

**Informe de Pasantía**

**Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Profundización en Etología**

**Evaluación del comportamiento de *grooming*  
en dos razas de abejas melíferas (*Apis  
mellifera*) como mecanismo de resistencia al  
ácaro ectoparásito *Varroa destructor***

**Ignacio Zefferino**

**Orientador: Ciro Invernizzi**

**Facultad de Ciencias - Universidad de la República**

**Montevideo, Uruguay**

**2012**

## INTRODUCCIÓN

### **Integración y organización de las colonias de abejas melíferas**

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) son insectos eusociales ya que reúnen las tres características que distinguen a las sociedades verdaderas: división de la tarea reproductiva con presencia de castas estériles, cuidado cooperativo de la cría y superposición dentro de una colonia de, al menos, dos generaciones adultas (Michener, 1974; Seeley, 1995).

La selección natural, actuando principalmente a nivel de la colonia, ha moldeado un sistema de organización complejo que integra la actividad de miles de individuos. Las interacciones sociales en las colonias han permitido a las abejas melíferas la evolución de una historia de vida compleja con la cual pueden sobrevivir en ambientes tropicales y templados. Para que ésta pueda ser entendida se deben considerar conjuntamente la arquitectura del nido y la biología y funciones de sus habitantes (Michener, 1974; Winston, 1987; Holldobler & Wilson, 1990; Seeley, 1995).

A nivel individual, las abejas melíferas poseen tres tipos de miembros en la colonia: la reina, las obreras y los zánganos, cada uno con sus propias especializaciones y ocupan un determinado lugar en la sociedad (Michener, 1974; Winston, 1987). En condiciones normales, las colonias de abejas poseen sólo una reina, que se encarga de la reproducción y controla muchas actividades de la colonia a través de la producción de feromonas, que inciden fuertemente en el comportamiento y fisiología de las obreras. Los otros miembros sexuales de ésta sociedad, los zánganos, son atendidos y alimentados por las obreras, y cumplen solamente la función de fecundar a la reina para luego morir. Las obreras son los integrantes más numerosos de las colonias (en torno a 60000 en el pico de desarrollo de la colonia) y son las encargadas de realizar la gran mayoría de las tareas, incluyendo el cuidado de la cría y de la reina, construcción de panales, defensa del nido, colecta de alimentos, termorregulación y limpieza del nido (Michener, 1974; Winston, 1987). Las obreras presentan una división del trabajo organizándose en castas etológicas en las cuales las abejas más jóvenes realizan actividades dentro del nido mientras que las más viejas se encargan de las actividades externas. La estructura de estas castas es muy flexible ya que las abejas pueden cambiar rápidamente de actividades, e incluso revertir la secuencia temporal, en respuesta a cambios en las necesidades de la colonia (Winston, 1987; Seeley, 1995).

En condiciones naturales, las abejas melíferas construyen su nido generalmente dentro de cavidades de árboles o en grietas de las rocas, dejando una pequeña entrada la cual es defendida fácilmente. Los panales que forman el nido están contruidos de cera proveniente de glándulas especiales que poseen las obreras en su abdomen. Los panales están formados por celdas hexagonales en las cuales se desarrollan las abejas subadultas, y se almacenan néctar, miel y polen

(Michener, 1974; Winston, 1987).

### **La amenaza de los parásitos y patógenos**

Vivir en sociedades tiene muchas ventajas en comparación con un estilo de vida solitario, ya que la cooperación puede aumentar la eficiencia del cuidado de la cría, el forrajeo, o la defensa contra los distintos predadores (Cremer *et al.*, 2007). Sin embargo, vivir en grupos sociales también conlleva inconvenientes tales como el contagio de variadas enfermedades infecciosas y parásitos, los cuales pueden potencialmente expandirse más fácilmente entre miembros de un grupo cuando lo comparamos con individuos de vida solitaria. Esto se debe a que existe una mayor posibilidad de transmisión cuando los individuos se hallan en altas densidades y tienen un contacto social frecuente. En los insectos sociales, los miembros de un mismo grupo están fuertemente emparentados y por lo tanto son susceptibles a las mismas infecciones parasitarias. Debido a estas características ofrecen condiciones propicias para la propagación de parásitos y patógenos por lo que debieron desarrollar varios mecanismos de defensa para contrarrestar esta amenaza (Cremer *et al.*, 2007).

A lo largo de la evolución de las abejas melíferas han surgido novedosas adaptaciones fisiológicas, comportamentales y de organización de la colonia, para combatir el aumento del riesgo de enfermedades (Evans & Spivak, 2009; Wilson-Rich *et al.*, 2009). Algunos ejemplos de adaptaciones comportamentales son el *grooming*, el comportamiento higiénico, el comportamiento necrofórico o *undertaking*, la fiebre comportamental, las secreciones glandulares, el uso de resinas en la colmena (Evans & Spivak, 2009). El factor común entre estas defensas es que están basadas en acciones colectivas o en comportamientos altruístas de individuos infectados que benefician a la colonia. Por lo tanto dependen de la cooperación de los individuos de grupos sociales que resulta en la evitación, control o eliminación de infecciones parasitarias. A éste fenómeno se le llama “inmunidad social” y actualmente ha recibido mucha atención (Cremer *et al.*, 2007; Evans & Spivak, 2009; Simone *et al.*, 2009; Wilson-Rich *et al.*, 2009).

### **El ácaro *Varroa destructor***

El ácaro ectoparásito *Varroa destructor* es el responsable de la Varroosis en las abejas melíferas (Anderson & Trueman, 2000). *V. destructor* se encuentra estrechamente vinculado a su hospedero, la abeja melífera, ya que carece de una etapa de vida libre. En el ciclo de vida de las hembras existen dos fases: una es la forética, en la cual permanecen sobre las abejas adultas (sean éstas zánganos u obreras) generalmente en la parte dorsal del abdomen por debajo de los escleritos abdominales donde se sostienen de las membranas intersegmentales utilizando las patas y partes bucales (Rosenkranz *et al.*, 2010). La otra fase es la reproductiva que se inicia cuando una *Varroa* madre deja a la abeja

adulta y penetra en una celda ocupada por una cría de obrera o zángano, próxima a ser operculada (Figura 1). Los machos y los estadios ninfales de *V. destructor* tienen una vida corta y sólo se los encuentra dentro de las celdas de cría operculada. Los ácaros se alimentan succionando la hemolinfa de las abejas adultas y de los estadios larvales dentro de las celdas de cría operculadas (De Jong & Soares, 1997; Rosenkranz *et al*, 2010).



