaron muestras en un mínimo de 6 colmenas o sobre el 10% del total de colmenas por apiario (Lee *et al.*, 2010). Para estimar el porcentaje de infestación previo al tratamiento acaricida se tomó una muestra de abejas adultas o *Varroa Forética* (VF) en cada colmena. Además, se midieron los parámetros de fortaleza de la colmena (CCA, CCC, CCP y CCM) por estimación visual de acuerdo

con la metodología detallada en materiales y métodos generales. La visita a los apiarios y toma de muestras se realizó entre febrero y mayo de 2013.

Encuesta de otoño sobre las prácticas de manejo del apiario: variables exploratorias

Los datos sobre el manejo del apiario fueron recolectados en la encuesta pre-tratamiento (Anexo 2). Se recopiló información sobre: 1) características generales del apiario (localización geográfica, número de colmenas, producción de miel y mortalidad promedio de los últimos tres años); 2) Prácticas de manejo comúnmente aplicadas (alimentación con carbohidratos, suplementación proteica, monitoreo de colmenas realizado por los apicultores, reemplazo de reinas, división de colmenas mediante núcleos, trashumancia) y 3) tratamientos acaricidas para controlar Varroa (principio activo, fecha de tratamiento, rotación durante los últimos cuatro años).

Encuesta de Primavera: mortalidad invernal

Una nueva encuesta fue realizada a todos los apicultores de los apiarios participantes durante septiembre-octubre de 2013 (Anexo 5). Se recopiló información sobre: 1) tratamientos de invierno contra Varroa, producto y fecha de aplicación 2) desinfección del material inerte post-cosecha y método para hacerlo y 3) porcentaje de colmenas perdidas durante la temporada invernal (desde la encuesta de otoño).

Análisis estadístico

El nivel de infestación con Varroa y la mortalidad invernal de colmenas fueron comparados entre las zonas geográficas mediante Kruskal Wallis y test de Mann Whitney U. Luego, los apiarios fueron clasificados en dos grupos de acuerdo con el porcentaje de mortalidad invernal de colmenas registrado: (alta mortalidad (>10%) y baja mortalidad ($\leq 10\%$)) (Genersch *et al.*, 2010, Le Conte *et al.*, 2010).

Se analizaron los potenciales factores de riesgo para mortalidad invernal de colmenas con relación a la parasitación con *Varroa* y la fortaleza de la colmena durante la etapa pre-tratamiento y a las prácticas de manejo del apiario registradas en las encuestas.

En una primera etapa, se analizó el grado de asociación de cada una de las variables independientes con el nivel de mortalidad registrado en el apiario (alta o baja) utilizando el test de Chi-cuadrado de Pearson (χ^2) o T de Student (de acuerdo con el tipo de variable). Todos los factores que presentaron valores de significancia $P < 0,15$ en el análisis bivariado fueron seleccionados para ser incluidos en un modelo logístico. Se evaluó la colinealidad entre las variables seleccionadas mediante el test de Chi-cuadrado de Pearson. Cuando se encontró asociación entre dos potenciales factores sólo uno fue incluido en el análisis multivariado (el de menor valor de P). Se ajustó un modelo de regresión logística utilizando como variable de respuesta el nivel de mortalidad registrado en el apiario (alta o baja mortalidad). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con software R (versión 2.15.3).

Análisis espacial

Se utilizó el método de detección de *cluster*, *Spatial Scan Statistic* para identificar agrupaciones espaciales dentro de una población con distribución heterogénea (Kulldorff & Nagarwalla, 1995). El set completo de datos fue escaneado para determinar la presencia de *cluster* de apiarios con alta o baja tasa de mortalidad de colmenas (equivalente a un test estadístico a dos colas). Se asumió una distribución Bernoulli para el porcentaje de mortalidad de colmenas (casos $>10\%$ y no casos $\leq 10\%$). Se calculó la razón de verosimilitud (LR por *likelihood ratio*) para cada agrupación o *cluster* propuesto, con límite superior de escaneo fijado sobre el 50% del total de la población en riesgo analizada. Se reportaron el *cluster* más probable y los *cluster* secundarios significativos según el LR (Kulldorff, 2014). El análisis espacial fue realizado utilizando el software SaTScan versión 9.2 (www.satscan.org).

RESULTADOS

El tamaño promedio de los apiarios relevados fue de 43 ± 17 colmenas y pertenecieron a apicultores con 12 ± 8 años de experiencia en la actividad. En el otoño, el nivel de infestación con *Varroa* pre-tratamiento fue de $5,68 \pm 4,19\%$ de VF y los parámetros de fortaleza de la colmena fueron: $8,69 \pm 1,16$ (CCA); $4,59 \pm 1,52$ (CCC); $0,87 \pm 0,54$ (CCP) y $3,02 \pm 1,31$ (CCM). El porcentaje de mortalidad invernal fue $11,44 \pm 8,86\%$ colmenas por apiario, con un mínimo de 0% y un máximo de 50%. Los datos completos sobre mortalidad invernal fueron registrados en un total de 46 apiarios, donde se registraron 28 casos con alta mortalidad (>10% de colmenas).

Las variables que resultaron asociadas con altas tasas de mortalidad (>10% de colmenas) fueron: CCC ($P= 0,007$), CCM ($P= 0,023$), nivel de infestación con *Varroa* pre-tratamiento ($P= 0,026$), recambio de reinas ($P= 0,007$) y fecha de aplicación de tratamiento acaricida de otoño ($P= 0,005$) (Tabla 6.1). Los apiarios con >10% de mortalidad presentaron menor CCC en el otoño ($4 \pm 1,24$) y más CCM ($3,61 \pm 1,24$) comparados con aquellos con <10% de mortalidad ($5,10 \pm 1,27$ CCC y $2,73 \pm 1,19$ CCM). Además, el porcentaje de infestación con *Varroa* fue mayor ($7,54 \pm 4,12\%$ por colmena) en comparación con los apiarios con <10% de mortalidad ($4,82 \pm 3,44\%$ por colmena) (Tabla 6.1).

Tabla 6.1 Asociación entre potenciales factores de riesgo y el porcentaje de mortalidad invernal registrado en apiarios de la provincia de Santa Fe durante el año 2013.

Factores	Mortalidad invernal	N	Media (DS)	Valor P^a
CCC	> 10%	18	4,00 (1,29)	0,007
	< 10%	28	5,10 (1,27)	

CCM	> 10%	18	3,61 (1,24)	0,021
	< 10%	28	2,73 (1,18)	
Nivel de infestación con Varroa	> 10%	18	7,54 (4,11)	0,019
	< 10%	28	4,81 (3,44)	

Factores	Nivel de la variable	Mortalidad Invernal N (%)		Valor <i>P</i> ^b
		>10%	<10%	
Recambio de Reinas	Si	7 (24,2)	22 (75,8)	0,007
	No	11 (64,7)	6 (35,3)	
Fecha de tratamiento acaricida de otoño	Temprano	5 (29,7)	26 (70,3)	0,002
	Tarde	5 (100)	0 (0)	

^aT-Student

^bChi-cuadrado de Pearson

Temprano: febrero/marzo; Tarde: abril/mayo/junio

Adicionalmente, el 75,8% de los apiarios dirigidos por apicultores que declararon realizar periódicamente recambio de reinas tuvieron <10% de mortalidad mientras que solo el 35,3% de aquellos que no recambian la reina presentaron la misma condición. Todos los apiarios que recibieron el tratamiento acaricida de otoño luego de marzo (fecha tardía) presentaron >10 % de mortalidad durante el 2013 (Tabla 6.1).

Tabla 6.2 Modelo de regresión logística para factores de riesgo asociados al porcentaje de mortalidad invernal de colmenas en la provincia de Santa Fe (2013; n= 42).

Variables	Nivel de la variable	Odds Ratio	IC 95% (O.R.)	Valor P
Constante	-----	0,00		0,99
CCC	-----	-----	-----	0,13
CCM	-----	-----	-----	0,13
Nivel de infestación con Varroa	-----	-----	-----	0,41
Recambio de Reinas	Si*			-----
	No	18,15	1,76-187,43	0,01
Fecha de tratamiento acaricida de otoño	Temprano*			-----
	Tarde			0,99

Test de Hosmer-Lemeshow del Modelo: 0,663. Referencias: IC95%: Intervalos de confianza; Temprano: febrero/marzo; Tarde: abril/mayo/junio.

*Variable de referencia

De las variables asociadas en el análisis bivariado e introducidas en el modelo de regresión logística (sólo 42 apicultores contestaron ambos cuestionarios y fueron incluidos en el modelo final), se encontró que sólo el recambio de reinas estuvo significativamente asociado con el porcentaje de mortalidad (Tabla 6.2). Apiarios

donde los apicultores no recambian periódicamente la reina tuvieron 18,15 veces más riesgo de presentar >10% de mortalidad que aquellos que aseguraron hacerlo (IC 95% 1,76-187,43; $P= 0,01$).

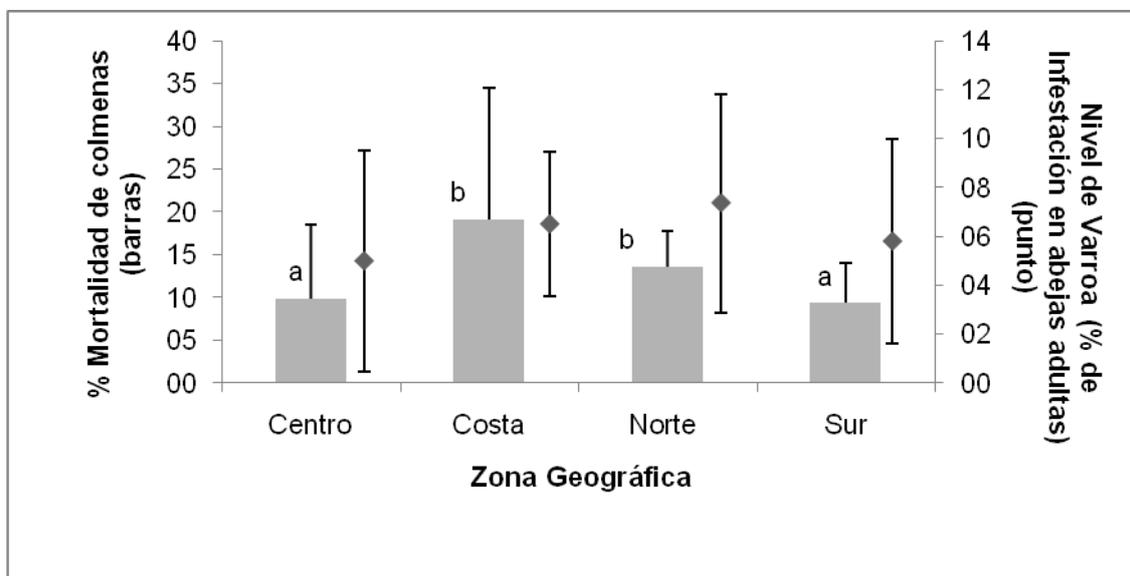


Figura 6.1 Porcentaje de Infestación con *Varroa destructor* durante el otoño 2013 y mortalidad de colmenas en invierno (% de colmenas por apiario) para todas las zonas en la provincia de Santa Fe. Referencias: Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$, Test de Mann-Whitney U).

No se detectaron *cluster* espaciales significativos en el análisis ($P < 0,05$) y el porcentaje de infestación con *Varroa* fue similar en todas las zonas ($P= 0,22$). Sin embargo, el promedio de mortalidad invernal fue mayor en las zonas norte y costa ($P= 0,03$) (Figura 6.1).

DISCUSIÓN

El porcentaje de pérdida de colmenas durante el invierno fue similar a datos previamente registrados en Alemania (Genersch *et al.*, 2010), Croacia (Gajger *et al.*, 2010) y Austria (Brodtschneider *et al.*, 2010) pero considerablemente menor que las pérdidas registradas en Canadá (Currie *et al.*, 2010), Estados Unidos (vanEngelsdorp *et al.*, 2008; 2010; 2012), Turquía (Giray *et al.*, 2010) y otros países europeos (Nguyen *et al.*, 2010; van der Zee *et al.*, 2012; 2014).

Los factores asociados individualmente al porcentaje de mortalidad invernal en los apiarios fueron CCC, CCM, recambio de reinas, el nivel de Varroa pre-tratamiento y la fecha aplicación del tratamiento acaricida. Estos resultados apoyan reportes previos que sugieren que colmenas débiles durante el otoño, reinas pobres y la presencia de Varroa se encuentran entre las cinco principales razones más frecuentes de la pérdida de colmenas (vanEngelsdorp *et al.*, 2012). Altas tasas de mortalidad ocurren cuando los apicultores reportan haber observado al ácaro *V. destructor* en sus colmenas durante el otoño (Nguyen *et al.*, 2010). En contraste, la supervivencia post-invernal es mayor cuando la infestación con *V. destructor* disminuye debido a la aplicación temprana de un acaricida, antes del desarrollo de las abejas de invierno (van Dooremalen *et al.*, 2012). A diferencia de lo registrado en estudios anteriores, otras variables como la alimentación con carbohidratos, la suplementación proteica, la trashumancia y el producto aplicado en el tratamiento contra Varroa no se asociaron con la mortalidad de invierno (vanEngelsdorp *et al.*, 2008; Brodschneider *et al.*, 2010).

A pesar de haber evaluado numerosas variables como potenciales factores de riesgo asociados con altas tasas de mortalidad, el recambio de reina parece ser el principal factor que explica las pérdidas invernales registradas en 2013. Los apicultores que no reemplazan frecuentemente las reinas en sus colmenas tiene 18 veces más riesgo de sufrir altas tasas de mortalidad invernal (superiores al 10% de colmenas por apiario). Una observación similar fue reportada Gajger *et al.* (2010) en Croacia, donde los apicultores que tuvieron las mayores pérdidas invernales, declararon que nunca cambiaron la reina. Estudios anteriores informaron que la edad de la reina (Genersch *et al.*, 2010) y el porcentaje de reinas jóvenes en las colmenas (van der Zee *et al.*, 2014) se asociaron, entre otros factores, con las pérdidas de invierno. Las colmenas tienen mayor probabilidad de sobrevivir durante el invierno debido a que en colmenas con reinas jóvenes hay mayor disponibilidad de cría y obreras adultas (Genersch *et al.*, 2010). Si bien esta condición podría favorecer la reproducción de los

ácaros, en realidad un mayor porcentaje de reemplazo de la reina ayuda a mantener niveles bajos de infestación con *Varroa* (Giacobino *et al.*, 2014), dado que mejoran la respuesta a los tratamientos acaricidas (Giacobino *et al.*, 2015), producen menos cantidad de cría de zánganos (Akyol *et al.*, 2007) y toleran mejor los factores de estrés, como la Varroosis.

Las pérdidas invernales variaron de acuerdo con la zona geográfica dentro de la provincia de Santa Fe, siendo mayor en la costa (19,1%) y en el norte (13,5%). Estas diferencias regionales observadas podrían explicarse por factores ambientales (Brodschneider *et al.*, 2010). La localización durante el invierno y patrones climáticos inusuales parecen ser factores importantes con relación a la mortalidad de colmenas (Giray *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de que las zonas costa y norte tuvieron mayor porcentaje de mortalidad, no se detectaron agrupaciones espaciales significativas en este análisis. Más allá de la caracterización climática, las zonas también son muy diversas en función del uso de la tierra. Mientras que en la zona de la costa predominan los cultivos fruti-hortícolas, la zona norte se designa principalmente para la producción ganadera. Las zonas del centro y sur están destinadas principalmente a la producción de leche y soja, respectivamente. Esto podría sugerir que, independientemente de las diferencias en los patrones climáticos y las características del paisaje, las pérdidas de invierno son más propensas a ser afectadas por prácticas de manejo apícola que por factores geográficos.

CONCLUSIONES

- El porcentaje de pérdida de colmenas durante el invierno puede reducirse mediante la aplicación de prácticas de manejo adecuadas (vanEngelsdorp *et al.*, 2010).

- El reemplazo periódico de reinas en las colmenas es el principal factor asociado a la reducción de la mortalidad invernal, dado que mejora el desarrollo de la colmena y ayuda a mantener bajos los niveles de Varroa.
- Si bien las decisiones de manejo implementadas en los apiarios no se encuentran agregadas en forma espacial, tienen mayor impacto sobre la mortalidad invernal que las condiciones ambientales determinadas por una zona geográfica.

Capítulo VII

IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE *Varroa destructor* RESISTENTES A LOS PRINCIPALES PRINCIPIOS ACTIVOS UTILIZADOS EN SU CONTROL

INTRODUCCIÓN

El manejo sanitario de *Varroa destructor* en colmenas de *Apis mellifera* depende en gran medida de intervenciones químicas mediante el uso acaricidas sintéticos para proporcionar un control selectivo y eficaz del parásito (Rosenkranz *et al.*, 2010). Sin embargo, la eficacia de algunos de los principios activos comúnmente utilizados en apicultura ha disminuido en los últimos años (Lodesani *et al.*, 1995; Marcangeli & Garcia, 2003). Los problemas de eficacia son frecuentemente considerados como indicios de futuros fenómenos de resistencia a los acaricidas (Lodesani *et al.*, 1995; Lodesani *et al.*, 2009), lo que constituye uno de los problemas más graves que actualmente enfrentan los apicultores (Maggi *et al.*, 2011).