**Figura 1.** Hembras de *V. destructor* sobre pupa durante la fase de reproducción (izquierda) y sobre una abeja adulta durante la fase forética (derecha).

*V. destructor* fue descrito por Oudemans (1904) a partir de ejemplares encontrados sobre las abejas melíferas asiáticas *A. cerana* en la isla de Java. Esta especie es la única con importancia económica debido a que pasó con éxito desde su hospedero original *A. cerana* hacia *A. mellifera* cuando esta última fue llevada a Asia por fines productivos (De Jong & Soares, 1997) (Figura 2). Sobre *A. cerana* el ácaro no causa daños graves, fundamentalmente debido a que se reproduce casi exclusivamente en las celdas de zánganos. La pérdida de individuos de esta casta no significa en ningún caso un riesgo para la supervivencia de la colonia. Cuando el ácaro penetra en las celdas de obrera suele presentar un bajo éxito reproductivo y, además, las obreras suelen limpiar eficientemente las celdas con cría parasitada eliminando el ácaro (Rath & Drescher, 1990; Rosenkranz & Tewarson, 1992).



**Figura 2.** Abejas melíferas *A. cerana* (izquierda) y *A. mellifera* (derecha).

Por el contrario, la interacción entre *V. destructor* y *A. mellifera* no se encuentra en equilibrio. En esta especie de abeja, el ácaro tiene la capacidad de reproducirse con éxito tanto en celdas de zánganos como de obreras, aunque prefiere las primeras en una proporción entre 8 y 12 veces mayor que las segundas. Así, en las abejas melíferas occidentales puede llegar a causar la muerte de la colonia en tan solo dos años, a menos que sea tratada por el apicultor (Harbo & Harris, 1999; Le Conte *et al.*, 2010).

Los ácaros *V. destructor* presentan un marcado dimorfismo sexual con muchas adaptaciones morfológicas hacia su hospedero. La hembra adulta es de color marrón rojizo y con un tamaño entre 1.1-1.6 mm. Su cuerpo está adaptado al parasitismo y a la foresia, teniendo una forma elipsoidal y deprimido dorso ventralmente. Los ejemplares adultos tienen cuatro pares de patas en la región pectoral que les permite agarrarse y desplazarse ágil y sorpresivamente. El primer par de patas porta los órganos sensoriales que también sirven de antenas. Los machos son de color pálido a perlado, y son significativamente más pequeños que las hembras en todas las etapas de desarrollo. Poseen un cuerpo con forma redondeada el cual no está quitinizado. Las patas de los machos son más largas en relación a su cuerpo que la de las hembras. El cuerpo entero de los ácaros (incluyendo los apéndices y las partes bucales) se encuentra cubierto por distintos tipos de pelos, permitiendo una óptima adherencia a la abeja (Rosenkranz *et al.*, 2010).

En la década de 1990, las investigaciones sobre la Varroosis sufrieron un cambio drástico al encontrarse que *V. destructor* actúa como vector o inductor de virus de las abejas. Se ha evidenciado que el colapso total de una colonia de abejas melíferas con síntomas típicos de daño, como por ejemplo la presencia de abejas lisiadas, cría dispersa, pérdida eventual de la conducta social coordinada como el comportamiento higiénico o la atención a la reina (Le Conte *et al.*, 2010), como también la disminución rápida en la población de abejas, es un efecto de las infecciones virales más que el efecto de una parasitación directa a través de los ácaros (Allen & Ball, 1996; Ball & Bailey, 1997; Chen & Siede, 2007). Las abejas adultas infectadas tienen una menor longevidad, disminuyen

su capacidad de aprendizaje y presentan dificultad para retornar a la colmena (Rosenkranz *et al.*, 2010).

*V. destructor* ingresó y se dispersó por distintas regiones de Europa, África y Sudamérica en las décadas de 1970 y 1980 llegando a EE.UU. en 1987. Actualmente es casi cosmopolita, aunque aún no ha sido encontrada en Australia (De Jong & Soares, 1997; Rosenkranz *et al.*, 2010).

Desde hace ya varios años la Varroosis es considerada el principal problema sanitario de las abejas melíferas en el mundo (Flores *et al.*, 1998), y causa pérdidas económicas millonarias en la industria apícola, especialmente en los países con climas templados (Rosenkranz *et al.*, 2010).

En Uruguay la especie se detectó por primera vez en 1978 en el departamento de Montevideo, y rápidamente se dispersó por todo el territorio nacional. De acuerdo a registros de la Dirección de Laboratorios Veterinarios «M. C. Rubino» (MGAP) en el período comprendido entre 1985-2005, de 38.464 muestras de abejas analizadas el 77,4% presentaron ácaros, siendo el promedio de infestación (Nº de ácaros/100 abejas), de 7,9% (Invernizzi *et al.*, 2011). Desde finales de la década de 1990 la Varroosis ha aumentado sistemáticamente su incidencia en la apicultura nacional. Actualmente casi la totalidad de las colonias reciben aplicaciones de acaricidas al terminar el verano para evitar pérdidas seguras en otoño e invierno (Invernizzi *et al.*, 2011).

### **Mecanismos comportamentales de resistencia a *V. destructor***

La tolerancia hacia la Varroosis es definida como la capacidad que presenta una colonia de abejas melíferas de coexistir con una infestación del ácaro parásito *V. destructor* sin necesidad de aplicar acaricidas (Rosenkranz, 1999).