Se han reportado casos de resistencia a diferentes principios activos en distintos países del mundo (Milani, 1999; Elzen, *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2002; Maggi *et al.*, 2009; Maggi *et al.*, 2010b). Los fenómenos de resistencia consisten en la aparición de un grupo de individuos en la población que son capaces de tolerar dosis tóxicas que serían mortales para la mayoría de los individuos de la misma población (Martínez Puc & Medina Medina, 2011).

Diversos factores podrían explicar la aparición de este tipo de fenómenos. Por un lado el uso inadecuado de los productos comerciales aprobados por SENASA: a) la aplicación sistemática de un solo acaricida puede generar la aparición de poblaciones resistentes; b) la permanencia del producto en el interior de las colmenas por más tiempo del recomendado (Marcangeli & García, 2003) debido a que los apicultores no remueven el soporte plástico al concluir el periodo de tratamiento indicado en el marbete. Por otro lado, el uso de productos caseros con concentraciones desconocidas y soportes no apropiados que exponen a las poblaciones de ácaros a dosis sub-letales del principio activo (Martínez Puc & Medina Medina, 2011).

La mayor preocupación con relación a la aparición de resistencia se relaciona con el número reducido de compuestos adecuados para el control del ácaro y

consecuentemente la imposibilidad de superar el problema sustituyendo el principio activo aplicado (Milani, 1999).

Actualmente existen poblaciones de *V. destructor* resistentes al fluvalinato, cumafós y amitraz (Elzen *et al.*, 1999; Pettis, 2004; Maggi *et al.*, 2009; Maggi *et al.*, 2010b) y pocas alternativas de control de ácaros en corto o mediano plazo. Es necesario identificar las poblaciones de ácaros resistentes y los principios activos involucrados y consecuentemente limitar su propagación mediante la reducción o supresión del uso de los mismos. Nuevos estudios sobre las poblaciones de *V. destructor* resistentes a los acaricidas sintéticos deberían llevarse a cabo con el propósito de obtener información histórica detallada de acuerdo con el estado de salud de diferentes apiarios en todos los países (Maggi *et al.*, 2010b).

OBJETIVO

- Evaluar la presencia y distribución de poblaciones de *V. destructor* resistentes a los principios activos presentes en los acaricidas comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de apiarios y obtención de ácaros

Los bioensayos para determinar la presencia de poblaciones resistentes se realizaron en cinco apiarios con antecedentes de fallas en el control de *V. destructor*. La mayoría de estos problemas de control fueron registrados durante el monitoreo de colmenas realizado en 2013 en el marco de esta tesis. Dichos apiarios fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes criterios:

- ✓ Más del 50% de las colmenas del apiario presentaron valores de infestación mayores al 1% de *Varroa forética* luego de la aplicación de un tratamiento acaricida en otoño.

- ✓ Los productos utilizados para el control de *Varroa* pertenecían a marcas comerciales aprobadas por SENASA para su aplicación en colmenas productoras de miel.
- ✓ La aplicación del producto se realizó durante el periodo y según la dosis correspondiente a las indicaciones del marbete y el muestreo post-tratamiento fue efectuado inmediatamente al finalizar dicho periodo.
- ✓ Los paquetes de los productos acaricidas aplicados se encontraban en buen estado de conservación y se aplicaron de manera correcta.

La localización de los apiarios dentro de provincia de Santa Fe y los porcentajes de infestación con *V. destructor* en abejas adultas (antes y después del tratamiento acaricida) se muestran en las Figuras 7.1.y 7.2, respectivamente.

Se analizaron dos casos posibles de resistencia a amitraz (apiarios II y IV), dos apiarios donde se evaluó tanto amitraz como flumetrina (apiarios I y V) y un caso de posible resistencia a cumafós (apiario III). En cada uno de ellos, se colectaron cuadros con cría de abeja operculada infestados con *V. destructor*, los cuales fueron llevados al laboratorio y conjuntamente se completó una encuesta sobre la historia de uso de acaricidas en cada apiario.

Los cuadros fueron inspeccionados utilizando una pinza de disección para la extracción de hembras adultas de *V. destructor* (Figura 7.3). No se tuvo en cuenta el estadio de cría de abejas de donde provenían los ácaros (Milani, 1995; Maggi, 2010). Los individuos removidos fueron colocados en cápsulas de Petri con pupas de *A. mellifera* como fuente de alimento, por un máximo de tres horas hasta completar la cantidad suficiente de ácaros para los bioensayos.

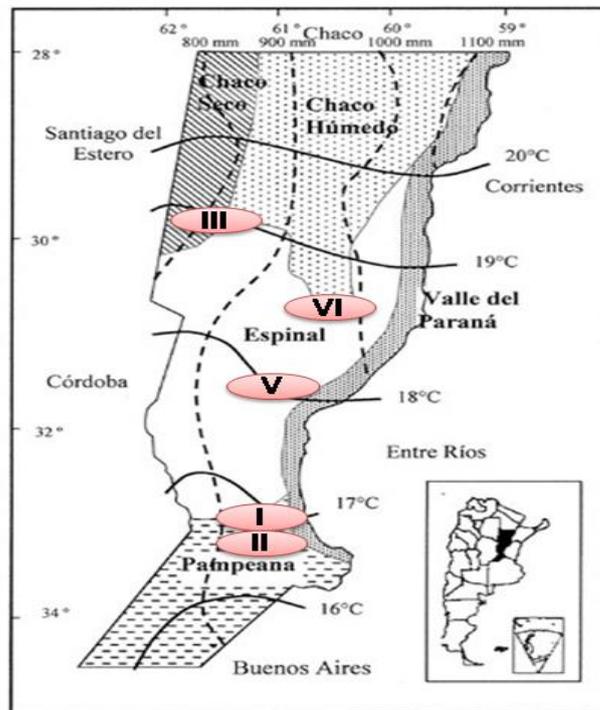


Figura 7.1 Ubicación de los apiarios seleccionados para análisis de resistencia de poblaciones de *Varroa destructor* en la provincia de Santa Fe.

Se obtuvieron 50 ml de solución madre (10 $\mu\text{g/ml}$) de flumetrina, amitraz o cumafós (Pestanal®; Sigma Aldrich) disueltos en hexano (Laboratorio Cicarelli, Argentina, Pro-análisis). A partir de ésta, se obtuvieron 10 ml de solución con la concentración letal 50 (CL_{50}) de base correspondiente a cada principio activo (Maggi *et al.*, 2008). La CL_{50} se define como la concentración de principio activo necesario para matar al 50 % de la población expuesta. Para el caso particular del apiario I, que presentó gran disponibilidad de ácaros debido a una infestación muy severa, además de evaluar la CL_{50} de amitraz, se prepararon concentraciones crecientes en un ensayo de exposición completa para flumetrina (0; 0,25; 0,5; 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$).

Para evaluar cada principio activo, se aplicó 1 ml de su CL_{50} sobre toda la superficie de una cápsula de Petri (90 x 20 mm), en total se realizaron cinco réplicas por cada concentración en cada uno de los apiarios. Las cápsulas se dejaron expuestas a temperatura ambiente por dos horas para que el excedente de hexano se evapore. Se colocaron cinco hembras de *V. destructor* en cada cápsula y una hora después fueron agregadas tres abejas obreras, una esponja de un cm^3 embebida en agua y un

recipiente con *candy* (3:1 azúcar en agua) que sirvieron de bebedero y alimento para las abejas, respectivamente.

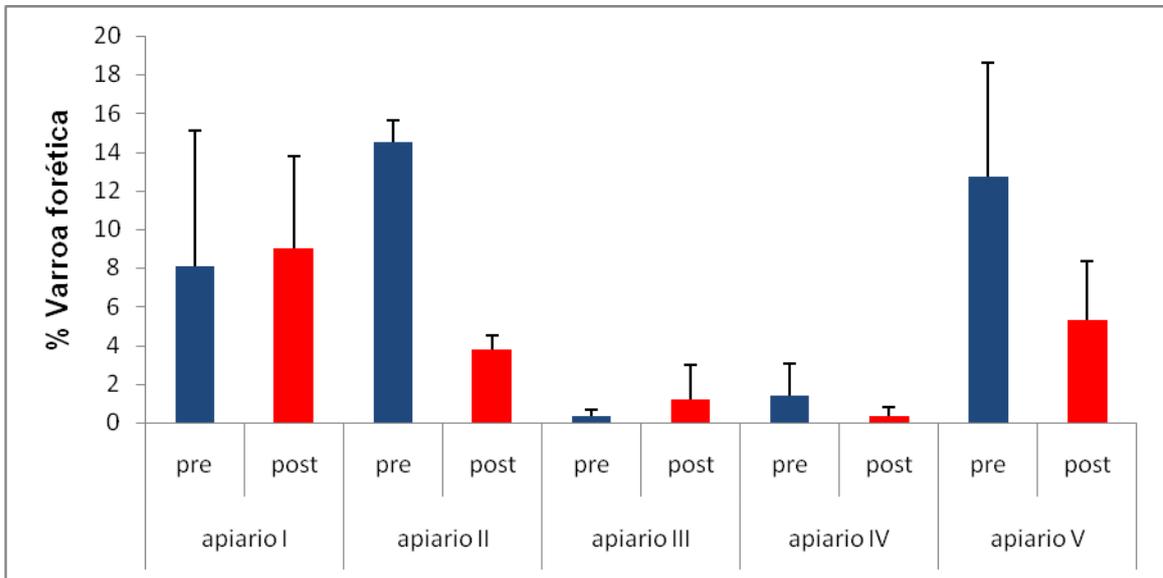


Figura 7.2 Porcentaje de infestación (media \pm D.S) con *Varroa destructor* en abejas adultas (*Varroa forética*) anterior (pre) y posterior (post) al tratamiento acaricida provenientes de apiarios de la provincia de Santa Fe con sospecha de resistencia.



Figura 7.3. Extracción de hembras adultas de *V. destructor* para el análisis de poblaciones resistentes.

*Exposición a CL_{50} de las poblaciones con fallas en el control de *V. destructor**

Las cápsulas fueron colocadas en una estufa a 29 ± 1 °C y $70 \pm 10\%$ de humedad por 24 horas (Figura 7.4). Cumplido dicho periodo, se procedió a evaluar el número de ácaros muertos corroborando la ausencia de movimiento ante estímulos táctiles.



Figura 7.4. Incubación de cápsulas de Petri en estufa (29 ± 1 °C y $70 \pm 10\%$ de humedad) por 24 horas.

Determinación de individuos resistentes

Se evaluó el porcentaje de individuos muertos al ser expuestos a la CL_{50} de un principio activo determinado. Si los ácaros son susceptibles a la acción del acaricida, se espera una mortalidad de la población expuesta cercana al 50%, si la mortalidad es significativamente menor al 50% (test t-Student para una muestra) es posible que los individuos sean resistentes al principio activo. La CL_{50} se estimó mediante regresión probit en los ensayos de exposición completa. El índice de resistencia (IR) se calculó dividiendo la CL_{50} estimada de las poblaciones evaluadas sobre la CL_{50} de poblaciones

susceptibles reportadas para flumetrina en Maggi *et al.* (2008). Todos los análisis fueron realizados usando el programa estadístico SPSS versión 17.0.

RESULTADOS

La mortalidad promedio de ácaros en el control fue de $8 \pm 6\%$ (media \pm D.S), en todos los ensayos la mortalidad del control fue menor a 18%. Los principios activos y los porcentajes de mortalidad observados para cada uno de los apiarios se muestran en la Tabla 7.1. No se presentaron fenómenos de resistencia en ninguno de los casos de estudio.

Tabla 7.1. Porcentaje de mortalidad esperado y observado por apiario para la exposición a la CL₅₀ de base de los principios activos evaluados.

Apiario (zona de la provincia)	Principio activo (CL ₅₀)	Mortalidad esperada (%)	Mortalidad observada (%)	Valor P ^a
Apiario I (sur)	Amitraz (0,1 ug/ml)	50	100	----
Apiario II (sur)	Amitraz (0,1 ug/ml)	50	100	----
Apiario III (centro)	Cumafós (0,57ug/ml)	50	56	0,63
Apiario IV (centro)	Amitraz (0,1 ug/ml)	50	100	----
Apiario V (centro)	Flumetrina (0,34ug/ml)	50	72	0,05
Apiario V (centro)	Amitraz (0,1 ug/ml)	50	96	<0,0001

^a Prueba t-Student para una población

Se estimó la CL₅₀ para flumetrina en la población de ácaros provenientes del apiario I (Tabla 7.2). El IR calculado fue de 0,85. De acuerdo con estos resultados, la población de *V. destructor* evaluada no presentaba indicio de resistencia a flumetrina. El porcentaje de mortalidad ligeramente menor en la dosis más alta (2 ug/ml) no fue significativamente diferente de la mortalidad registrada en la dosis de 1ug/ml ($t= 1,131$; $P= 0,291$).

Tabla 7.2. Porcentaje de mortalidad observado en concentraciones crecientes (0 a 2 ug/ml) y CL 50 de flumetrina para el apiario I.

Concentración	Total ácaros expuestos	Mortalidad (%)	CL ₅₀
Control	25	12	
0,25 (ug/ml)	25	48	
0,50 (ug/ml)	23	48	0,293
1 (ug/ml)	25	72	
2 (ug/ml)	25	56	

De acuerdo con las encuestas realizadas en los apiarios, el esquema de rotación de principios activos fue respetado en todos los casos (Figura 7.5). Los registros en los apiarios de la zona sur (Apiarios I y II) van desde el otoño 2012 al otoño 2015 mientras que en la zona centro van desde otoño 2011 a otoño 2013.



Referencias: tratamiento acaricida de otoño (O) y tratamiento acaricida de primavera (P)

Figura 7.5 Esquema de rotación de principios activos en los apiarios seleccionados para análisis de resistencia de poblaciones de *Varroa destructor* en la provincia de Santa Fe.

DISCUSIÓN

Es importante explorar las poblaciones de *Varroa destructor* para determinar la presencia de posibles focos de resistencia (Maggi *et al.*, 2010b). De acuerdo con los resultados presentados aquí, no se identificaron poblaciones resistentes a ninguno de los principios activos evaluados en la provincia de Santa Fe.

El amitraz fue el principio activo más eficaz dado que en los cuatro apiarios donde se evaluó la CL_{50} la mortalidad superó el 95 %, similar a lo reportado por Maggi (2010). Las tiras plásticas utilizadas suelen tener una considerable cantidad de residuos de amitraz durante todo el período de tratamiento, indicando una alta persistencia del principio activo y una liberación constante (Floris *et al.* 2001). Por lo tanto, la eficacia a campo suele ser alta (Marcangeli *et al.*, 2005). No obstante, los porcentajes de

infestación post-tratamiento luego de la aplicación de Amivar® (amitraz) fueron ligeramente y muy elevados en los apiarios IV y apiarios I y II, respectivamente. Esta situación, junto con otras similares, generó gran preocupación en el sector apícola de la provincia por la posible existencia de poblaciones resistentes. De acuerdo con los resultados obtenidos en el laboratorio, los individuos provenientes de estos apiarios respondieron favorablemente a la CL₅₀ descartando la hipótesis de la existencia de poblaciones resistentes a este compuesto, dado que se observó un 100% de mortalidad.

La CL₅₀ estimada para flumetrina en el ensayo de exposición completa (apiario I) fue similar a concentraciones previamente reportadas en poblaciones susceptibles a este principio activo (Milani, 1995; Thompson *et al.*, 2002; Maggi *et al.*, 2008). Estos apiarios están incluidos en un esquema de rotación de principios activos, utilizan productos comerciales y realizan monitoreos en las colmenas antes y después de aplicar un tratamiento. Además, la inclusión de compuestos orgánicos en los momentos adecuados reduce la frecuencia de uso de los escasos acaricidas sintéticos disponibles. Nuestros resultados apoyan la idea de que el control de las poblaciones de *V. destructor* basado en estrategias de manejo integrado reduce la posibilidad de aparición de fenómenos de resistencia (Eguaras & Ruffinengo, 2006; Ruffinengo *et al.*, 2014).

En el apiario V se registró, luego de la aplicación de Flumevar® (flumetrina), un promedio de infestación post-tratamiento de 5,32%. Marcangeli & García (2003) y Schmidt *et al.* (2008) han reportado una disminución en la eficacia de productos como Bayvarol® (flumetrina) y la aparición de ciertos fenómenos de resistencia (Thompson *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2003; Rodríguez Dehaibes *et al.*, 2005). Sin embargo, los ácaros provenientes del apiario V presentaron una mortalidad mayor al 50% cuando fueron expuestos a la CL₅₀ estimada para poblaciones susceptibles (Milani, 1995; Maggi *et al.*, 2008). Resultados similares fueron reportados para la provincia de

Entre Ríos en Argentina y en Uruguay (Maggi, 2010) donde no fueron encontradas poblaciones resistentes a flumetrina.

La mortalidad de ácaros provenientes del apiario III fue la esperada para la aplicación de la CL₅₀ de cumafós. A pesar de que el porcentaje de infestación post-tratamiento fue muy elevado, estas poblaciones no presentaron indicios de resistencia. Cabe destacar que en este estudio, la mortalidad registrada para la CL₅₀ de cumafós fue la más baja y muy cercana al 50%. Además, el productor responsable del apiario mencionó que previo al otoño 2011, el uso de cumafós para controlar a *V. destructor* (formulación comercial y de producción casera) era abusivo y muy frecuente respecto a lo recomendado por los técnicos. Estudios previos han reportado casos de resistencia en Argentina (Maggi *et al.*, 2009) y en Uruguay (Maggi *et al.*, 2011) y reducción de la eficacia en el control de *V. destructor* en Estados Unidos (Pettis, 2004). Esto llevó a sugerir la suspensión momentánea del uso de este principio activo como medida preventiva para evitar profundizar el problema. No obstante, marcas comerciales de acaricidas y productos caseros a base de cumafós se encuentran disponibles y muchas veces son utilizados.

Los acaricidas liposolubles como el cumafós son estables y se acumulan en cera a lo largo del tiempo (Wallner & Fries, 2003; Chauzat & Faucon, 2007). Estas dosis sub-letales remanentes favorecen el desarrollo de poblaciones de ácaros resistentes (Johnson *et al.*, 2009; Maggi *et al.*, 2011). En apiarios donde no se ha detectado resistencia, igualmente el uso de cumafós debería alternarse con otros principios activos para prolongar su efectividad y prevenir la aparición de poblaciones resistentes (Maggi *et al.*, 2009).

Si bien no se detectaron poblaciones de ácaros resistentes en este estudio, los monitoreos realizados en 2013 revelaron la existencia de problemas asociados con los productos comúnmente utilizados para el control de *Varroa*. Posibles explicaciones

alternativas a los problemas generados en el control de *V. destructor* son: a) la presión de invasión del parásito generada por la presencia de varios apiarios en un radio de 1500 metros y que han sido reportados como no tratados durante el otoño; b) la mala aplicación del producto; c) una falla puntual de algún lote del producto comercial, sujeto a verificación con el distribuidor. Igualmente, existen casos donde a pesar de que se respeten las instrucciones de aplicación y se traten las colmenas con base en una estrategia zonal coordinada se registran niveles de parasitación post-tratamiento mayores al 1%. Cabe preguntarse qué papel juegan, con relación a la eficacia de un tratamiento, ciertas características asociadas al producto aplicado. El ritmo y la estabilidad en la liberación del principio activo y el tipo de soporte utilizado resultan fundamentales para que la aplicación sea efectiva. Es necesario revisar la eficacia de los productos comerciales aprobados disponibles e indagar sobre el rol que cumplen en los problemas asociados al control de *V. destructor*. En cualquier caso, esta presunción escapa a los alcances de esta tesis.

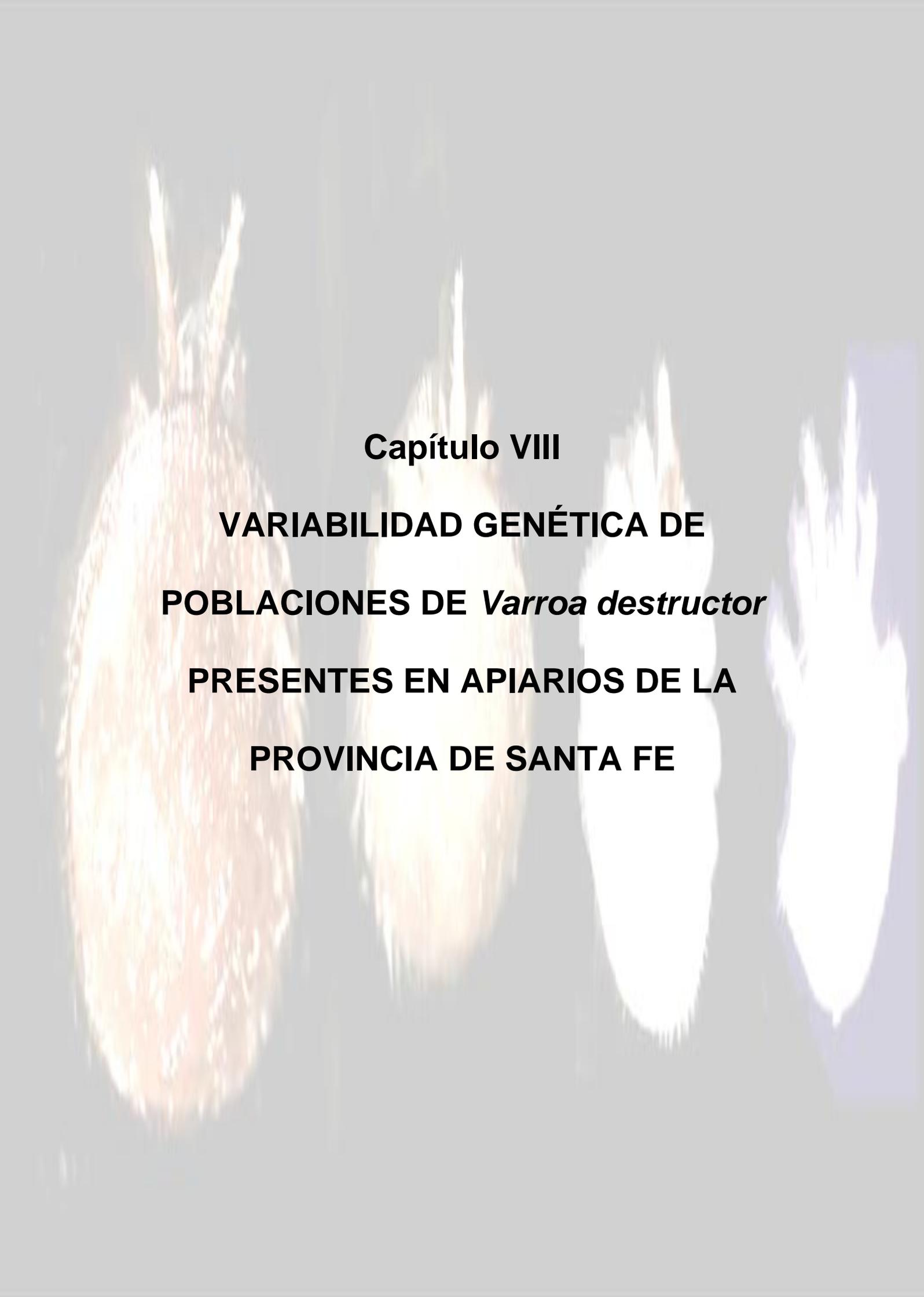
La disminución en la eficacia de los acaricidas sintéticos combinada con los residuos en cera y la resultante exposición a dosis sub-letales crónicas, son una clara demostración de que es necesario desarrollar enfoques alternativos para el manejo de *V. destructor* en el contexto de la apicultura comercial (Johnson *et al.*, 2009).

Se propone el desarrollo de programas de manejo basados en la rotación de acaricidas pertenecientes a grupos sin posibilidad de resistencia cruzada (Milani, 1999). Sin embargo, se han detectado casos de resistencia en apiarios con manejo basado en un esquema de rotación, lo que revela el potencial que tiene *V. destructor* para adaptarse continuamente a las presiones de selección (Maggi *et al.*, 2011) y la necesidad de profundizar en el planteo de soluciones a largo plazo (Dietemann *et al.*, 2012).

Diferentes acaricidas podrían aplicarse en diferentes estaciones del año, cada uno actuando por un plazo limitado de tiempo (Milani, 1999). El uso de productos alternativos como el ácido oxálico bajo ciertas condiciones es una buena opción para incluir en un esquema de rotación (Marcangeli *et al.*, 2003) o para bajar las cargas remanentes de un tratamiento sintético. Además, el momento y la dosis de aplicación de cualquier acaricida es importante en el desarrollo de poblaciones resistentes y el abuso o mal uso de las sustancias quimioterapéuticas debería ser evitado (Lodesani *et al.*, 2009). Por último, es importante alentar a los apicultores a que monitoreen sus propias colmenas para detectar fallas en los tratamientos o anticipar focos de resistencia (Thompson *et al.*, 2002) y que integren la quimioterapia con otras estrategias de control (Ruffinengo *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

- A pesar de haber detectado fallas severas en el control químico de *Varroa destructor*, no se encontraron poblaciones resistentes a los principales principios activos.
- Las poblaciones de *Varroa destructor* la provincia de Santa Fe mantienen un grado alto de susceptibilidad a las moléculas evaluadas. No obstante, se sugiere continuar monitoreando las colmenas con el objetivo de detectar potenciales focos de resistencia y evitar agravar el problema.
- Si bien la rotación de principios activos es una condición necesaria para evitar el desarrollo de poblaciones de ácaros resistentes, no resulta suficiente para impedir fallas en el control químico en etapas críticas como el otoño.



Capítulo VIII

VARIABILIDAD GENÉTICA DE

POBLACIONES DE *Varroa destructor*

PRESENTES EN APIARIOS DE LA

PROVINCIA DE SANTA FE

INTRODUCCIÓN

Varroa destructor (Anderson & Trueman), es un ectoparásito obligado de las abejas melíferas y representa una gran amenaza para la apicultura en todo el mundo. Este ácaro se ha desplazado desde *Apis cerana*, su huésped original, hacia *Apis mellifera* y ha alcanzado una distribución cosmopolita (Rosenkranz *et al.*, 2010). A partir de un detallado estudio morfométrico y genotípico sobre muestras de ácaros de todo el mundo, Anderson & Trueman (2000) describieron a *V. destructor* como una nueva especie, que parasita tanto *A. cerana* como *A. mellifera*. Es así como antes del año 2000, la mayor parte de la literatura científica se refiere a *V. destructor* como *V. jacobsoni*, aunque actualmente *V. jacobsoni* es una especie diferente que sólo parasita *A. cerana*.

Las primeras investigaciones sobre la variabilidad fenotípica de *V. destructor* se realizaron mediante análisis morfométricos y bioquímicos (Delfinado-Baker & Houck 1989; Issa, 1989; Nation *et al.*, 1992). Posteriormente, la variabilidad genética se estudió mediante marcadores moleculares como RAPD, RFLP y también mediante secuenciación (Kraus & Hunt, 1995; De Guzman *et al.*, 1997; 1998; Anderson & Fuchs, 1998). Anderson & Trueman (2000) exploraron la variabilidad de *V. destructor* y *V. jacobsoni* mediante el análisis de una secuencia corta correspondiente al gen mitocondrial *citocromo oxidasa I (cox1)* en muestras de ácaros provenientes de colmenas de *A. cerana* y *A. mellifera* de todo el mundo. Los autores detectaron 18 haplotipos mitocondriales: nueve pertenecientes a *V. jacobsoni*, seis de ellos pertenecientes a *V. destructor*, mientras que el otros tres haplotipos permanecieron sin clasificar. Sin embargo, sólo los haplotipos K (Corea) y J (Japón) pertenecientes a *V. destructor*, colonizan con éxito *A. mellifera*. El haplotipo K se distribuye en todo el mundo (Anderson, 2000; Anderson & Trueman, 2000; Solignac *et al.*, 2005), mientras que el haplotipo J se restringe a Japón, Tailandia y Brasil (Guzmán *et al.*, 1999; Anderson & Trueman, 2000). Recientemente, Guerra *et al.* (2010) detectaron la

presencia del haplotipo K en México, Cuba, Venezuela, Chile, Uruguay y Colombia. En Argentina, *V. destructor* se detectó por primera vez en la provincia de Formosa en el año 1976, en la zona fronteriza con Paraguay. Las evidencias indican que el ácaro fue introducido en Paraguay cuando apicultores de este país compraron abejas reinas de *A. mellifera* provenientes de Japón (De Jong *et al.*, 1982) y, posteriormente, se cree que el ácaro invadió el territorio argentino (Montiel & Piola, 1976). Desde entonces, este ácaro se ha diseminado a largo de Argentina produciendo un impacto negativo en la industria apícola (Eguaras & Ruffinengo, 2006).

Hasta el momento, solo el haplotipo K ha sido reportado en Argentina, según muestras analizadas provenientes de Buenos Aires (Anderson & Trueman 2000), Entre Ríos, Corrientes, Río Negro, Santa Cruz y Neuquén (Maggi *et al.*, 2012). Sin embargo, el estudio de los ácaros de otras regiones de Argentina podría revelar tanto la presencia del haplotipo J, especialmente en regiones cercanas a Brasil (De Jong & Goncalves, 1981; De Guzmán *et al.*, 1997) como la variabilidad dentro del ya detectado haplotipo K.

OBJETIVO

- Caracterizar a nivel molecular poblaciones de *Varroa destructor* presente en apiarios de la provincia de Santa Fe mediante el estudio de una región del ADN mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del material

El material analizado corresponde a ácaros provenientes de ocho apiarios de la provincia de Santa Fe, establecidos en cuatro eco-regiones diferentes: norte, sur, centro y costa. En cada región se seleccionaron dos apiarios que presentaban valores contrastantes en los niveles de infestación con *V. destructor* (alta prevalencia y baja

prevalencia), de acuerdo con el monitoreo provincial llevado a cabo en 2013. Se analizaron muestras individuales de ácaros procedentes de cada combinación (zona x prevalencia) por duplicado. El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica en el Instituto de Genética "Ewald Favret" (CNIA - INTA Castelar) con la colaboración de la Dra. Alejandra Scannapieco.

Procesamiento del material

Para la obtención del ADN se homogenizaron los ácaros individuales previamente conservados en etanol 70% a -20°C. Se siguió el protocolo de extracción de ADN según Baruffi (2005) con modificaciones realizadas en el Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica (INTA, Castelar). Al finalizar la extracción, se midió la concentración y pureza de las muestras de ADN mediante el uso de un espectrofotómetro para cuantificación de micro-volúmenes de muestra (ND1000). Una vez garantizada la calidad del ADN extraído, se procedió a su amplificación específica mediante PCR (1 µl de ADN, 20 µl de volumen final por reacción) usando cebadores específicos para el gen mitocondrial *citocromo oxidasa I* (*coxI*) según Navajas *et al.* (2010). El tamaño esperado del fragmento a amplificar es de 1166 pares de bases (pb). Las condiciones de ciclado se muestran en la Figura 8.1. Una vez finalizada la amplificación, se sembraron los productos de PCR (5 µl) en gel de agarosa (0,8%) y se realizó la electroforesis a 35mA durante 45 minutos. Se visualizaron las bandas mediante el uso de un foto-documentador UV. Posteriormente, se utilizó el método de elución en gel de agarosa para la purificación de los productos de PCR. Se sembraron los productos purificados para la visualización de bandas y se midió la concentración y pureza mediante ND 1000. Los productos purificados fueron procesados en el servicio de secuenciación de ADN de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, CICVyA - CNIA - INTA Castelar.

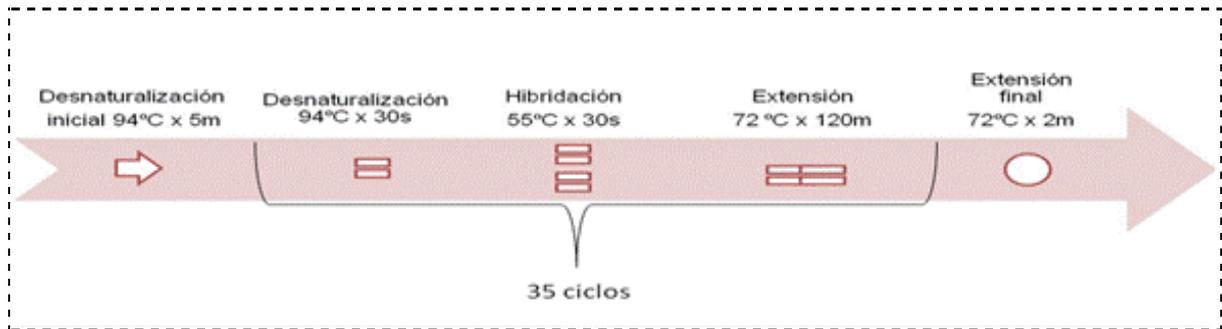


Figura 8.1 Condiciones de ciclado para amplificación de gen mitocondrial *cox I* de poblaciones de *Varroa destructor* provenientes de la provincia de Santa Fe.

Análisis de secuencias

Luego de la obtención de las secuencias de cada uno de los individuos analizados (en total 16 muestras correspondientes a ocho individuos), se realizó el alineamiento de las mismas con las secuencias publicadas en GeneBank para los haplotipos K y J (Anderson & Trueman, 2000; Solignac *et al.*, 2005) usando los programas BioEdit 7.2 y Pregap4 v 1.5 (Staden Package 1.6). El fragmento estudiado por Anderson & Trueman (2000) tiene una longitud de 458 pares de bases (haplotipos K y J: Genbank AN AF106899.1; AN AF106897.1) mientras que el descrito por Solignac *et al.* (2005) es de 824 pb (haplotipo J; Genbank AN AJ784872.1). Se realizó la asignación del haplotipo a cada muestra y la identificación de posibles sitios polimórficos.