Las abejas asiáticas *A. cerana*, hospedero original de *V. destructor*, poseen mecanismos comportamentales de defensa que mantienen a la población de ácaros dentro de límites restringidos evitando así daños importantes a la colonia (Ruttner & Hänel, 1992; Rath & Drescher, 1990; Rosenkranz & Tewarson, 1992; Flores *et al.*, 1998). Esta especie es capaz de detectar los parásitos introducidos en las celdas de obreras, retirarlos y eliminarlos, en una respuesta que se conoce como comportamiento higiénico. Cuando las abejas detectan una pupa infectada con *V. destructor*, hacen un agujero en la tapa de cera de la celda, y de este modo liberan al ácaro, o alternativamente, remueven entera la tapa de cera y retiran la pupa (Rath & Drescher, 1990; Rosenkranz & Tewarson, 1992). Complementariamente las abejas adultas de *A. cerana* son capaces de localizar, morder y eliminar los ácaros que se encuentran sobre sus cuerpos, comportamiento que se conoce como *grooming* (Peng *et al.*, 1987). El *grooming* es una estrategia generalizada entre los vertebrados y artrópodos para eliminar ectoparásitos (Pettis & Pankiw, 1998). En las abejas melíferas adultas implica la habilidad de detectar y remover las *varroas* foréticas de sí mismas (*autogrooming*) o de

sus compañeras (*alogrooming*) (Peng *et al.*, 1987). La eficiencia con que se expresa el comportamiento higiénico y el *grooming* en *A. cerana* podrían explicar la buena tolerancia que presentan esta especie asiática hacia *V. destructor* (Evans & Spivak, 2009; Rosenkranz, 2010).

Las abejas melíferas occidentales *A. mellifera* también presentan los dos comportamientos de resistencia encontrados en las abejas asiáticas aunque son menos eficientes frente a *V. destructor* (Peng *et al.*, 1987; Boecking & Ritter, 1993; Currie & Thamasbi, 2008; Evans & Spivak, 2009; Rosenkranz *et al.*, 2010). El comportamiento higiénico es un mecanismo de resistencia que ayuda a limitar la población de ácaros (Spivak, 1996; Spivak & Reuter, 2001) y mejorar su expresión a través de selección artificial es una alternativa para enfrentar la Varroosis (Spivak & Evans, 2009).

En relación al *grooming* Peng *et al.* (1987) encontraron que *A. cerana* eliminaba más del 99% de los ácaros introducidos a colonias en colmenas de observación, mientras que *A. mellifera* solo conseguía eliminar el 0,3% de los ácaros. Por otro lado, experimentos realizados en colonias pobladas demuestran que *A. cerana* es mucho más eficiente que *A. mellifera* al momento de dañar y eliminar a *V. destructor* (Fries *et al.*, 1996).

Las abejas melíferas son capaces de matar y dañar a las hembras de *V. destructor* encontrando que una proporción de los ácaros desprendidos muestran daños típicos en los apéndices (mutilaciones) y en el idiosoma (región posterior que forma la mayor parte del cuerpo). En este proceso, las abejas utilizan sus piezas bucales y el segundo par de patas (mesotorácicas) para tratar de cortar las patas de los ácaros o dañar la cutícula, provocando la caída de los mismos (Rosenkranz *et al.*, 1997; Stanimirovic *et al.*, 2010) (Figura 3).



**Figura 3.** Hembra de *V. destructor* con un apéndice mutilado por las abejas.

La evaluación del comportamiento de *grooming* de las abejas es problemática. La observación directa o empleando videograbaciones de abejas infectadas en colmenas de observación es muy

difícil por el tiempo que insumen y la imposibilidad de hacer registros continuos (Peng *et al.*, 1987; Moretto *et al.*, 1993; Aumeier, 2001). Por ello, se suele evaluar el comportamiento de *grooming* de las abejas de una colonia de forma indirecta como la proporción de ácaros dañados colectados en el piso de una colmena (Ruttner & Hänel, 1992; Rosenkranz *et al.*, 1997; 1999; Mondragón *et al.*, 2005; Davis, 2009). Sin embargo, existe la posibilidad de que una fracción de los ácaros dañados provenga de la limpieza de las celdas con pupas infectadas (consecuencia del comportamiento higiénico) o incluso que las hormigas puedan mutilar los apéndices de los ácaros. Además, deberían ser considerados solamente los ácaros adultos, ya que los ácaros inmaduros podrían ser dañados durante la eliminación de crías infestadas (Rosenkranz *et al.*, 1997; Aumeier, 2001). La expresión del *grooming* también está sujeta a factores ambientales. Así, Currie & Thamasbi (2008) encontraron que abejas seleccionadas para una alta y baja expresión del *grooming* mantenían las diferencias a 25 y 34°C pero no a 10°C. Por tanto, para evaluar el potencial del *grooming* como un mecanismo de defensa, la influencia de factores ambientales debería ser excluida (Currie & Thamasbi, 2008). Para superar estas dificultades, Currie & Thamasbi (2008) evaluaron el *grooming* en grupos de 100 abejas infectadas confinadas en pequeñas cajas, mientras que Aumeier (2001) observó el comportamiento de una abeja parasitada acompañada por solo una abeja en placas de Petri.

Las abejas africanizadas de Sudamérica se han destacado por presentar una mayor tolerancia a la Varroosis que las abejas europeas (Camazine, 1986; Moretto *et al.*, 1991). Estas abejas africanizadas son híbridos de razas europeas (principalmente *A. m. mellifera* y *A. m. ligústica*) y de abejas africanas *A. m. scutellata*, introducidas en Brasil en 1956 (Collet *et al.*, 2006).