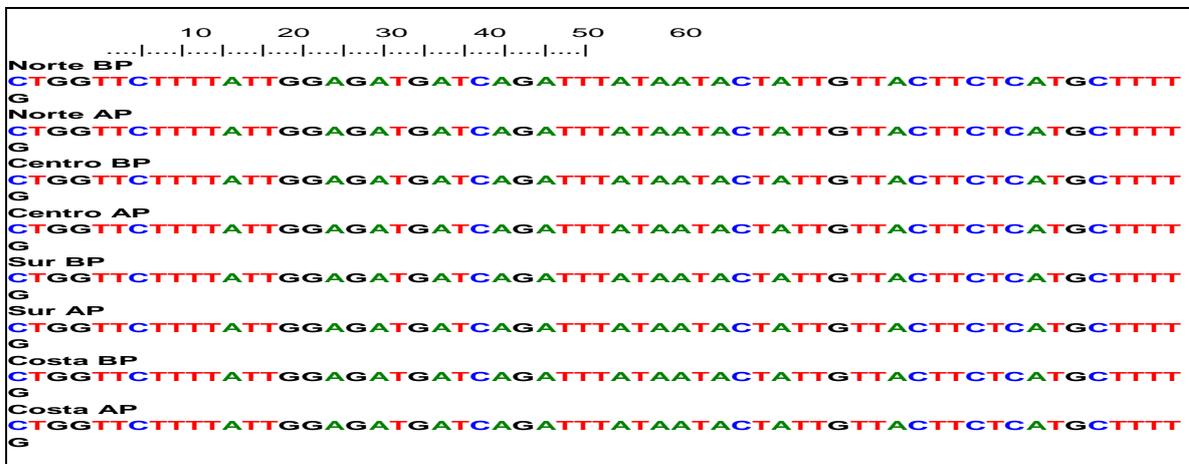
RESULTADOS

Se obtuvieron secuencias nucleotídicas de buena calidad de las 16 muestras analizadas correspondientes a los ocho apiarios de la provincia de Santa Fe, siendo posible contar con secuencias de 850 bases (Figura 8.2).



Figura 8.2. Cromatogramas obtenidos como resultado de la secuenciación correspondiente a las ocho muestras analizadas. Se muestra la región entre 300-310 pb.

El alineamiento de las mismas evidencia una identidad del 100%, sin sitios variables (Figura 8.3). El análisis conjunto de las secuencias obtenidas y las secuencias previamente publicadas se muestra en la Figura 8.4.



70 80 90 100 110 120
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Norte BP
 TAATAAATTTTTTTATAGTTATACCTGCTATAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGTTAGTT
 C

Norte AP
 TAATAAATTTTTTTATAGTTATACCTGCTATAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGTTAGTT
 C

Centro BP
 TAATAAATTTTTTTATAGTTATACCTGCTATAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGTTAGTT
 C

Centro AP
 TAATAAATTTTTTTATAGTTATACCTGCTATAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGTTAGTT
 C

Sur BP
 TAATAAATTTTTTTATAGTTATACCTGCTATAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGTTAGTT
 C

Sur AP
 TAATAAATTTTTTTATAGTTATACCTGCTATAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGTTAGTT
 C

Costa BP
 TAATAAATTTTTTTATAGTTATACCTGCTATAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGTTAGTT
 C

Costa AP
 TAATAAATTTTTTTATAGTTATACCTGCTATAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGTTAGTT
 C

130 140 150 160 170 180
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Norte BP
 CTTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATATAAGTTTTTGA
 T

Norte AP
 CTTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATATAAGTTTTTGA
 T

Centro BP
 CTTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATATAAGTTTTTGA
 T

Centro AP
 CTTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATATAAGTTTTTGA
 T

Sur BP
 CTTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATATAAGTTTTTGA
 T

Sur AP
 CTTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATATAAGTTTTTGA
 T

Costa BP
 CTTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATATAAGTTTTTGA
 T

Costa AP
 CTTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATATAAGTTTTTGA
 T

190	200	210	220	230	240
...					
Norte BP					
TATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAATTTTTCTTCCTTTATTGAAAGTGGAGTAGGT A					
Norte AP					
TATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAATTTTTCTTCCTTTATTGAAAGTGGAGTAGGT A					
Centro BP					
TATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAATTTTTCTTCCTTTATTGAAAGTGGAGTAGGT A					
Centro AP					
TATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAATTTTTCTTCCTTTATTGAAAGTGGAGTAGGT A					
Sur BP					
TATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAATTTTTCTTCCTTTATTGAAAGTGGAGTAGGT A					
Sur AP					
TATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAATTTTTCTTCCTTTATTGAAAGTGGAGTAGGT A					
Costa BP					
TATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAATTTTTCTTCCTTTATTGAAAGTGGAGTAGGT A					
Costa AP					
TATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAATTTTTCTTCCTTTATTGAAAGTGGAGTAGGT A					
310	320	330	340	350	360
...					
Norte BP					
ATTTAGGAAATTTTAAGTTTGCATTTAGCTGGAATCTCCTCTATTATAAGATCTATTAAT T					
Norte AP					
ATTTAGGAAATTTTAAGTTTGCATTTAGCTGGAATCTCCTCTATTATAAGATCTATTAAT T					
Centro BP					
ATTTAGGAAATTTTAAGTTTGCATTTAGCTGGAATCTCCTCTATTATAAGATCTATTAAT T					
Centro AP					
ATTTAGGAAATTTTAAGTTTGCATTTAGCTGGAATCTCCTCTATTATAAGATCTATTAAT T					
Sur BP					
ATTTAGGAAATTTTAAGTTTGCATTTAGCTGGAATCTCCTCTATTATAAGATCTATTAAT T					
Sur AP					
ATTTAGGAAATTTTAAGTTTGCATTTAGCTGGAATCTCCTCTATTATAAGATCTATTAAT T					
Costa BP					
ATTTAGGAAATTTTAAGTTTGCATTTAGCTGGAATCTCCTCTATTATAAGATCTATTAAT T					
Costa AP					
ATTTAGGAAATTTTAAGTTTGCATTTAGCTGGAATCTCCTCTATTATAAGATCTATTAAT T					

370 380 390 400 410 420
 ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|

Norte BP
 TTATTGCTACTATTTTAAATATACGTGTAAAGGGGATAAATCTTGAAATAATGCCTTT
 AT

Norte AP
 TTATTGCTACTATTTTAAATATACGTGTAAAGGGGATAAATCTTGAAATAATGCCTTT
 AT

Centro BP
 TTATTGCTACTATTTTAAATATACGTGTAAAGGGGATAAATCTTGAAATAATGCCTTT
 AT

Centro AP
 TTATTGCTACTATTTTAAATATACGTGTAAAGGGGATAAATCTTGAAATAATGCCTTT
 AT

Sur BP
 TTATTGCTACTATTTTAAATATACGTGTAAAGGGGATAAATCTTGAAATAATGCCTTT
 AT

Sur AP
 TTATTGCTACTATTTTAAATATACGTGTAAAGGGGATAAATCTTGAAATAATGCCTTT
 AT

Costa BP
 TTATTGCTACTATTTTAAATATACGTGTAAAGGGGATAAATCTTGAAATAATGCCTTT
 AT

Costa AP
 TTATTGCTACTATTTTAAATATACGTGTAAAGGGGATAAATCTTGAAATAATGCCTTT
 AT

430 440 450 460 470 480
 ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|

Norte BP
 TTGTATGGTCTGTTTTTATTACTACTATTTTATTATTATTATCTTTGCCTGTTTTAGCTG

Norte AP
 TTGTATGGTCTGTTTTTATTACTACTATTTTATTATTATTATCTTTGCCTGTTTTAGCTG

Centro BP
 TTGTATGGTCTGTTTTTATTACTACTATTTTATTATTATTATCTTTGCCTGTTTTAGCTG

Centro AP
 TTGTATGGTCTGTTTTTATTACTACTATTTTATTATTATTATCTTTGCCTGTTTTAGCTG

Sur BP
 TTGTATGGTCTGTTTTTATTACTACTATTTTATTATTATTATCTTTGCCTGTTTTAGCTG

Sur AP
 TTGTATGGTCTGTTTTTATTACTACTATTTTATTATTATTATCTTTGCCTGTTTTAGCTG

Costa BP
 TTGTATGGTCTGTTTTTATTACTACTATTTTATTATTATTATCTTTGCCTGTTTTAGCTG

Costa AP
 TTGTATGGTCTGTTTTTATTACTACTATTTTATTATTATTATCTTTGCCTGTTTTAGCTG

490 500 510 520 530 540
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Norte BP
 GAGCTATTACAATAATTGTTAACAGATCGAAATTTTAATACTACATTTTTTGATCCTAG
 AG

Norte AP
 GAGCTATTACAATAATTGTTAACAGATCGAAATTTTAATACTACATTTTTTGATCCTAG
 AG

Centro BP
 GAGCTATTACAATAATTGTTAACAGATCGAAATTTTAATACTACATTTTTTGATCCTAG
 AG

Centro AP
 GAGCTATTACAATAATTGTTAACAGATCGAAATTTTAATACTACATTTTTTGATCCTAG
 AG

Sur BP
 GAGCTATTACAATAATTGTTAACAGATCGAAATTTTAATACTACATTTTTTGATCCTAG
 AG

Sur AP
 GAGCTATTACAATAATTGTTAACAGATCGAAATTTTAATACTACATTTTTTGATCCTAG
 AG

Costa BP
 GAGCTATTACAATAATTGTTAACAGATCGAAATTTTAATACTACATTTTTTGATCCTAG
 AG

Costa AP
 GAGCTATTACAATAATTGTTAACAGATCGAAATTTTAATACTACATTTTTTGATCCTAG
 AG

550 560 570 580 590 600
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Norte BP
 GTGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGACACCCAGAAGT
 TT

Norte AP
 GTGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGACACCCAGAAGT
 TT

Centro BP
 GTGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGACACCCAGAAGT
 TT

Centro AP
 GTGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGACACCCAGAAGT
 TT

Sur BP
 GTGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGACACCCAGAAGT
 TT

Sur AP
 GTGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGACACCCAGAAGT
 TT

Costa BP
 GTGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGACACCCAGAAGT
 TT

Costa AP
 GTGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGACACCCAGAAGT
 TT

610 620 630 640 650 660
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Norte BP
 ATATTTTAAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAAGAGGG
 A

Norte AP
 ATATTTTAAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAAGAGGG
 A

Centro BP
 ATATTTTAAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAAGAGGG
 A

Centro AP
 ATATTTTAAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAAGAGGG
 A

Sur BP
 ATATTTTAAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAAGAGGG
 A

Sur AP
 ATATTTTAAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAAGAGGG
 A

Costa BP
 ATATTTTAAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAAGAGGG
 A

Costa AP
 ATATTTTAAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAAGAGGG
 A

670 680 690 700 710 720
|.....|.....|.....|.....|.....|

Norte BP
 AGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTT
 AG

Norte AP
 AGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTT
 AG

Centro BP
 AGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTT
 AG

Centro AP
 AGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTT
 AG

Sur BP
 AGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTT
 AG

Sur AP
 AGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTT
 AG

Costa BP
 AGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTT
 AG

Costa AP
 AGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTT
 AG

730 740 750 760 770 780
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Norte BP
 GTTTTATTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGC
 AT

Norte AP
 GTTTTATTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGC
 AT

Centro BP
 GTTTTATTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGC
 AT

Centro AP
 GTTTTATTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGC
 AT

Sur BP
 GTTTTATTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGC
 AT

Sur AP
 GTTTTATTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGC
 AT

Costa BP
 GTTTTATTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGC
 AT

Costa AP
 GTTTTATTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGC
 AT

790 800 810 820 830 840
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Norte BP
 ATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCCTACTGGTATTAAAAATTTTTCTTGA
 T

Norte AP
 ATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCCTACTGGTATTAAAAATTTTTCTTGA
 T

Centro BP
 ATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCCTACTGGTATTAAAAATTTTTCTTGA
 T

Centro AP
 ATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCCTACTGGTATTAAAAATTTTTCTTGA
 T

Sur BP
 ATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCCTACTGGTATTAAAAATTTTTCTTGA
 T

Sur AP
 ATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCCTACTGGTATTAAAAATTTTTCTTGA
 T

Costa BP
 ATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCCTACTGGTATTAAAAATTTTTCTTGA
 T

Costa AP
 ATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCCTACTGGTATTAAAAATTTTTCTTGA
 T

```

      ....|..
Norte BP  TAGCAAC
Norte AP  TAGCAAC
Centro BP TAGCAAC
Centro AP TAGCAAC
Sur BP    TAGCAAC
Sur AP    TAGCAAC
Costa BP  TAGCAAC
Costa AP  TAGCAAC

```

Figura 8.3. Alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondientes a muestras de las cuatro zonas analizadas: norte, centro, sur y costa. BP: muestras provenientes de apiarios con baja prevalencia de *V. destructor*; AP: muestras provenientes de apiarios con alta prevalencia de *V. destructor* (Bioedit-Sequence Alignment Editor).

Se puede observar que todas las muestras analizadas (secuencia consenso) corresponden al haplotipo K. La región caracterizada evidencia cuatro sitios variables entre los haplotipos K y J (Figura 8.4).

c)

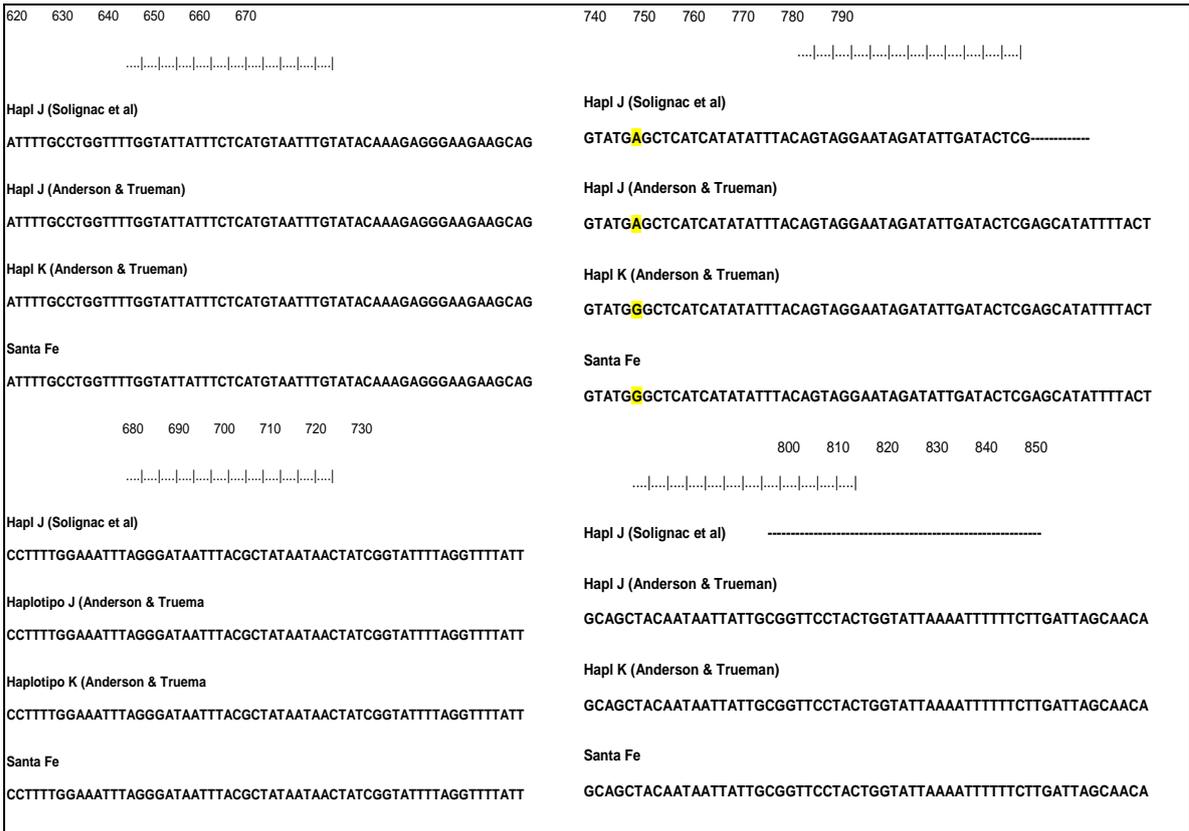


Figura 8.4 Alineamiento de la secuencia consenso obtenida a partir de muestras individuales de *V. destructor* provenientes de Santa Fe y las secuencias previamente publicadas por Solignac *et al.* (2005) de 824 pares de bases; y Anderson & Trueman (2000) de 458 pares de bases. a) Secuencias desde 140-370 pb. b) 380-610 pb. c) 620-850 pb. En amarillo se resaltan los nucleótidos variables entre haplotipos.

DISCUSIÓN

Un punto clave con relación al parasitismo es en qué grado las diferencias existentes en la reproducción y crecimiento de las poblaciones de *Varroa destructor* entre las colmenas se deben a características del hospedador o del parásito. La tolerancia a mayores niveles de *V. destructor* podría reflejar el comportamiento más benigno o maligno de diferentes haplotipos del parásito (Garrido *et al.*, 2003). Sin embargo, las diferencias en los niveles de infestación con *V. destructor* registrados en colmenas de la provincia de Santa Fe parecerían no ser explicados por diferencias genéticas del parásito. Esto concuerda con estudios publicados anteriormente que revelaron una ausencia total de polimorfismo de ADN mitocondrial en *V. destructor* fuera de Asia

(Garrido *et al.*, 2003; Navajas *et al.*, 2010; Gajic *et al.*, 2013) y una distribución cosmopolita del haplotipo K en Argentina (Maggi *et al.*, 2012).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, no se detectaron sitios polimórficos ni variantes entre las secuencias nucleotídicas analizadas de las poblaciones de *V. destructor* de la provincia de Santa Fe. Las secuencias obtenidas son concordantes en un 100% con una región del gen *COX I* de *V. destructor* reportadas por Anderson & Truman (2000) (GenBank AN AF106899.1) para el haplotipo coreano (K). El fragmento analizado permitió evidenciar 4 sitios polimórficos entre los haplotipos K y J, aunque es necesario el estudio de otros marcadores para detectar sub-tipos dentro del haplotipo K en particular para muestras de ácaros de Argentina donde prevalece este haplotipo (Maggi *et al.*, 2012). El uso de marcadores genéticos con una resolución más fina que los marcadores de ADN mitocondrial permitirá revelar más detalles acerca de las diferencias en las poblaciones de *V. destructor* (Garrido *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

- Las poblaciones de *Varroa destructor* provenientes de distintas zonas de la provincia de Santa Fe no presentan diferencias a nivel molecular cuando se comparan las secuencias amplificadas para el gen mitocondrial *citocromo oxidasa I (cox1)*.
- Las diferencias entre altos y bajos niveles de infestación con *Varroa destructor* en las diferentes zonas de Santa Fe no se asocia con diferencias en las secuencias nucleotídicas estudiadas en la región mitocondrial propuesta.



DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Varroa destructor es una de las principales amenazas para las poblaciones de *Apis mellifera*. Encuestas a apicultores y estudios publicados previamente sugieren que *Varroa* y patógenos asociados son responsables junto con fenómenos climáticos y problemas nutricionales de la pérdida masiva de colmenas (vanEngelsdorp *et al.*, 2008; 2010; 2012a; Smith *et al.*, 2013). Evitar que las poblaciones de *A. mellifera* disminuyan es de radical importancia no solo por la miel que producen, sino también por los otros productos que se obtienen de la colmena y particularmente por su rol como polinizadores. Además, el manejo y movimiento de colmenas contribuye tanto a la transmisión intra-específica de enfermedades como a la ocurrencia de patógenos emergentes en polinizadores silvestres (Fürst *et al.*, 2014).

Un enfoque epidemiológico identifica factores que contribuyen a la ocurrencia de una enfermedad, respalda y promueve alternativas para reducir la exposición a los factores de riesgo y busca reducir la incidencia de dicha enfermedad en una población (vanEngelsdorp *et al.*, 2012b). Los estudios longitudinales de vigilancia epidemiológica son una herramienta de gran alcance para cuantificar la asociación entre un factor de riesgo y la probabilidad de que una enfermedad alcance cierto nivel en el futuro (Lee *et al.*, 2015). En este sentido, los resultados de la presente tesis aportan información acerca de la dinámica de los niveles de *Varroa* a lo largo del tiempo, con relación a la exposición a ciertos factores, principalmente de manejo.

A lo largo del año, hemos observado que el nivel de parasitación con *V. destructor* en un determinado momento se encontraba asociado con la condición de infestación que presentaban las colmenas en una etapa previa (Figura 1).

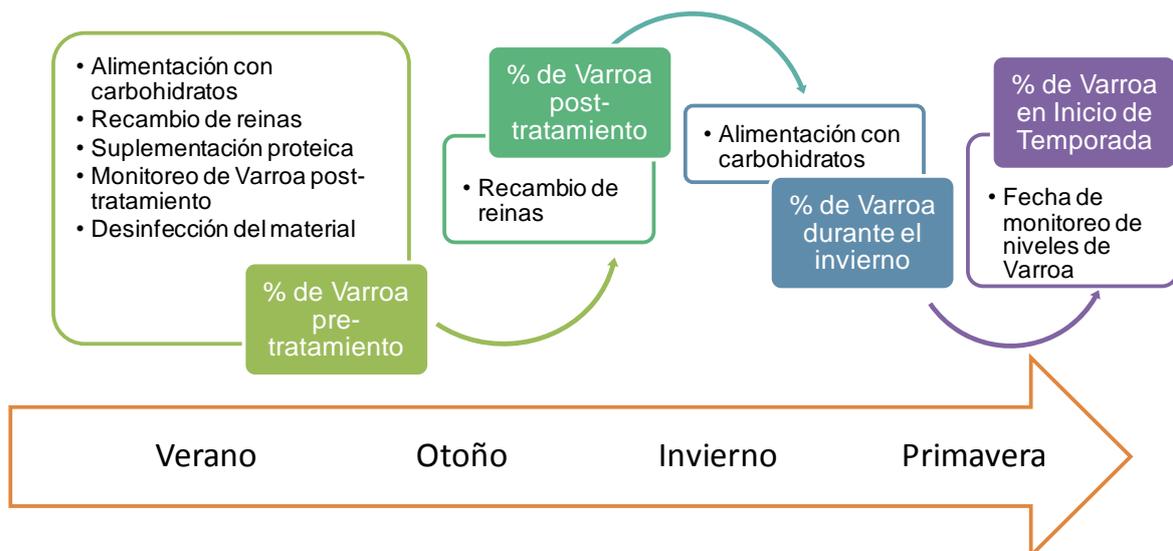


Figura 1. Relación entre los niveles de parasitación con *Varroa destructor* y sus factores de riesgo asociados a lo largo del ciclo productivo en colmenas de *Apis mellifera* de la provincia de Santa Fe.

Cuando los niveles de parasitación en otoño, antes de la aplicación de un tratamiento, no superaron el 3% de VF la probabilidad de que los niveles post-tratamiento superen el 1% fue menor. Paralelamente, es más probable mantener niveles de parasitación durante el invierno por debajo del 1% si el porcentaje de la etapa post-tratamiento no superó dicho umbral. Esto indicaría además, que la aplicación de una buena estrategia de control de Varroa durante el otoño es clave para prevenir pérdidas invernales. Por último, si los niveles en invierno fueron bajos (no mayores al 1%), la probabilidad de superar el 2% de VF al inicio de la temporada fue menor, lo que resulta trascendental considerando que es el comienzo de la etapa más favorable para el desarrollo del parásito. Esta concatenación entre los niveles de Varroa a lo largo del año, se encuentra enmarcado en el contexto del manejo que cada apicultor aplica en su apiario. Existen ciertos factores que contribuyen a mantener niveles bajos del parásito en las etapas claves del ciclo productivo, entre los cuales los más importantes son la alimentación con carbohidratos, la suplementación proteica, el recambio periódico de reinas y el monitoreo de los niveles de Varroa.

Al mismo tiempo, se evaluó el rol que cumplen ciertas características propias de *Varroa* sobre los niveles de parasitación que presentan las colmenas. La variación en los porcentajes de parasitación registrados en los apiarios de Santa Fe no parece explicarse por diferencias genéticas propias del parásito así como tampoco por la presencia de fenómenos de resistencia a los principios activos utilizados en su control.

Para controlar las poblaciones de *V. destructor* se propone el desarrollo de un programa de manejo integrado de plagas (MIP) que permita abordar la problemática desde alternativas complementarias y evitar depender exclusivamente de los tratamientos químicos (Sammataro *et al.*, 2000). Los resultados resumidos anteriormente aportan información importante para diseñar estrategias de control integral de las enfermedades de la colmena. El *Bee Informed Partnership* (BIP) es una iniciativa estadounidense que propone utilizar datos epidemiológicos para identificar factores de riesgo asociados con la pérdida masiva de colmenas. Dentro de este proyecto, una de las propuestas es obtener datos sobre el diagnóstico de las enfermedades de la colmena asociados con información sobre las mejores prácticas de manejo para reducir el uso de productos químicos (vanEngelsdorp *et al.*, 2012b).

Este trabajo ofrece una visión holística del problema epidemiológico registrado en los apiarios de la provincia de Santa Fe. En el mismo, se integra el conocimiento sobre el efecto que tienen los factores ambientales, de manejo e intrínsecos del parásito sobre la presencia de Varroosis en colmenas productoras de miel. Además, se indaga acerca de la relación que existe entre estos factores y la distribución espacial de la parasitosis.

Es imprescindible completar y profundizar el conocimiento científico con relación al impacto que el manejo de las colmenas junto con factores ambientales tienen sobre la dinámica de las principales enfermedades de *Apis mellifera* (Smith *et al.*, 2013).



**CONCLUSIONES GENERALES Y
PERSPECTIVAS FUTURAS**

CONCLUSIONES GENERALES

- La correlación observada entre el porcentaje de infestación con *Varroa destructor* en cría y el porcentaje de infestación en abejas adultas (forética) permite utilizar este último como estimador de la situación sanitaria de las colmenas.
- El manejo nutricional de las colmenas es un factor clave para mantener niveles de infestación con *V. destructor* por debajo del umbral de daño durante el otoño y el invierno.
- La calidad y la edad de la reina regulada por el manejo a través del recambio de reinas determina el desempeño general de las colmenas e influye particularmente sobre la prevalencia de colmenas con altos porcentajes de *V. destructor* durante todo el año y la mortalidad de colmenas en invierno.
- El manejo nutricional y el recambio de reinas tienden a disminuir el porcentaje de infestación con *V. destructor* al inicio de temporada, ayudando a mantener los niveles poblacionales por debajo del umbral en diferentes momentos clave del año. La distribución espacial de *Varroa destructor* no es uniforme a lo largo de la región de estudio. Las agrupaciones de colmenas identificadas están más asociadas con ciertas prácticas de manejo que con características ambientales propias de la zona geográfica.
- Las poblaciones de *Varroa destructor* de la provincia de Santa Fe mantienen un grado alto de susceptibilidad a las moléculas acaricidas evaluadas. No obstante, se sugiere continuar monitoreando las colmenas con el objetivo de detectar potenciales focos de resistencia.
- Las poblaciones de *Varroa destructor* provenientes de distintas zonas de la provincia de Santa Fe no presentan diferencias a nivel molecular cuando se comparan las secuencias amplificadas para el gen mitocondrial *citocromo oxidasa I (cox1)*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Los resultados obtenidos permitieron describir la asociación entre algunos factores de riesgo y la prevalencia de colmenas con altos porcentajes de infestación con *Varroa destructor*. Desde un enfoque epidemiológico, el paso siguiente consiste en evaluar en forma experimental el efecto que cada una de esas prácticas tiene sobre los porcentajes de infestación. Es necesario profundizar en los mecanismos a través de los cuales, el manejo nutricional y el recambio de reinas contribuyen a mantener cargas parasitarias por debajo de los umbrales establecidos. Además, sería interesante desde la perspectiva del MIP, integrar el recambio de reinas con programas de selección de ecotipos de abejas con características de tolerancia a *V. destructor*.
- Es importante estudiar si la asociación de los factores de manejo con los porcentajes de parasitación con *V. destructor* identificados en este estudio también ocurre en zonas geográficas más contrastantes, incluyendo regiones sub-tropicales del norte de Argentina. Al mismo tiempo, es necesario incluir en la determinación de la condición sanitaria de las colmenas otras enfermedades que posiblemente estén interactuando con Varroosis, como Nosemosis y la presencia de virus.
- Los análisis para la identificación de poblaciones resistentes a los acaricidas son una herramienta fundamental dentro de un sistema de vigilancia epidemiológica. En el marco de estos programas de vigilancia, es necesario contar con información sobre la eficacia de los tratamientos aplicados y evaluar el grado de resistencia de las poblaciones donde se detectan fallas en el control de la Varroosis.
- Dado que la secuenciación de la región genética analizada no presenta variabilidad, es necesario explorar e identificar nuevos marcadores moleculares que evidencien polimorfismos y permitan asociar las poblaciones de *V. destructor* con su grado de virulencia.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACDICAR. 2010. Revisión de Colmenas. Período otoño 2010. Asociación Civil para el Desarrollo y la Innovación Agencia Rafaela, pp. 41.
- Akyol E., Yeninar H., Karatepe M., Karatepe B. & Öskök D. 2007. Effects on queen ages on *Varroa* (*Varroa destructor*) infestation level in honey bee (*Apis mellifera caucasica*) colonies and colony performance. Italian Journal of Animal Science 6:143-149.
- Aldea P., Olivares A. & Rodríguez R. 2012. Efficacy evaluation of organic treatments against *Varroa* mite in different climatic zones of Chile. 5th EUROPEAN CONFERENCE OF APIDOLOGY (p. 217), 3-7th September 2012. Halle an der Saale, Germany.
- Amdam G.V., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A. & 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? J. Econ. Entomol. 97(3): 741-747.
- Anderson D.L. & Fuchs S. 1998. Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. J Apic Res 37: 69–78
- Anderson D.L. & Trueman J.W.H. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp Appl Acarol 24:165–189
- Anderson D.L. 2000. Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 31:281–292
- Antúnez K., Anido M., Branchiccela B., Harriet J., Campa J., Invernizzi C., Santos E., Higes M., Martín-Hernández R. & Zunino P. 2015. Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. Microb Ecol: DOI 10.1007/s00248-015-0594-7.
- Arzamendia V. & Giraud A.R. 2004. Usando patrones de biodiversidad para la evaluación y diseño de áreas protegidas: las serpientes de la Provincia de Santa Fe (Argentina) como ejemplo. Revista. Chil. Hist. Nat. 77: 335-348.
- Auchincloss A.H., Gebreab S.Y., Mair C. & Diez Roux A.V. 2012. Review of Spatial Methods in Epidemiology, 2000–2010. Annu. Rev. Public Health 33: 107–22.
- Barker R.J. & Lehner Y. 1978. Laboratory comparison of high fructose Corn syrup, grape syrup, honey, and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees. Apidologie 9 (2): 111-116.

Baruffi L., Damián G., Guglielmino C., Malacrida A. & Gasperi G. 1995. Polymorphism within and between population of *Ceratitis capitata*. Comparasion between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity* 74: 425-437.

Basualdo M., Barragán S., Vanagas I., García C., Solana H., Rodríguez E. & Bedascarrasbure E. 2013. Conversion of high and low pollen protein diets into protein in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econom. Entomol* 106 (4): 1553-1558.

Basualdo M., Barragán S., & Antúnez K. 2014. Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environ. Microbiol. Rep.* doi:10.1111/1758-2229.12169

Blengino C. 2013. Informe de coyuntura sector apícola 2013. Área de Estudios Sectoriales. Dirección de Agroalimentos. Consultado on line 12 de mayo de 2015 en http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/otros/apicola/informes/2013_02Feb.pdf

Blengino C. 2014. Informe de coyuntura sector apícola 2014. Área de Estudios Sectoriales. Dirección de Agroalimentos. Consultado on line 12 de mayo de 2015 en <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/otros/apicola/informes/2014.pdf>

Boecking O. & Genersch E. 2008. Varroosis: The Ongoing Crisis in Bee Keeping. *J. Consum. Prot. Foo. Saf.* DOI 10.1007/s00003-008-0331-y

Bogdanov S. 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37: 1-18.

Bolker B.M. 2008. *Ecological Models and Data in R*. Princeton University Press. Gran Bretaña, 382 pp.

Botías C., Martín-Hernández R., Días J., García-Palencia P., Matabuena M., Juarranz A., Barrios L., Meana A., Nanetti A. & Higes M. 2012. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ. Microbiol.* 14 (4): 845-859.

Branco M.R., Kidd N.A.C. & Pickard R.S. 2006. A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population estimation. *Apidologie* 37: 452-461.

Brodscheneider R. & Crailsheim K. 2010. Nutrition and health in Honey bees. *Apidologie* 41: 278-294.

Brodschneider R., Moosbeckhofer R. & Crailsheim K. 2010. Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *J. Apic. Res.* 49 (1): 23-30. DOI 10.3896/IBRA.1.49.1.04

Bruno S.B. 2003. "Enfermedades de las abejas. Nociones practicas." Ed. Ciencias y abejas. Buenos Aires. 104 pp.

Buchler R., Drescher W. & Tournier I. 1992. Grooming behavior of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata*, reacting to *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Exp Appl. Acarol.* 16: 313-319.

Bulacio Cagnolo N. 2011. Manejo Integrado de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) en colonias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en el centro oeste de la provincia de Santa Fe. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Bulacio Cagnolo N., Basualdo M. & Eguaras M. 2010. Actividad varroocida del timol en colonias de *Apis mellifera* L. de la provincia de Santa Fe. *InVet* 12 (1):85-90

Burkart R., Bárbaro N.O., Sánchez R.O. & Gómez D.A. 1999. Ecoregiones de la Argentina, Buenos Aires. Administración de Parques Nacionales. Online: http://www.sib.gov.ar/archivos/Eco-Regiones_de_la_Argentina.pdf (consultado el 10 Diciembre de 2012).

Calatayud Tortosa F. 2002. La varroosis de las abejas: nuevos conocimientos y su aplicación práctica. <http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/sanidad/varroa/varroosis.pdf> (consultado en setiembre de 2009).

Calderón R.A. & van Veen J.W. 2008. *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Costa Rica: population dynamics and its influence on the colony condition of Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Rev. Biol. Trop.* Vol. 56 (4): 1741-1747.

Calderone N. W. & Kuenen L.P.S. 2003. Differential tending of worker and drone larvae of the honey-bee, *Apis mellifera*, during the 60 hours prior to cell capping. *Apidologie* 34: 543-552.