Uno de los mecanismos de resistencia que permitirían a las abejas africanizadas controlar mejor a *V. destructor* es el *grooming* (Moretto *et al.*, 1993; Aumeier, 2001). Moretto *et al.* (1993) compararon individualmente abejas africanizadas con italianas (*A. m. ligústica*) utilizando colmenas de observación y hallaron que las abejas africanizadas conseguían desprenderse los ácaros más rápido que las italianas, ya sea empleando *autogrooming* como recibiendo ayuda de sus compañeras (*alogrooming*). Por otro lado, Aumeier (2001) comparó la respuesta de abejas africanizadas y europeas (*A. m. carnica*) observando abejas infectadas aisladas y halló que las primeras manifiestan con mayor frecuencia diferentes comportamientos de reacción ante el parásito (limpieza, sacudida, mordida, rodamiento e intento de volar).

Moretto *et al.* (1993) determinaron que la heredabilidad del comportamiento de *grooming* era muy alta ( $h^2 = 0,71$ ) lo que permitiría mejorar este comportamiento de resistencia a través de selección artificial. Sin embargo, Stanmirovic *et al.* (2010) evaluaron en condiciones de campo el *grooming* en tres generaciones de reinas hallando valores de heredabilidad más bajos (0,49; 0,18 y 0,16).

## Razas de abejas en Uruguay

En Uruguay predominan las abejas híbridas (conocidas como abejas “criollas”) producto de cruzamientos de las abejas europeas *A. m. mellifera* con las africanas *A. m. scutellata* (Burgett *et al.*, 1995; Diniz *et al.*, 2003; Collet *et al.*, 2006) (Figura 4). Burgett *et al.* (1995) empleando análisis morfométricos y moleculares (ADNmt) encontraron que el 30% de las colonias analizadas correspondían a abejas africanizadas y el 53% a híbridos africanizados. Diniz *et al.* (2003) hallaron casi un 100% de haplotipos africanos en los departamentos limítrofes con Brasil y con un gradiente decreciente de norte a sur. Estos investigadores determinaron que las abejas europeas predominantes correspondían a *A. m. mellifera*, introducidas a la región en diferentes momentos por europeos. Sin embargo, en los últimos años los apicultores han introducido desde Argentina gran cantidad de reinas de abejas italianas *A. m. ligústica*, fundamentalmente en los departamentos del litoral oeste, valorando la mansedumbre que presentan las abejas de esta raza (Yamandú Mendoza, comunicación personal) (Figura 4).



**Figura 4.** Abejas criollas (predominantemente híbridos de *A. m. mellifera* y *A. m. scutellata*) (izquierda) y abejas italianas (*A. m. ligustica*) (derecha).

Se propone estudiar el comportamiento de *grooming* en las abejas melíferas criollas e italianas como una contribución para mejorar el combate a la Varroosis en Uruguay. Para ello se estudiará en condiciones de laboratorio el comportamiento de abejas aisladas artificialmente infectadas y se medirá el número de ácaros desprendidos y mutilados en grupos pequeños de abejas artificialmente infectadas. Complementariamente se determinará la proporción de ácaros mutilados en colonias naturalmente infectadas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el comportamiento de *grooming* en abejas criollas (híbridos de *A. m. mellifera* y *A. m. scutellata*) e italianas (*A. m. ligustica*) como mecanismo de defensa frente al ácaro parásito *V. destructor*.

### **Objetivos específicos**

En abejas criollas e italianas:

- 1) Estudiar el comportamiento individual de abejas artificialmente infectadas confinadas en placas de Petri.
- 2) En condiciones de laboratorio medir el número de ácaros desprendidos y mutilados de pequeños grupos de abejas artificialmente infectadas.
- 3) En condiciones de campo determinar la proporción de ácaros mutilados en colonias naturalmente infectadas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los experimentos fueron realizados entre los meses de febrero y mayo del año 2011 en la Estación Experimental “La Estanzuela” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), ubicada en la Ruta 50 del Km 11 del departamento de Colonia.

Se realizaron tres experimentos utilizando abejas criollas e italianas. Las abejas criollas son polihíbridos donde predominan la raza europea *A. m. mellifera* y la africana *A. m. scutellata* (Diniz *et al.* 2003). Las colonias utilizadas fueron traídas del departamento de Cerro Largo donde la africanización de las abejas es muy importante. Las colonias de abejas italianas (*A. m. ligustica*) fueron aportadas por un apicultor del departamento de Colonia que las obtuvo de Argentina. Los ácaros *V. destructor* utilizados en los experimentos provenían de colonias fuertemente infestadas. Estos fueron colectados horas antes de realizar los experimentos desoperculando las celdas y extrayendo las larvas y pupas. Los ácaros obtenidos se mantuvieron en tubos Eppendorf hasta el inicio de los experimentos (Figura 5).



**Figura 5.** Colecta de hembras de *V. destructor* en celdas de cría de obrera (izquierda) y tubos Eppendorf con los ácaros colectados (derecha).

### Experimento 1

Se pusieron individualmente 24 abejas italianas y 24 criollas en placas de Petri empleando 4 abejas por colonia ( $n = 6$ ) para cada raza. Luego de colocarles un ácaro sobre la parte dorsal del tórax con ayuda de un pincel pequeño (Figura 6), se observaron durante dos minutos, registrando la expresión de cinco comportamientos descritos por Aumeier (2001):

*Limpieza:* consiste en refregarse perezosamente las antenas.

*Sacudida:* consiste en agitar brevemente el abdomen.

*Mordida:* intento de desprenderse el ácaro con las mandíbulas.

*Rodamiento:* consiste en hacer volteretas mientras se intenta atrapar al ácaro utilizando todos los pares de patas.

*Intento de volar:* consiste en vuelos muy cortos.

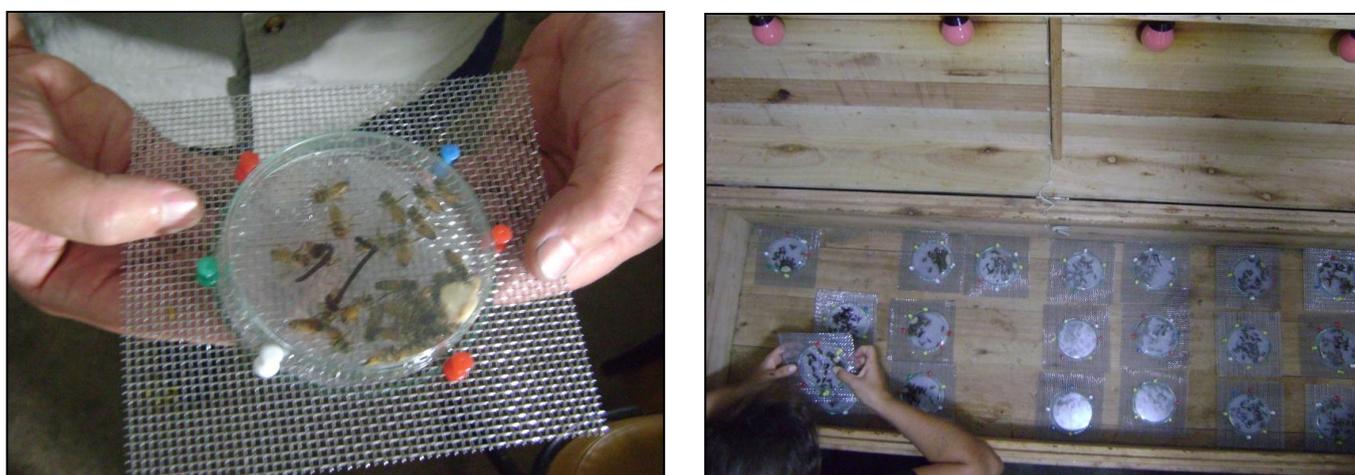
Se registraron los distintos comportamientos teniendo en cuenta si ocurrían en el primer o segundo minuto. También se registró si el ácaro caía o no luego de finalizado el período de observación.



**Figura 6.** Abeja nodriza en placa de Petri a la que se le coloca en el tórax una hembra de *V. destructor* con ayuda de un pincel pequeño.

## Experimento 2

El comportamiento de *grooming* de 13 colonias italianas y 13 criollas fue evaluado colocando de cada colonia 30 abejas nodrizas (colectadas de los panales con cría) junto con 20 ácaros en placas de Petri. Antes de poner las abejas en las placas, las mismas fueron enfriadas para facilitar su manipulación. Entre la placa de Petri y su tapa se colocó una malla de metal de 3 mm que al invertirlas funcionaba como piso para las abejas y permitía el pasaje de los ácaros desprendidos. En el fondo de la caja de Petri se colocó un papel con una capa de vaselina para coleccionar los ácaros caídos. En cada placa se puso una pequeña pelota de “candy” (mezcla de miel y azúcar impalpable) para alimentar las abejas. Una vez verificado que todos los ácaros estuvieran sobre las abejas, las placas se llevaron a una estufa a 28°C (Figura 7).



**Figura 7.** Grupos de 30 abejas nodriza infectadas con 20 hembras de *V. destructor* en una placa de Petri (izquierda). Estufa en donde los grupos de abejas experimentales permanecían 24 horas (derecha).

Luego de 24 hs se retiraron las placas de la estufa y se registró el número de abejas muertas. Posteriormente se extrajo la hoja con los ácaros colectados, y las abejas se mataron por congelamiento en un freezer. Las abejas muertas se pusieron en un recipiente con agua hirviendo para desprender los ácaros que hubiesen permanecido en sus cuerpos. Los ácaros caídos se observaron con lupa binocular (40 x) para registrar si presentaban apéndices cortados o daños en el idiosoma. No se tomaron en cuenta las experiencias en las cuales murieron más del 10% de las abejas.

## Experimento 3

Se colectaron durante más de 10 días los ácaros caídos en 10 colonias italianas y 10 criollas empleando para ello pisos técnicos. Estos pisos tienen un fondo de malla de 3 mm y una bandeja

para poner una hoja con una capa de vaselina que atrapa los ácaros caídos (Figura 8). Se observaron 30 ácaros por colonia bajo lupa binocular (40 x), determinándose la proporción de ácaros con patas cortadas.



**Figura 8.** Extracción de hoja envaselinada de los pisos técnicos de las colmenas experimentales (izquierda). Ácaros *V. destructor* adheridos a las hojas (derecha).

### **Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos fueron analizados para verificar si su distribución era normal y si había homogeneidad de varianza. En caso de que así fuera se emplearán tests estadísticos paramétricos.

En el Experimento 1, el *grooming* fue medido como el promedio por abeja de cada una de las razas del número total de reacciones comportamentales. Las diferencias de *grooming* entre las razas se analizaron mediante el test de Mann-Withney. También se calcularon y representaron los estadísticos básicos para todas las categorías comportamentales.

En el Experimento 2, el *grooming* fue medido como la proporción de ácaros caídos sobre el número total de ácaros. En este caso el *grooming* en ambas razas fue cotejado mediante el test de Student para los valores medios.

En el Experimento 3, se evaluó el *grooming* de las colonias como el porcentaje de ácaros dañados. Las diferencias en el *grooming* entre las colonias de las razas italiana y criolla se analizaron mediante el test de Student para los valores promedios.

Finalmente se correlacionaron linealmente los resultados obtenidos en aquellas colonias que participaron en los Experimentos 2 y 3.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el nivel de significación establecido a 5% utilizando el programa Past 2.09.

## RESULTADOS

### Experimento 1

Los comportamientos “Limpieza”, “Sacudida”, “Mordida”, “Rodamiento” e “Intento de volar” fueron observados con muy baja frecuencia en las abejas italianas y criollas (Tablas 1 y 2, Figura 9). Las abejas de ambas razas no mostraron diferencias significativas para ninguno de los cinco comportamientos observados (Figura 9). También se observaron dos abejas criollas realizando aleteos constantes durante los dos minutos de observación.