- Calderone N.W. 2005. Evaluation of drone brood removal for management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern United States. *J. Econ Entomol.* 98 (3): 645-50.
- Calderone N.W., Lin S. & Kuenen L.P.S. 2002. Differential infestation of honey bee, *Apis mellifera*, worker and queen brood by the parasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* 33: 389-398.
- Calis J.N.M., Fries I. & Ryrie S.C. 1999 Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30: 111-124.
- Carneiro F.E., Torres R.R., Strapazon R., Ramirez S.A., Guerra J.C.V., Kolling D.F. & Moretto G. 2007. Changes in reproductive ability of the mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera-. Apidae) colonies in southern Brazil. *Neo. Entomol.* 36(6): 949-952.
- Charriere J.D. & Imdorf A. 2002. Oxalic acid treatment by trickling against *Varroa destructor*: recommendations for use in central Europe and under temperate climate conditions. *Bee World* 83 (2): 51–60.
- Castignani H. 2011. Zonas Agroeconómicas Homogéneas de Santa Fe. Estudios socioeconómicos de la sustentabilidad de los sistemas de producción y recursos naturales. Eds INTA (ISSN 1851-6955) 161 pp.
- Chauzat M.P. & Faucon J.P. 2007. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Manag Sci* 63:1100–1106.
- Chen Y.P. & Siede R. 2007. Honey Bee Viruses. *Adv. Virus Res.* 70: DOI: 10.1016/S0065-3527(07)70002-7.
- Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* 20:37-46.
- CONASA. 2002. Recomendaciones para el control de *Varroa*. Online: <http://www.apinetla.com.ar/ar/sanidad/conasa.htm> (Consultado en Marzo 2011).
- Cook N.R. & Ware J.H. 1983. Design and analysis methods for longitudinal research. *Annual Review of Public Health* 4(1): 1-23.
- Currie R.W. & Gatién P. 2006. Timing acaricide treatments to prevent *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *Can. Entomol.* 138: 238–252.

- Currie R.W., Pernal S.F. & Guzmán-Novoa E. 2010. Honey bee colony losses in Canada. *J. of Apic. Res.* 49(1): 104-106. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.18
- Dainat B., Evans J.D., Chen Y.P., Gauthier L. & Neumann P. 2012. Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (4): 981–987.
- Daszak P., Cunningham A.A. & Hyatt A.D. 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife: Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* DOI 10.1126/science.287.5452.443
- De Grandi Hoffman G., Chen Y., Huang E. & Huang M.H. 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect. Physiol.* 56: 1184-1191.
- De Grandi Hoffman G., Wardell G., Ahumada Segura F., Rinderer T., Danka R. & Pettis J. 2008. Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *J. Apic. Res.* 47 (4): 265-270.
- De Guzman L.I., Rinderer T.E. & Frake A.M. 2007. Growth of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) Populations in Russian Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100 (2): 187-195.
- De Guzman L.I., Rinderer T.E. & Stelzer J.A. 1997. DNA evidence of the origin of *Varroa jacobsoni* Oudemans in the Americas. *Biochem. Genet.* 35: 327–335
- De Guzman L.I., Rinderer T.E., Stelzer J.A. & Anderson D. 1998 Congruence of RAPD and mitochondrial DNA markers in assessing *Varroa jacobsoni* genotypes. *J. Apic. Res.* 37: 49–51
- De Jong D. & De Jong P. 1983. Longevity of Africanized Honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes:Varroidae), *J. Econ. Entomol.* 76: 766–768.
- De Jong D. 1997. Mites: varroa and other parasites of brood. In: Honey bee pests, predators and diseases. Morse R.A. & Flottum, K. (Eds.) USA. pp 279-327.
- De Jong D., Goncalves L.S. & Morse, R.A. 1984. Dependence on climate of the virulence of *V. jacobsoni*. *Bee World* 65: 117-121.

- De Jong D., Morse R.A. & Eickwort G.C. 1982. Mite pests of honey bees. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 229- 252.
- De Jong D. & Goncalves L.S. 1981. Varroa problem in Brazil. *American Bee Journal* 121:186-189
- Delaplane K.S & Hood W.M. 1999. Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA. *Apidologie* 30: 383-395.
- Delaplane K., Berry J., Skinner J., Parkman J. & Hood W.M. 2005. Integrated pest management against *Varroa destructor* reduces colony mite levels and delays treatment threshold. *J. Apic. Res.* 44 (4): 157-162.
- Delaplane K., Van der Steen J. & Guzmán-Novoa E. 2013. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J. Apic. Res.* 52(1): doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.03.
- Delfinado-Baker M. & Houck M.A. 1989. Geographic variation in *Varroa jacobsoni* (Acari Varroidae): application of multivariate morphometric techniques. *Apidologie* 20:345–358.
- Delfinado-Baker M. 1988. The tracheal mite of honey bees: a crisis in beekeeping, in: Needham G., Page R., Delfinado-Baker M., Bowman C. (Eds.), *Africanized honey bees and bee mites*, Halsted Press, Chichester, England, pp. 493–497.
- Delgado Rodríguez M. & Llorca Díaz J. 2004. Estudios longitudinales: concepto y particularidades. *Rev Esp Salud Pública* 78: 141-148.
- Departamento de Agricultura de la provincia de Santa Fe. 2008. Cadena apícola santafecina Online:
URL:<http://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/66066/320676/file/descargar.pdf> (consultado el 18 de Marzo de 2013).
- 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. & Ellis J.D. 2013. Standard methods for Varroa research. In Dietemann V., Ellis J.D., Neumann P. (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research.* *J. Apic. Res.* 52 (1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>.

- Dietemann V., Pflugfelder J., Anderson D., Charrière J.D., Chejanovsky N. *et al.* 2012. *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. *Journal of Apicultural Research* 51 (1): 125-132.
- Dohoo I., Ducrot C., Fourichon C., Donald A. & Hurnik D. 1996. An overview of techniques for dealing with large number of independent variables in epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.* 29: 221-239.
- Dohoo I., Martin W. & Stryhn H. 2003. *Veterinary epidemiologic research*. Charlottetown (Canada): AVC.
- Donzé G. & Guerin P.M. 1994. Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34: 305-319.
- Duay P., De Jong D. & Engels W. 2003. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 34: 61-65.
- Dustmann J.H. 1993. Natural defense mechanisms of a Honey bee colony against diseases and parasites. *Am Bee J.* 133: 431-4.
- Eguaras M. & Ruffinengo S. 2006. *Estrategias para el control de Varroa*. Editorial Martín, Mar del Plata, Argentina. pp 149
- Eguaras, M.J. 1993. Investigaciones sobre el ácaro parasito *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: gamasida) y su hospedador *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Elzen P.J., Baxter J.R., Spivak M. & Wilson W.T. 2000. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* 31: 437-441.
- Elzen P.J., Eischen F.A., Baxter J.R., Elzen G.W. & Wilson W.T. 1999. Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud (Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie* 30: 13-17.
- Feder G., Just R.E. & Zilberman D. 1985. Adoption of Agricultural Innovation in Developing Countries: A Survey. *Econ. Dev. Cult. Change.* 33: 255-298.
- Field C.J., Johnson I.R. & Schley P.D. 2002. Nutrients and their role in host resistance to infection. *J. Leukoc. Biol.* 71: 16-32.

Flores Serrano J.M., Padilla Álvarez F. & Pérez Ruíz A. 2007. Aspectos aplicados del ciclo biológico de *Varroa* y de su dinámica estacional. *El colmenar* 88: 18-27.

Floris I., Satta A., Garau V.L, Melis M., Cabras P. & Aloul N. 2001. Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*. *Apidologie* 32: 577–585

Frey E., Odemer R., Blum T. & Rosenkranz P. 2013. Activation and interruption of the reproduction of *Varroa destructor* is triggered by host signals (*Apis mellifera*). *J. Invert. Pathol.* 113: 56–62.

Frey E. & Rosenkranz P. 2014. Autumn invasion rates of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) into Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) colonies and the resulting increase in mite populations. *J. Econ. Entomol.* 107 (2): 508-515.

Fries I. & Bommarco R. 2007. Possible host-parasite adaptations in honey bees infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 38:525-533.

Fries I. & Camazine S. 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie* 32: 199-214.

Fries I. & Rosenkranz P. 1996. Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in Honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. *Exp. Appl. Acarol.* 20: 103-112.

Fries I., Hansen H., Imdorf A. & Rosenkranz P. 2003. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie* 34: 389-397.

Fries I., Huazhen W., Wei S. & Jin C.S. 1996. Grooming behavior and damage mites (*Varroa jacobsoni*) in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apidologie* 27: 3-11.

Frigoli L. & Poffer D. 2013. Monitoreo y control de Varroasis. Consultado on line el 24 de junio de 2015 en: <http://inta.gob.ar/documentos/monitoreo-y-control-de-varroasis>

Fürst M.A., McMahon D.P., Osborne J.L., Paxton R.J. & Brown MJF. 2014. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 506: DOI 10.1038/nature12977

Gajger I.T., Tomljanović Z. & Petrinec Z. 2010. Monitoring health status of Croatian honey bee colonies and possible reasons for winter losses. *J. Apic. Res. and Bee World* 49(1): 107-108. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.19.

- Gajic B., Radulovic Z., Stevanovic J., Kulisic Z., Vucicevic M., Simeunovic P. & Stanimirovic Z. 2013. Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis. *Exp. Appl. Acarol.* 61:97–105.
- García Fernández P. 1997. In *The varroosis in the Mediterranean region*. Cahiers Options Méditerranéennes, CIHEAM-IAMZ. Zaragoza.
- Garedew A., Schmolz E. & Lamprecht I. 2004. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* 35: 419-430.
- Garrido C., Rosenkranz P., Paxton R.J. & Goncalves L.S. 2003. Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie* 34: 535-541.
- Garrido, C. & Rosenkranz P. 2003. The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*. *Exp. Appl. Acarol.* 31: 269–273.
- Genersch E. 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 87–97.
- Genersch E., von der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten, C., *et al.*, 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41: 332-352.
- Giacobino A., Bulacio Cagnolo N., Merke J., Orellano E., Bertozzi E., Masciangelo G., Pietronave H., Salto C. & Signorini M. 2014. Risk factors associated with the presence of *Varroa destructor* in honey bee colonies from east-central Argentina. *Prev. Vet. Med.* 115: 280-287.
- Giacobino A., Bulacio Cagnolo N., Merke J., Orellano E., Bertozzi E., Masciangelo G., Pietronave H., Salto C. & Signorini M. 2015. Risk factors associated with failures of *Varroa* treatments in honey bee colonies without broodless period. *Apidologie*: DOI: 10.1007/s13592-015-0347-0.
- Giorgi R., Tosolini R., Sapino V., Villar J., León C. & Chiavassa A. 2008. Zonificación Agroeconómica de la provincia de Santa Fe. INTA (Eds) 110, ISSN 0325-9137, Argentina, pp. 215–224.
- Giovanazzo P. & Dubreuil P. 2011. Evaluation of spring organic treatments against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies in eastern Canada. *Exp. App. Acarol.* 55: 65–76.

Giray T., Kence M., Oskay D., Döke M.A. & Kence A. 2010. Scientific note: colony losses survey in Turkey and causes of bee deaths. *Apidologie* 41:451–453. DOI: 10.1051/apido/2009077

Goodwin M. & Van Eaton C. 2001. CONTROL OF VARROA: A Guide for New Zealand Beekeepers. New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry, Eds Astra Print, Wellington, New Zealand ISBN 0-478-07958-3.

Goodwin R.M., Taylor M.A., Mcbrydie H.M. & Cox H.M. 2005. Base levels of resistance to common control compounds by a New Zealand population of *Varroa destructor*. *New. Zeal. J. Crop. Hort.* 33: 347–352.

Guerra Jr J.C.V., Issa M.R.C., Carneiro F.E., Strapazzon R. & Moretto G. 2010. Genetics and molecular research RAPD identification of *Varroa destructor* genotypes in Brazil and other regions of the Americas. *Genet. Mol. Res.* 9(1): 303–308.

Guzmán-Novoa E., Eccles L., Calvete Y., Mcgowan J., Kelly P.G. & 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: 443-450.

Harbo J.R. & Harris J.W. 1999. Selecting honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 30: 183-196.

Harris J.W., Harbo J.R., Villa J.D. & Danka R.G. 2003 Variable Population Growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Colonies of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) During a 10-Year Period. *Environ. Entomol.* 32 (6): 1305-1312.

Heintz C., Ribotto M., Ellis M. & Delaplane K. 2011. Best management practices (BMPs) for beekeepers pollinating California's agricultural crops. Managed Pollinator CAP Coordinated Agriculture Project. *Bee Culture* 2011: 17–19.

Higes M., Martín-Hernández R., Martínez-Salvador A., Garrido-Bailón E., González-Porto A.V., Meana A., Bernal J.L., del Nozal M.J. & Bernal J. 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ. Microbiol. Rep.* 2(2): 243–250.

Higes M., Meana A., Suarez M. & Llorente J. 1999. Negative long-term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30 (4): 289-292.

- Ifantidis M. 1984. Parameters of the population dynamics of the mite *Varroa jacobsoni* by the honeybee. J. APic. Res. 23 (4): 227-233.
- Imdorf A., Charriere J.D., Kilchenmann V., Bogdanov S. & Fluri P. 2003. Alternative strategy in central Europe for the control of *Varroa destructor* in honey bee colonies. APIACTA 38: 258-285.
- Invernizzi C., Harriet J & Carvalho S. 2006 Evaluation of different queen introduction methods in honeybee colonies in Uruguay. APIACTA 41: 1-20.
- Issa, M.R.C. 1989. Enzyme patterns in *Varroa* and *Apis* from Brazil and Germany. Apidologie 20:506–507.
- Janmaat A.F. & Winston M.L. 2000. The influence of pollen storage area and *Varroa jacobsoni* Oudemans parasitism on temporal caste structure in honey bees (*Apis mellifera* L.). Insectes Soc.47: 177-182.
- Johnson R.M., Pollock H.S. & Berenbaum M.R. 2009. Synergistic interaction between in-hive miticides in *Apis mellifera*. J. Econ. Entomol. 102(2): 474-479.
- Jones J.C. & Oldroyd B.P. 2006. Nest Thermoregulation in Social Insects. Adv. Insect. Physiol. 33: 153-191.
- Keller I., Fluri P. & Imdorf A. 2005. Pollen nutrition and colony development in honey bees Part II. Bee World 86: 27-34.
- Kim S., Westra J.V. & Gillespie J.M. 2006. The Adoption of Russian Varroa-Resistant Honey Bees. In 2006 Annual meeting, July 23-26, Long Beach, CA (No. 21054). American Agricultural Economics Association (New Name 2008: Agricultural and Applied Economics Association).
- Kirrane M.J., De Guzman L.I., Rinderer T.E., Frake A.M., Wagnitz J. & Whelan P.M. 2011. Asynchronous Development of Honey Bee Host and *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) Influences Reproductive Potential of Mites. J. Econ. Entomol. 104 (4): 1146-1152
- Korpela S., Aarhus A., Fries I. & Hansen H. 1992. *Varroa jacobsoni* Oud. in cold climates: population growth, winter mortality and influence on the survival of honey bee colonies. J. Apic. Res. 31 (3-4): 157-164.
- Kralj J. & Fuchs S. 2006. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. Apidologie 37: 577- 587.

- Kralj J., Brockmann A., Fuchs S. & Tautz J. 2007. The parasitic mite *Varroa destructor* affects non- associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *J. Comp. Physiol.* 193: 363- 370.
- Kraus B. & Hunt G. 1995. Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Apidologie* 26: 283–290
- Kraus B. & 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., Williams N.M., Aizen M.A., Gemmill-Herren B., LeBuhn G., Minckley R., Packer L., Potts S.G., Roulston T., Steffan-Dewenter I., Vázquez D.P., Winfree R., Adams L., Crone E.E., Greenleaf S.S., Timothy H., Keitt T.H., Klein A.M., Regetz J. & Rickett T.H. 2007. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecol. Lett.* 10: 299–314.
- Kulldorff M. & Nagarwalla N. 1995 Spatial Disease clusters: detection and inference. *Statistics in Medicine* 14: 799-810.
- Kulldorff M. 2014. SaTScan User Guide for version 9.3. [Online] <http://www.satscan.org> (consultado el 05 de Mayo de 2014).
- Kulldorff M., Athas W.F., Feuer E.J., Miller B.A. & Key C.R. 1998. Evaluating cluster alarms: A space-time scan statistic and brain cancer in Los Alamos, Mexico. *Am. J. Public Health* 88 (9): 1377-1380.
- Kulldorff M., Tango T. & Park P.J. 2003. Power comparisons for disease clustering tests. *Comput. Stat. Data An.* 42: 665 – 684.
- Landis J.R.& Koch G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
- Le Blanc B.W., Eggleston G., Sammataro D., Cornett C., Dufault R., Deeby T. & St. Cyr E. 2009. Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Agric. Food. Chem.* 57: 7369-7376.
- Le Conte Y. & Arnold G. 1987. Influence de l'âge des abeilles (*Apis mellifera* L.) et de la chaleur sur le comportement de *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 18 (4): 305-320.