Sin embargo, las abejas criollas mostraron mayor número total de comportamientos de reacción frente a *V. destructor* ( $1,96 \pm 1,57$ /abeja) que las italianas ( $1,04 \pm 1,00$ /abeja), observándose diferencias significativas ( $U = 182.5$ ;  $P = 0.025$ ) (Figura 9). En general, cada abeja reaccionó entre una y seis veces durante los dos minutos que fue observada, llegando a efectuar cuatro veces el mismo comportamiento. De todos modos, el 20% de las abejas criollas y el 29% de las abejas italianas no realizaron ningún comportamiento de reacción frente al ácaro (Tablas 1 y 2). En todas las categorías comportamentales las abejas criollas respondieron con mayor frecuencia que las italianas (Figura 9). Para ambas razas, los comportamientos de “Limpieza” y “Sacudida” fueron los más frecuentes, representando más del 60% del total de los comportamientos de resistencia observados (Figura 9). Por otro lado, solamente dos abejas italianas y dos africanizadas (8% del total) mordieron a sus respectivos ácaros (Tablas 1 y 2). No se encontraron diferencias significativas en el número de comportamientos de reacción frente a *V. destructor* entre el primer y segundo minuto del período observado para las razas criollas e italianas ( $P = 0.570$  y  $P = 0.490$  respectivamente). Solamente dos abejas italianas y una criolla (6.25% del total) lograron desprenderse con éxito el ácaro del cuerpo durante el periodo de observación.

**Tabla 1.** Expresión de los comportamientos “Limpieza”, “Rodamiento”, “Mordida”, “Intento de volar” y “Sacudida”, en abejas italianas al colocarles una hembra de *V. destructor* en el tórax.

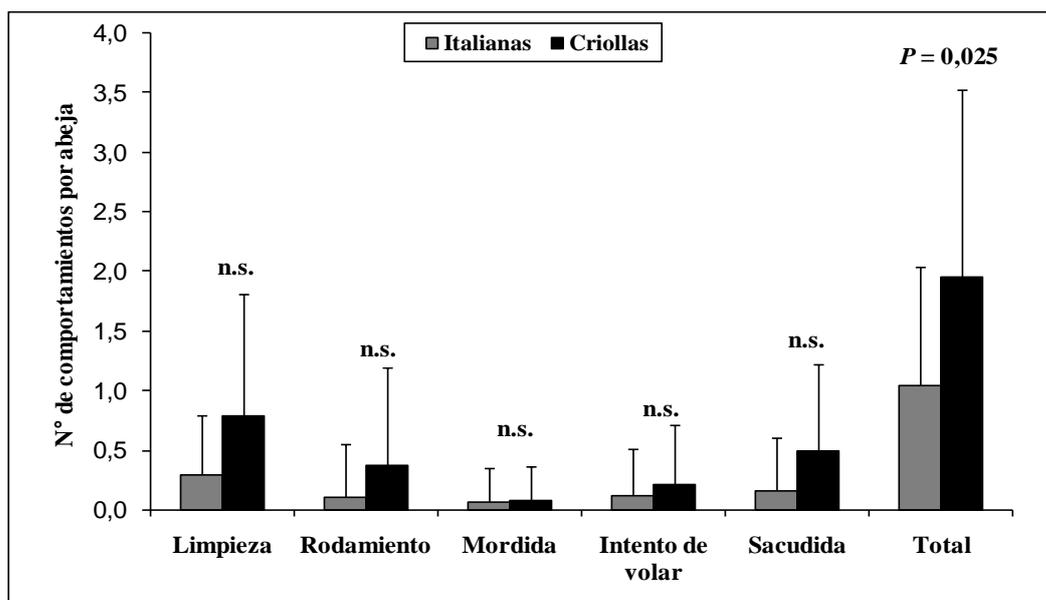
Abeja	ITALIANAS															Total	T1	T2
	Limpieza			Rodamiento			Mordida			Intento volar			Sacudida					
	1	2	$\Sigma$	1	2	$\Sigma$	1	2	$\Sigma$	1	2	$\Sigma$	1	2	$\Sigma$			
1AI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
2AI	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
3AI	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	2
4AI	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1
5AI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7AI	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1BI	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
2BI	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	0	1	1	0	1	4	3	1
3BI	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
4BI	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	1
5BI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7BI	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1CI	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
2CI	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	2	0
3CI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4CI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5CI	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	0
7CI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1DI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2DI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3DI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
4DI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5DI	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
7DI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
<b>Total</b>	6	4	10	1	2	3	1	1	2	2	2	4	4	2	6	25	14	11
$\bar{x}$	0,25	0,21	0,29	0,23	0,06	0,10	0,08	0,04	0,06	0,08	0,08	0,13	0,17	0,13	0,17	1	1	0
$\sigma$	0,44	0,38	0,50	0,20	0,28	0,45	0,20	0,20	0,28	0,28	0,28	0,38	0,38	0,28	0,44	1	1	1

$\bar{x}$ : media;  $\sigma$ : desvío estándar; T1: primer minuto de observación; T2: segundo minuto de observación.

**Tabla 2.** Expresión de los comportamientos “Limpieza”, “Rodamiento”, “Mordida”, “Sacudida” e “Intento de volar” en abejas criollas al colocarles una hembra de *V. destructor* en el tórax.

Abeja	CRIOLLAS															Total	T1	T2
	Limpieza			Rodamiento			Mordida			Intento volar			Sacudida					
	1	2	Σ	1	2	Σ	1	2	Σ	1	2	Σ	1	2	Σ			
17AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	2	1	1
28AC	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	1	2
35AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36AC	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
107AC	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
17BC	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	3	2	1
24BC	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
28BC	1	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	2	1
35BC	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	0
36BC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107BC	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	0
17CC	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
24CC	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	0
28CC	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
35CC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36CC	0	1	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	5	2	3
107CC	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
17DC	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
24DC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	2	0
28DC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35DC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	2	0
36DC	2	2	4	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	6	3	3
107DC	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0	1	4	2	2
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>47</b>	<b>26</b>	<b>21</b>
$\bar{x}$	0,33	0,46	0,79	0,13	0,25	0,38	0,04	0,04	0,08	0,08	0,13	0,21	0,50	0,00	0,50	2	1	1
$\sigma$	0,56	0,72	1,02	0,34	0,74	0,82	0,20	0,20	0,28	0,28	0,34	0,51	0,72	0,00	0,72	2	1	1