Le conte Y. & Navajas M. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Rev.sci. tech. Off. int. Epiz.* 27 (2): 499-510.

Le Conte Y., Arnold G. & Desenfant P.H. 1990. Influence of brood temperature and hygrometry variations on the development of the honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Environ. Entomol.* 19(6): 1780-1785.

Le Conte Y., Ellis M. & Ritter W. 2010. *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie* 41: 353-363.

Le Conte Y., Mohammedi A. & Robinson G.E. 2001. Primer effects of a brood pheromone on honey-bee behavioural development. *Proc. Biol. Sci.* 268: 163-168.

Lee K.V., Moon R.D., Burkness E.C., Hutchison W.D. & Spivak M. 2010. Practical sampling plans for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies and apiaries. *J.Econ. Entomol.* 103 (4): 1039-1050.

Lee K.V., Steinhauer N., Travis D.A., Meixner M., Deen J. & vanEngelsdorp D. 2015. Honey bee surveillance: a tool for understanding and improving honey bee health. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 10: 37–44.

Liebig G. 2001. How many varroa mites can be tolerated by a honey bee colony? *Apidologie* 32: 482–484.

Locke B., Le Conte Y., Crauser D. & Fries I. 2012. Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. *Ecology and Evolution* 2012; 2(6): 1144–1150.

Lodesani M., Colombo M. & Spreafico M. 1995. Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* 26: 67-72.

Lodesani M., Costa C., & Man M.C. 2009. Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bee World* 86: 102–109.

MAF, 2001. A Review of Treatment Options For Control of Varroa Mite in New Zealand. Report to the Ministry of Agriculture and Forestry, Nueva Zelanda.

Maggi M.D. 2010. Biología, ecología y control de *Varroa destructor*, Anderson & Trueman 2000. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Maggi M.D., Ruffinengo S.R., Gende L.B., Eguaras M.J. & Sardella N.H. 2008. LC50 baseline levels of amitraz, coumaphos, fluvalinate and flumethrin in populations of *Varroa destructor* from Buenos Aires province, Argentina. J. Apic. Res. 47 (4): 292-295.

Maggi M., Medici S., Quintana S., Ruffinengo S., Marcángeli J., Gimenez Martinez P., Fuselli S. & Eguaras M. 2012. Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. Exp Appl Acarol 56: 309–318

Maggi M.D, Ruffinengo S.R., Damiani N., Sardella N.H. & Eguaras M.J. 2009. First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. Exp Appl Acarol 47: 317–320.

Maggi M.D., Damiani N., Ruffinengo S., De Jong D., Principal J. & Eguaras M. 2010a. Brood cell size of *Apis mellifera* modifies the reproductive behavior of *Varroa destructor*. Exp. Appl. Acarol. 50: 269-279.

Maggi M.D., Ruffinengo S.R., Mendoza Y., Ojeda P., Ramallo G., Floris I. & Eguaras M.J. 2011. Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa* mites' potential to develop acaricide resistance. Parasitol. Res. 108: 815–821.

Maggi M.D., Ruffinengo S.R., Negri P. & Eguaras M.J. 2010b. Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. Parasitol. Res. 107: 1189–1192.

Mangeaud A. & Videla M. 2005. En busca de la independencia perdida: la utilización de Modelos Lineales Generalizados Mixtos en pruebas de preferencia. Ecología Austral 15:199-206.

Marcangeli J., Monetti L., & Fernández, N. 1992a. Malformations produced by *Varroa jacobsoni* on *Apis mellifera* in the province of Buenos Aires, Argentina. Apidologie 23: 399-402.

Marcangeli J.A., Eguaras M.J. & Fernández N.A. 1992b. Reproduction of *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata: Varroidae) in temperate climates of Argentina. Apidologie 23 (1): 57-60.

Marcangeli J.A. & García M.C. 2003. Control del Ácaro *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) en Colmenas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

mediante la Aplicación de distintos Principios Activos. Rev. Soc. Entomol. Argent. 62 (3-4): 69-74.

Marcangeli J.A., García M.C., Cano G., Distéfano L., Martín M.L., Quiroga A., Raschia F. & Vega C. 2003. Eficacia del Oxavar® para el Control del Ácaro *Varroa destructor* (Varroidae) en Colmenas de *Apis mellifera* (Apidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. 62 (3-4): 75-79.

Marcangeli J.A., García M.C., Vega C., Quiroga A., Martín M.L., Distéfano L. & Grisela CANO G. 2005. Estudio sobre la Eficacia a Campo del Amivar® contra *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) en Colmenas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. 64 (1-2): 29-33.

Marcangeli J.A. 2000. Aplicación de una nueva técnica para determinar los niveles de infección de *Varroa jacobsoni* en colmenas de *Apis mellifera*. Natura Neotropicalis 31 (1-2): 81-85.

Martin S. 1994. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. Exp. Appl. Acarol. 18: 87-100.

Martin S. 1998. A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Ecol. Model. 109: 267-281.

Martin S. 2001. *Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK. Exp. Appl. Acarol. 25: 321–325.

Martin S., Highfield A.C, Brettell L., Villalobos E.M., Budge G.E, Powell M., Nikaido S. & Schroeder, D.C. 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336, 1304 DOI: 10.1126/science.1220941.

Martin S., Holland K. & Murray M. 1997. Non-reproduction in the honeybee mite *Varroa jacobsoni*. Exp. Appl. Acarol. 21: 539-549.

Martinez Puc J.F. & Medina Medina L.A. 2011. Evaluación de la resistencia del ácaro *Varroa destructor* al fluvalinato en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en Yucatán, México. Rev. Mex. Cienc. Pec. 2 (1): 93-99.

Martín-Hernández R., Higes M., Pérez J.L., Nozal M.J, Gómez L. & Meana A. 2007. Short term negative effect of oxalic acid in *Apis mellifera iberiensis*. Span. J. Agric. Res. 5(4):474-480.

Mattila H.R. & Otis G.W. 2006. Influence of pollen diet in spring on development of honey bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. J.Econom. Entomol. 99 (3): 604-613.

Medina Flores C.A., Guzman Novoa E., Arechiga Flores C.F., Aguilera Soto J.I. & Gutierrez Piña F.J. 2011. Efecto del nivel de infestación de *Varroa destructor* sobre la producción de miel de colonias de *Apis mellifera* en el altiplano semiárido de México. Rev. Mex. Cienc. Pec. 2 (3): 313-317.

Medici S.K., Sarlo E.G., Marioli J.C. & Eguaras. M.J. 2009a. Determinación de la contaminación por antibióticos en mieles de la Provincia de Buenos Aires durante el período 2007-2008. 31° Congreso Argentino de Producción Animal. 15-17 de Octubre de 2009 San Luis, Argentina.

Medici S.K., Sarlo E.G., Marioli J.C. & Eguaras. M.J. 2009b. Presencia de parafinas y grasas en ceras de recupero y estampadas comerciales de la Argentina. 31° Congreso Argentino de Producción Animal. 15-17 de Octubre de 2009 San Luis, Argentina.

Merke J., & Palacio M.A. 2011. Variaciones temporales en parámetros reproductivos de *Varroa destructor* en colmenas de *Apis mellifera* L. seleccionadas por bajos niveles de infestación. 42º Congreso Internacional de Apicultura, Apimondia. 21-25 de Septiembre de 2011-Buenos Aires, Argentina.

Milani N. 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. Apidologie 26: 415-429.

Milani N. 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. Apidologie 30: 229-234.

Moher D., Hopewell S., Schulz K., Montori V., Gøtzsche P., Devereaux P., Elbourne D. Egger M. & Altman D. 2010. ConSoRT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. BMJ : DOI: 10.1136/bmj.c869.

Mondragón L., Martin S. & Vandame R. 2006. Mortality of mite offspring: a major component of *Varroa destructor* resistance in a population of Africanized bees. Apidologie 37: 67-74.

Mondragón L., Spivak M. & Vandame R. 2005. A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. Apidologie 36: 345–358.

- Montiel J.C. & Piola G.A. 1976. A new enemy of bees. In: Harnaj V (ed) Varroasis, a honey bee disease. Apimondia Publishing House, Bucharest, pp 36–38.
- Moretto G. & Leonidas J.M. 2003. Infestation and distribution of the mite *Varroa destructor* in colonies of africanized bees. Braz. J. Biol. 63(1): 83-86.
- Moretto G., Gonçalves L.S., De Jong D. & Bichuette M.Z. 1991. The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud infestations in Brazil. Apidologie 22: 197-203.
- Moritz R.F.A & Fuchs S.1998. Organization of honey bee colonies: characteristics and consequences of a superorganism concept. Apidologie 29: 7-21.
- Moritz R.F.A. & Hänel H. 1984. Restricted development of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. in the Cape honeybee *Apis mellifera capensis* Esch. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 97: 91–95. DOI 10.1111/j.1439-0418.1984.tb03719.x.
- 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.
- Murray T.E., Kuhlmann M. & Potts S.G. 2009. Conservation ecology of bees: populations, species and communities. Apidologie 40: 211-236.
- Nation J.L., Sanford M.T. & Milne K. 1992. Cuticular hydrocarbons from *Varroa jacobsoni*. Exp Appl Acarol 16: 331–344
- National Research Council (NRC), 2006. Status of Pollinators in North America. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Naug D. & Camazine S .2002. The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. J. Theor. Biol. 215: 427-439.
- Navajas M., Anderson D.L., De Guzman L.I., Huang Z.Y., Clement J., Zhou T. & Le Conte Y. 2010. New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. Apidologie 41:181–193.
- Nazzi F., Milani N. & Della Vedova G. 2006. Atracción de *Varroa destructor* por las celdas de cría, sobre la base de las señales emitidas por el alimento larval. Comisión permanente de Patología apícola. Online: http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/sanidad/64_atraccion_varroa_destructor_alimento_larval.pdf (Consultado en Abril 2011).

- Neumann P. & Carreck N.L. 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49: 1-6.
- Neupane K.R. & Thapa R.B. 2005. Alternative to off-season sugar supplement feeding of honeybees. *J. Inst. Agric. Anim. Sci.* 26: 77-81.
- Nguyen B.K., Mignon J., Laget D., De Graaf D.C., Jacobs F.J., VanEngelsdorp D., Brostaux Y., Saegerman C. & Haubruge E. 2010. Honey bee colony losses in Belgium during the 2008-9 Winter. *J. Apic. Res. and Bee World*, 49 (4): 337-339. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.4.07
- Nozal M.J., Bernal J.L., Gómez L.A., Higes M. & Meana A. 2003. Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bee. *Apidologie* 34: 181-188.
- Nutter F.W. 1999. Understanding the interrelationships between botanical, human and veterinary epidemiology: The Ys and Rs of it all. *Ecosystem Health* 5 (3): 131-140.
- OIE, 2012. Terrestrial Animal Health Code. Vol. 1: General Provisions. Chapter 4.14: Official health control of bee diseases. 2012[©] OIE. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/en_chapitre_1.4.14.htm (consultado el 15 de julio de 2013).
- Oldroyd B.P. 1999. Co-evolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends Ecol. Evol.* 14(8): 312-315.
- Pengue W.A. 2005. Transgenic Crops in Argentina: The Ecological and Social Debt. *B. Sci. Technol. Soc* 25 (4): 314-322.
- Pernal S.F., Baird D.S., Birmingham A.L., Higo H.A., Slessor K.N. & Winston M.L. 2005. Semiochemicals influencing the host-finding behavior of *Varroa destructor*. *Exp. Appl. Acarol.* 37: 1-26.
- Pettis J.S. 2004. A scientific note on *Varroa destructor* resistance to Coumaphos in the United States. *Apidologie* 35: 91-92.
- Pfeiffer D.U., Robinson T.P., Stevenson M., Stevens K.B., Rogers D.J. & Clements A.C. 2008. *Spatial Analysis in Epidemiology*, 1^{era} edición. Oxford University Press, Gran Bretaña 142 pp.
- Pohorecka K., Bober A., Skubida M., Zdańska D. & Torój K. 2014. A comparative study of environmental conditions, bee management and the epidemiological situation in

apiaries varying in the level of colony losses. J. Apic. Sci. 58: DOI 10.2478/JAS-2014-0027.

Protocolo Nacional de calidad de miel, 2005. Direccion Nacional de Alimentos. Eds. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Pesca y Alimentos.

Rashid M., Wagchoure E.S., Mohsin A.U., Raja S. & Sarwar G. 2012. Control of ectoparasitic mite *Varroa destructor* in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies by using different concentrations of oxalic acid. J Anim. Plant Sci. 22(1): 72-76.

Rath W. 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 30: 97-110.

Renz M. & Rosenkranz P. 2001. Infestation dynamics and reinvasion of *Varroa destructor* mites in honey bee colonies kept isolated and in groups. Apidologie 32: 492-494.

Rinderer T.E. & Elliott K.D. 1977. Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*. J. Econ. Entomol. 70: 431-433.

Rinderer T.E. & Rothenbuhler W.C. 1974. The influence of pollen on the susceptibility of Honey-bee larvae to *Bacillus larvae*. J. Inver. Pathol. 23: 347-350.

Rodrigues Dehaibes S.R., Otero Colina, G., Pardio Sedas V. & Villanueva Jimenez J.A. 2005. Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. J. Apic. Res. 44 (3): 68-69.

Root A.I. 1993. ABC de la apicultura. Hemisferio Sur (Eds.), Buenos Aires, Argentina. Pp 723.

Rosenkranz P. & Renz M. 2003. *Varroa destructor* infestation of adult bees, worker brood and drone brood during the season and consequences for treatment concepts. Apidologie 34: 473-510.

Rosenkranz P., Aumeier P. & Ziegelman B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. J. Inver. Pathol. 103: 96-119.

Ruiz Martinez J. & Gutierrez Tirado M. 2012. An adequate feeding can decrease the loss of colonies in Spain. COLOSS Workshop Honey bee nutrition. Bled, Slovenia, 22-23 October 2012.

Ruiz-Matute A.I., Weiss M., Sammataro D., Finely J. & Sanz M.L. 2010. Carbohydrate Composition of High-Fructose Corn Syrups (HFCS) Used for Bee Feeding: Effect on Honey Composition. *J. Agric. Food. Chem.* 58: 7317-7322.

Ruttner F. & Hänel H. 1992. Active defense against *Varroa* mites in a *Carniolan* strain of Honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie* 23:173-187.

SAGPyA. 2009. Informe de la Dirección Nacional de Alimentos. Online: http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/economias_regionales/_apicultura/index.php (Consultado en Marzo 2011).

Sammataro D., Gerson U. & Needham G. 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu. Rev. Entomol.* 45:519–548.

Schmidt V., Neira M. & Carrillo R. 2008. Evaluación comparativa de los acaricidas Bayvarol (flumetrina) y Apilife Var (timol, eucaliptol, mentolylalcanfor) en el control del ácaro *Varroa destructor* (Anderson & Trueman) en época primaveral. *Agro Sur* 36 (1): 8-14.

Schneider S.S. & De Grandi-Hoffman G. 2008. Queen replacement in African and European honey bee colonies with and without afterswarms. *Insect. Soc.* 55: 79 – 85.

Schulz D.J., Huang Z.Y. & Robinson G.E. 1998. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42: 295-303.

SENASA, Resolución 81/2015 consultado online en:

<http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/240000-244999/244721/norma.htm>

SENASA. 2007. Situación actual de Varroosis. Online: <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3824-varroosis-aituacion-actual-argentina.pdf>. (Consultado en Marzo 2011)

Severson D.W. & Erickson E.H. 1984. Honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony performance in relation to supplemental carbohydrates. *J. Econ. Entomol.* 77: 1473–1478.

Smith K.M., Loh E.H., Rostal M.K., Zambrana-Torrel C.M, Mendiola L. & Daszak, P. 2013. Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses. *Ecohealth* 10: 434-445.

Smith R.D. 2006. *Veterinary clinical epidemiology*. 3rd edition CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida (EE.UU.) pp259.

Solignac M., Cornuet J.M., Vautrin D., Le Conte Y., Anderson D., Evans J., Cros-Arteil S. & Navajas M. 2005. The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. Proc. R. Soc. B 272: 411–419.

Somerville D. 2000. Honey bee nutrition and supplementary feeding. Agnote DAI/178, NSW Agriculture. ISSN 1034-6848.

Spleen A.M., Lengerich E.J., Rennich K., Caron D., Rose R., Pettis J.S., Henson M., Wilke J.T., Wilson M., Stitzinger J., Lee K., Andree M., Snyder R. & vanEngelsdorp D. 2013. A national survey of managed honey bee 2011-12 winter colony losses in the United States: results from the Bee Informed Partnership. J. Apic. Res. 52(2): 44-53.

Standifer L.N., Moeller F.E., Kauffeld N.M., Herbert E.W. & Shimanuki H. 1977. Supplemental Feeding of Honey Bee Colonies; USDA Information Bulletin 413; U.S. GPO: Washington, DC, 8 pp, illus.

Stevenson M.A., Benard H., Bolger P. & Morris R.S. 2005. Spatial epidemiology of the Asian honey bee mite (*Varroa destructor*) in the North Island of New Zealand. Prev. Vet. Med. 71: 241-252.