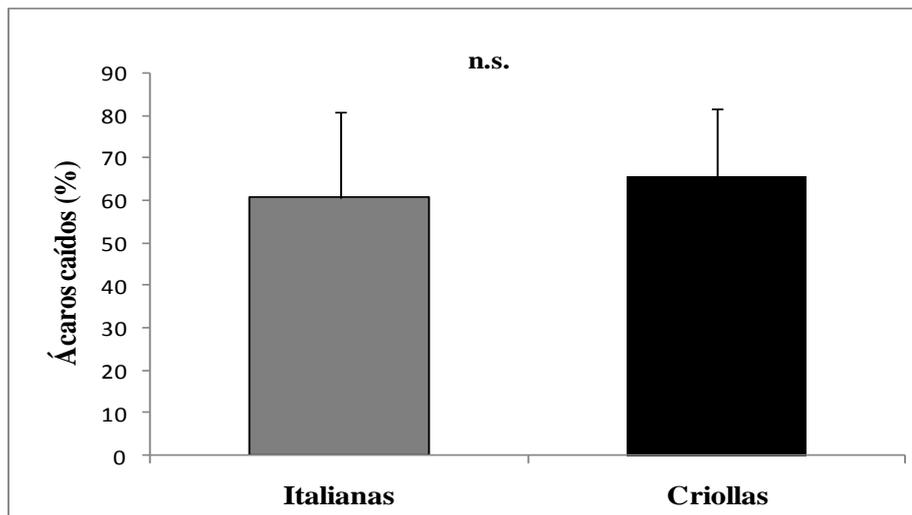
$\bar{x}$ : media;  $\sigma$ : desvío estándar; T1: primer minuto de observación; T2: segundo minuto de observación.



**Figura 9.** Frecuencia de aparición de los comportamientos “Limpieza”, “Rodamiento”, “Mordida”, “Intento de volar” y “Sacudida”, en abejas italianas y criollas. n.s.: sin diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) para el test de Mann-Withney.

## Experimento 2

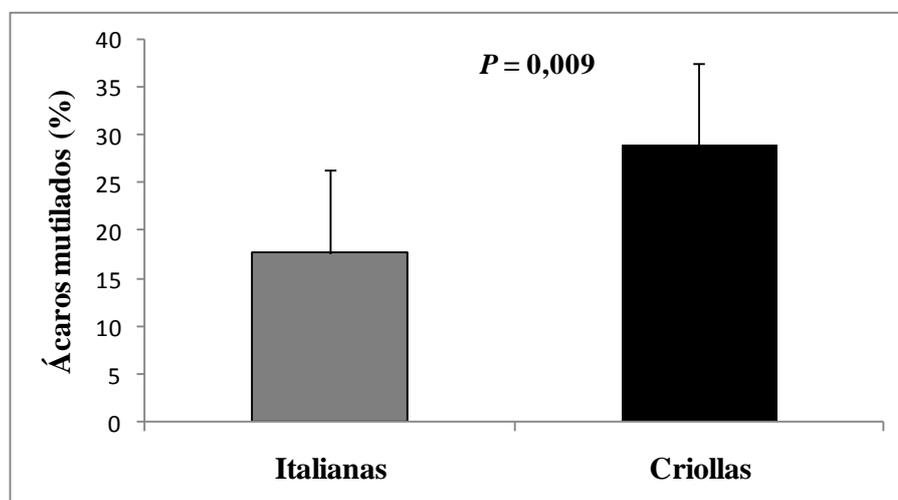
Las abejas italianas consiguieron desprenderse el  $60,80 \pm 20\%$  de los ácaros y las criollas el  $65,90 \pm 15,60\%$  no mostrando diferencias significativas ( $t = 0.735$ ;  $P = 0.47$ ) (Figura 10). Las abejas italianas y criollas tuvieron globalmente una mortandad del 1.79% y 1.53%, respectivamente. De los 312 ácaros totales caídos, en ninguno se observó apéndices cortados o hendiduras en el idiosoma.



**Figura 10.** Porcentaje de ácaros *V. destructor* caídos en los grupos de abejas italianas y criollas. n.s: sin diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) para el test de Student.

## Experimento 3

En los ácaros colectados en los pisos técnicos la fracción que presentaba apéndices mutilados fue mayor en las colonias criollas ( $29,00 \pm 8,61\%$ ) que en las italianas ( $17,70 \pm 9,80\%$ ), mostrando diferencias significativas ( $t = -2.92$ ;  $P = 0,009$ ) (Figura 11). En las colonias criollas el porcentaje de ácaros dañados osciló entre 20 y 40%, mientras que en las colonias italianas entre 10 y 33%.



**Figura 11.** Porcentaje de ácaros *V. destructor* con apéndices mutilados en las colonias de abejas italianas y criollas. n.s: sin diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) para el test de Student.

Finalmente, el valor de correlación lineal entre el porcentaje de ácaros mutilados colectados con pisos técnicos (Experimento 3) y la cantidad de ácaros desprendidos en las pruebas de laboratorio (Experimento 2) considerando las 18 colonias empleadas en ambos experimentos (10 criollas y 8 italianas) fue de  $r = 0,157$ . Este valor aumentó considerablemente cuando descartó la colonia N°13 ( $r = 0,443$ ). Esta colonia mostró un comportamiento completamente alejado de la tendencia de las demás colonias, presentando la mayor cantidad de ácaros desprendidos en el Experimento 2 y el menor valor de *grooming* en el Experimento 3.

## DISCUSIÓN

El comportamiento de *grooming* como mecanismo de resistencia a los ácaros *V. destructor* puede tener un valor significativo en la búsqueda de abejas más tolerantes a este parásito (Rosenkranz, 2010). Este comportamiento de resistencia se evalúa convencionalmente como la proporción de ácaros mutilados colectados en el piso de la colmena (Ruttner & Hänel, 1992; Rosenkranz *et al.*, 1997; 1999; Mondragón *et al.*, 2005; Davis, 2009) o, más recientemente, en pruebas de laboratorio observando respuestas individuales (Aumeier, 2001) o grupales (Currie & Tahmasbi, 2008), luego de infectar artificialmente las abejas con *V. destructor*. En este estudio se realizaron las tres aproximaciones para evaluar el comportamiento de *grooming* en abejas italianas (*A. m. ligústica*) y criollas (cruzamientos de las abejas europeas *A. m. mellifera* con las africanas *A. m. scutellata*).