Strange J. & Sheppard W.S. 2001. Optimum Timing of Miticide Applications for Control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Washington State, USA. J. Econ. Entomol. 94 (6): 1324-1331.

Tarabla H. & Signorini M.L. 2013. Epidemiología Diagnóstica. Santa Fe: Ediciones UNL.

Tarpy D.R., Hatch S. & Fletcher D.J.C. 2000. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. Anim. Behav. 59: 97-101.

Thompson H.M., Ball R.F., Brown M.A. & Bew M.H. 2003. *Varroa destructor* resistance to pyrethroid treatments in the United Kingdom. B. Insectol. 56 (1): 175-181.

Thompson H.M., Brown M.A., Ball R.F. & Bew M.H. 2002. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. Apidologie 33: 357–366

Thrusfield M. 1995. Veterinary Epidemiology, 2 edn. Blackwell Science Ltd, 2, Londres, WC1N 2BL, Reino Unido.

Topolska G., Gajda A. & Hartwig A. 2008. Polish honey bee colony-loss during the winter of 2007/2008. J. Apic. Sci. 52(2): 95-104.

Tremolada P., Bernardinelli I., Colombo M., Spreafico M. & Vighi M. 2004. Coumaphos Distribution in the Hive Ecosystem: Case Study for Modeling Applications. *Ecotoxicology* 13: 589-601.

Trouiller J. & Milani N. 1999. Stimulation of *Varroa jacobsoni* Oud. oviposition with semiochemicals from honey bee brood. *Apidologie* 30: 3-12.

Trouiller J., Arnold G., Chappe B., Le Conte Y., Billion A. & Masson C. 1994. The kairomonal esters attractive to the *Varroa jacobsoni* mite in the queen brood. *Apidologie* 25: 314-321.

Underwood R.M & Currie R.W. 2003. The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against *Varroa destructor* (Acari:Varroidae), a parasite of *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae). *Exp. Appl. Acarol.* 29: 303–313.

Unger N. & Poffe D. 2012. Manual de prácticas apícolas para producir miel de calidad en la cuenca del Salado. Eds INTA Buenos Aires, 28 pp.

van der Zee R., Brodschneider R., Brusbardis V., Charrière J.D., Chlebo R., Coffey M.F., Dahle B., Drazic M.M., Kauko L., Kretavicius J., Kristiansen P., Mutinelli F., Otten C., Peterson M., Raudmets A., Santrac V., Seppälä A., Soroker V., Topolska G., Vejsnæs F. & Gray A. 2014. Results of international standardized beekeeper surveys of colony losses for winter 2012-2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modeling of risk factors for winter loss. *J. Apic. Res.* 53 (1): 19-34. DOI 10.3896/IBRA.1.53.1.02

van der Zee R., Pisa L., Andonov S., Brodschneider R., Charrière J.D., Chlebo R., Coffey M.F., Crailsheim K., Dahle B., Gajda A., Gray A., Drazic M.M., Higes M., Kauko L., Kence, A; Kence M., Kecic N., Kiprijanovska H., Kralj J., Kristiansen P., Martín-Hernández R., Mutinelli F., Nguyen B.K., Otten C., Öskirim A., Pernal S.F., Peterson M., Ramsay G., Santrac V., Soroker V., Topolska. G., Uzunov A., Vejsnaes F., Wei S., & Wilkins S. 2012. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *J. Apic. Res.* 51 (1): 100-114. DOI 10.3896/IBRA.1.51.1.14

Van Dooremalen C., Gerritsen L., Cornelissen B., van der Steen J.J.M., van langevelde F. & Blacquièrre T. 2012. Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PLoS one* 7(4): e36285. DOI:10.1371/journal.pone.0036285

- Vanbergen A.J., Heard M.S., Breeze T., Potts S.G. & Hanley N. 2014. *Status and value of pollinators and pollination services*. Department for Environment, Food and Rural Affairs, 53pp. (CEH Project N° C05017).
- Vandame R. 2000. Control alternativo de Varroa en Apicultura. Consultado on line el 10 de junio de 2015 en:
http://www.beekeeping.com/articulos/control_varroa/curso2.htm#1_2
- Vandame R. & Palacio M.A. 2010. Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? *Apidologie* 41: 243-255. DOI: 10.1051/apido/2010025
- vanEngelsdorp D. & Maixner M.D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Inver. Pathol.* 103: 80-95.
- VanEngelsdorp D., Caron D., Hayes J., Underwood R., Henson M., Rennich K., Spleen A., Andree M., Snyder R., Lee K., Roccasecca K., Wilson M., Wilkes J., Lengerich E. & Pettis J. 2012a. A national survey of managed honey bee 2010-11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J. Apic. Res.* 51 (1): 115-124. DOI 10.3896/IBRA.1.51.1.14
- VanEngelsdorp D., Tarpy D.R., Baylis K., Spivak M., Caron D.M., Connel J., Delaplane K.S., Donohue S., Esaias W., Gross B., Hayes Jr. J., Lengerich E.J., Pettis J., Rennich K., Underwood R., Rose R., Skinner J. & Wilkes J. 2012b. The bee informed partnership: Using beekeepers real world experience to solve beekeepers real world problems. *American Entomologist* 58 (2): 116-118.
- vanEngelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., *et al.* 2009. Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* 4(8): e6481. DOI:10.1371/journal.pone.0006481.
- VanEngelsdorp D., Hayes Jr. J., Underwood R.M. & Pettis J. 2008. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS ONE* 3 (12): e4071. DOI:10.1371/journal.pone.0004071
- vanEngelsdorp D., Lengerich E., Spleen A., Dainat B., Cresswell J., Nguyen B.K., Soroker V., Underwood R., Human H. Yves Le Conte Y., Saegerman C. 2013. Standard epidemiological methods to understand and improve *Apis mellifera* health. In: Dietemann V., Ellis J.D. & Neumann, P. (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II:*

Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. J. Apic. Res. 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.08>

VanEngelsdorp, D., Hayes Jr J., Underwood R.M. & Pettis J.S. 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. J. Apic. Res. 49 (1): 7-14. DOI 10.3896/IBRA.1.49.1.03

Venables W.N. & Dichmont C.M. 2004. GLMs, GAMs and GLMMs: an overview of theory for applications in fisheries research. Fisheries Research 70: 319–337.

Vetharaniam I. 2012. Predicting reproduction rate of varroa. Ecol. Model. 224: 11-17.

Wallner K. & Fries I. 2003. Control of the mite *Varroa destructor* in honey bee colonies. Pesticide Outlook: DOI 10.1039/b301510f.

Wallner K. 1999. Varroacides and their residues in bee products. Apidologie 30: 235-248.

Ward M.P. & Carpenter T.E. 2000. Techniques for analysis of disease clustering in space and in time in veterinary epidemiology. Prev. Vet. Med. 45: 257-284.

Ward K., Danka R. & Ward R. 2008. Comparative performance of two mite-resistant stocks of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in Alabama beekeeping operations. J. Econ. Entomol. 101(3): 654-659.

Wendling S., Guillet B., Roy L., Kreiter S. & Colin M.E. 2014. Fertilization and fertility in the female of *Varroa destructor*, a key point for the parasite population dynamics. Apidologie: DOI 10.1007/s13592-014-0291-4.

Wilkinson D. & Smith G.C. 2002. A model of the mite parasite, *Varroa destructor*, on honeybees (*Apis mellifera*) to investigate parameters important to mite population growth. Ecol. Model. 148: 263-275.

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.L. & Shutler D. 2010. Colony Collapse Disorder in context. Bioessays 32: 845–846. DOI: 10.1002/bies.201000075.

Wohlgemuth R. 1957. Die Temperaturregulation des Bienenvolkes unter regeltheoretischen Gesichtspunkten. Zeitschrift für vergleichende Physiologie 40 (2): 119-161.



GLOSARIO Y ABREVIATURAS

CCA: cuadros cubiertos con abejas

CCC: cuadros cubiertos con cría de abejas

CCM: cuadros cubiertos con miel

CCP: cuadros cubiertos con polen

Colmena: es la suma del material inerte (cámara de cría) mas el material vivo (abejas), mas las alzas melarias.

Colonia: es el conjunto de material vivo (obreras, zánganos, cría y reina fecundada) que componen una colmena o núcleo.

Deriva: cuando abejas adultas retornan a la colmena equivocada.

Desinfección: es la reducción mediante agentes químicos métodos físicos adecuados del numero de microorganismos presentes en el material inerte (cámara de cría y alzas melarias) o en instalaciones, maquinarias y utensilios de uso común en apicultura.

MIP: Manejo integrado de plagas

Núcleo: contiene material vivo y material inerte, su origen es la multiplicación de una colmena propia o producto de la compra a terceros.

Periodo de carencia: es el tiempo que debe transcurrir entre la última aplicación de un tratamiento acaricida en las colmenas y la colocación de alzas melarias para recolección y cosecha de miel.

RAPDS: *Random Amplification of Polymorphic DNA*(Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)

Recambio de reina: es el reemplazo de la reina de una colmena por una nueva,es fundamental para aumentar laproductividad y disminuir la mortandad de colmenas. En esta tesis nos referimos siempre al recambio realizado por el apicultor de manera deliberada siguiendo la metodología recomendada.

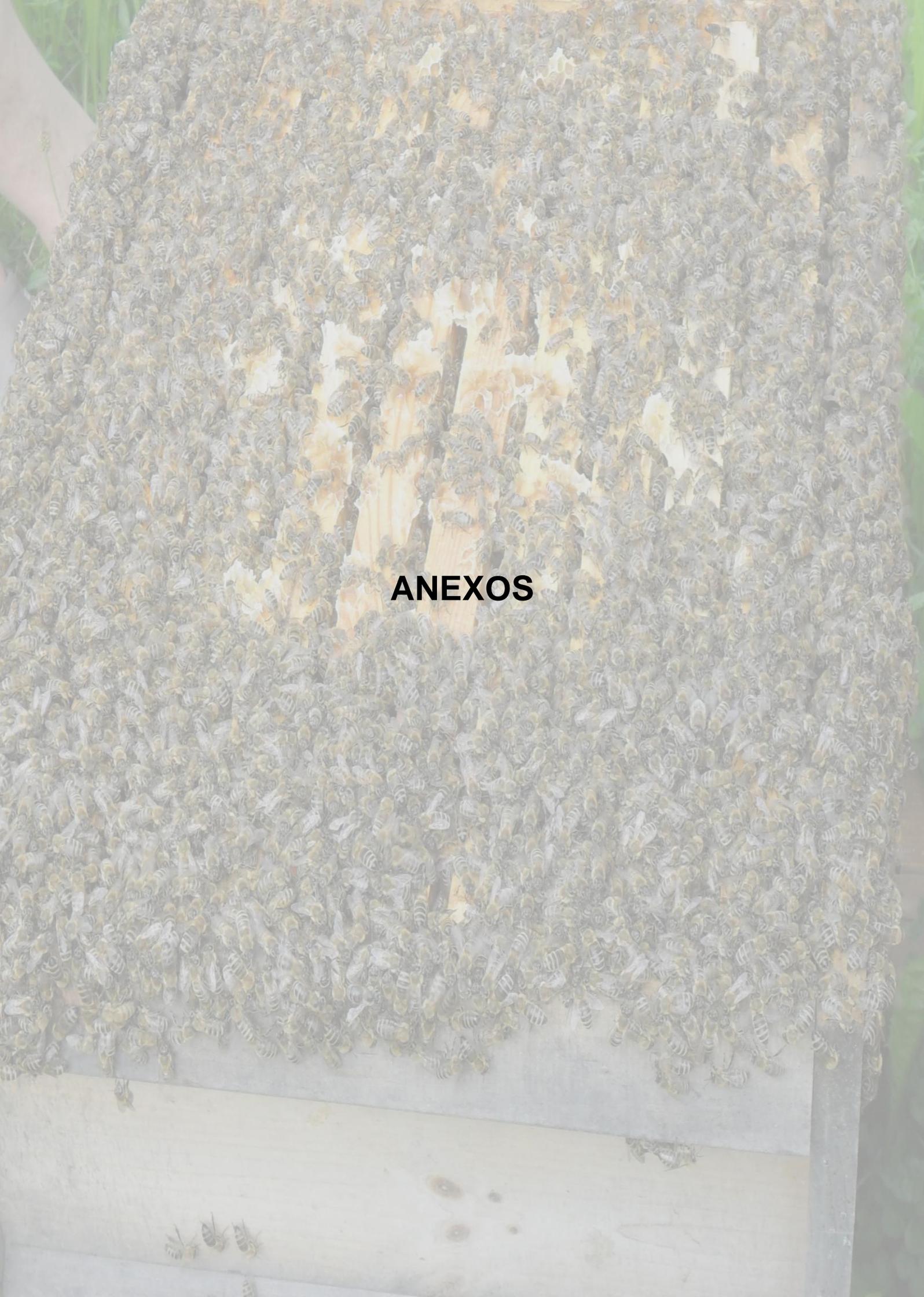
RFLP: *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)

Robbing o pillaje: comportamiento de la colonia de abejas que consiste en el robo de miel de una colmena fuerte a un débil lo cual es muy frecuente cuando los recursos alimenticios se vuelven escasos.

Trashumancia: movimiento de colmenas de una localización geográfica a otra, normalmente los apicultores que movilizan sus colmenas lo hacen según la disponibilidad de floración de interés apícola.

VC: Varroa en cría

VF: Varroa Forética o en abejas adultas

A large colony of bees is shown on a wooden structure. The bees are densely packed, covering most of the surface. The wood is light-colored and shows signs of being worked on, with some areas where the surface has been removed, revealing the underlying structure. The word "ANEXOS" is overlaid in the center of the image in a bold, black, sans-serif font. The background is slightly blurred, showing green foliage and a concrete surface at the bottom.

ANEXOS

Anexo 1. Encuesta sobre Curvas de Floración a Técnicos asesores de Cambio Rural

Nombre:

Departamento:

Apiarios asesorados (incluyendo n° de colmenas):

1. Marcar con una X en cada mes, el nivel (de 1 a 10) de flujo de néctar correspondiente a la región donde desempeña su trabajo.

Escala de Flujo	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												

2. Marcar con una X en cada mes, el nivel (de 1 a 10) de flujo de polen correspondiente a la región donde desempeña su trabajo.

Escala de Flujo	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												

3. ¿A partir de qué mes (de ser posible especificar con más detalle) considera Ud. que comienza el desarrollo del nido de cría en la zona donde desempeña su trabajo?

4. ¿En qué período (quincena y mes) identifica Ud. Un mayor ingreso de néctar en la zona donde desempeña su trabajo?

5. ¿En qué período (quincena y mes) finaliza la cosecha de miel en la zona donde desempeña su trabajo?

6. ¿En qué período (quincena y mes) comienzan los tratamientos post-cosecha acaricidas en la zona donde desempeña su trabajo?

7. ¿Realiza normalmente tratamientos contra Varroa durante la época Invernal? Si es así, ¿En qué período (quincena y mes) lo aplica y que producto utiliza?

Anexo2. Encuesta Pre-tratamiento a productores apícolas participantes del monitoreo de colmenas en provincia de Santa Fe (2013).

Fecha: _____ Nombre del Apiario: _____ Número de
colmenas: _____
RENAPA: _____ Ubicación geográfica
(georreferenciada): _____
Antigüedad en la Actividad (años): _____ Tipo de actividad:
Primaria/Secundaria

1- ¿Utiliza algún suplemento de polen?

Si: _____ No: _____

En caso afirmativo ¿Cuál utiliza?

a- Polen Natural b-Torta de polen c-Polivitamínicos

¿En qué estación del año lo realiza?

a- Otoño b-Primavera

Lo realiza:

a- En general todos los años b-En Condiciones particulares

Observaciones:

2- ¿Alimenta las colmenas con jarabe de azúcar o algún otro de suplementoenergético?

Si: _____ No: _____

En caso afirmativo, especificar ¿qué alimento utiliza?

a-Jarabe de azúcar b-Jarabe de maíz de alta fructosa
c- miel

¿En qué estación del año lo aplica?

a- Otoño b-Invierno c-Primavera

Lo realiza:

a-En general todos los años b-En condiciones
particulares

Observaciones:

3- ¿Realiza recambio de reinas?

Si: _____ No: _____

En caso afirmativo, ¿Cada cuántos años?

a- Todos los años b-Cada dos años c-Más de dos años

¿Qué porcentaje de colmenas por temporada?

a- Menos del 50% b-50 % c-Más del 50%

4- ¿Realiza Núcleos?

Si: _____ No: _____

¿Sobre qué porcentaje del apiario?

Observaciones:

Anexo3. Encuesta Post-tratamiento a productores apícolas participantes del monitoreo de colmenas en provincia de Santa Fe (2013).

Fecha:

Identificación del apiario:

Técnico:

1- ¿Qué producto acaricida aplicó?

2- ¿Cuándo realizo la aplicación?

Anexo 4. Encuesta de Invierno a productores apícolas participantes del monitoreo de colmenas en provincia de Santa Fe (2013).

Fecha:

Identificación del apiario:

Técnico:

1- ¿Qué tipo de alimentación se utilizó en las colmenas durante esta temporada?

a- Jarabe de azúcar

b-Jarabe de maíz de alta fructosa

c-Otros

Observaciones:

2- ¿Qué producción promedio de miel (en kilos por colmena) se registró en la temporada 2013?