En el primer experimento durante la observación de abejas solitarias infectadas con hembras de *V. destructor* se registraron en los dos grupos raciales los cinco comportamientos observados por Aumeier (2001): “Limpieza”, “Sacudida”, “Mordida”, “Rodamiento” e “Intento de volar”. La muy baja frecuencia con que se presentaron todos estos comportamientos también es coincidente con lo reportado por Aumeier (2001) y puede ser la causa que impidió constatar diferencias entre las abejas italianas y criollas. Sin embargo, al analizar todos los comportamientos agrupados se encontró que las abejas criollas reaccionaban frente a *V. destructor* en mayor medida que las abejas italianas. Analizando los datos de manera similar Aumeier (2001) encontró también que las abejas africanizadas reaccionaban con mayor frecuencia que las europeas (en este caso *A. m. carnica*) cuando se les ponía una hembra de *V. destructor* sobre el tórax.

En este estudio se encontraron dos abejas criollas que aletearon permanentemente durante el periodo de observación. Este comportamiento no había sido descrito por Aumeier (2001). El aleteo es una de las respuestas que presentan las abejas frente a la presencia de hormigas (Fell, 1997). Es

posible que el aleteo que presentaron las abejas infectadas con *V. destructor* sea una reacción similar.

De las 48 abejas observadas, sólo tres (dos italianas y una criolla) consiguieron desprenderse el ácaro. El bajo número de abejas que pudieron desparasitarse puede deberse al corto periodo de observación (dos minutos) y/o a la ausencia de abejas acompañantes por lo que las abejas parasitadas no podían recibir ayuda de otras abejas (*alogrooming*). Peng *et al.* (1987) y Moretto *et al.* (1993) señalan que el *alogrooming* es muy importante en la desparasitación de las colonias. De todos modos, *V. destructor* es un parásito especializado que consigue adherirse fuertemente buscando zonas del cuerpo en las cuales las abejas no consiguen atacarlas.

En el segundo experimento se pusieron grupos de abejas italianas y criollas artificialmente infestadas con ácaros en cajas de Petri encontrando que el número de ácaros desprendidos fue algo superior al 60 %, sin encontrar diferencias entre ambos grupos raciales. Este resultado contrasta con el obtenido en el experimento anterior de este estudio, donde las abejas criollas mostraron mayor cantidad de comportamientos de reacción frente a *V. destructor* que las abejas italianas.

El análisis de los ácaros caídos no mostró ningún ejemplar con mutilaciones, tal como es frecuente observar en los ácaros colectados en pisos técnicos (20-30%) (Ruttner & Hänel, 1992; Rosenkranz *et al.*, 1997; Bienefeld *et al.*, 1999; Mondragón *et al.*, 2005; Davis, 2009; este estudio). Posiblemente en las colonias en condiciones naturales la enorme mayoría de los ácaros desprendidos por las abejas no sufren daños y caen sobre otras abejas sin mayor consecuencia desde el punto de vista de la desparasitación de la colonia. En caso de que los ácaros caigan al piso de la colmena, éstos seguramente tienen la capacidad de volver a subir caminando y entrar en contacto nuevamente con las abejas. En este sentido, Estela Santos (com. per) ha observado a hembras de *V. destructor* caminando en el laboratorio y plantea que podrían subir del piso de la colmena al nido sin dificultad. En cambio, aquellos ácaros que sufren mutilaciones en sus apéndices probablemente tengan dificultad para agarrarse del cuerpo de las abejas, queden más expuestos a ser desprendidos por éstas y terminen muriendo como consecuencia de las heridas. Así, es posible que cuando se colectan los ácaros caídos con pisos técnicos la proporción de ácaros mutilados/ácaros sanos sea mayor que la hallada en el total de ácaros desprendidos por las abejas.

La evaluación del comportamiento de *grooming* empleando pequeños grupos de abejas confinadas artificialmente infestadas permite descartar factores ambientales no controlados en condiciones de campo (ingreso de néctar, grado de infestación, temperatura ambiente, tamaño de la colonia, etc.). Con esta técnica Currie & Tahmasbi (2008) consiguieron a través de una selección disruptiva, abejas que expresan alta y baja eficiencia en el *grooming*.

En el último experimento se evaluó el comportamiento de *grooming* de abejas de colonias italianas y criollas con la metodología convencional utilizando pisos técnicos. Se encontró que las

colonias criollas presentaban casi el doble de proporción de ácaros mutilados que las colonias italianas. Estos resultados coinciden con los reportados por Moretto *et al.* (1993) y Aumeier (2001) cuando evaluaron el comportamiento de *grooming* en abejas africanizadas y europeas empleando distintas metodologías.

Desde hace varios años se reconoce la mayor resistencia de las abejas africanizadas a la Varroosis en comparación con las abejas europeas (Camazine, 1986; De Jong & Soares, 1997; Moretto *et al.*, 1991; Rosenkranz *et al.*, 2010). Esta resistencia diferencial suele ser explicada por diferentes factores como el comportamiento higiénico, el comportamiento de *grooming*, la duración del período de cría, el tamaño de las celdas, la frecuencia de enjambrazón y la atractividad de la cría (De Jong, 1997; Rosenkranz *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio, junto con los de Moretto *et al.* (1993) y Aumeier (2001) muestran que el *grooming* puede ser un factor de primer orden de importancia para explicar la mayor resistencia de las abejas africanizadas a *V. destructor*.

### **Consideraciones finales**

El *grooming* es un mecanismo de resistencia comportamental de las abejas melíferas al ácaro *V. destructor* que es plausible de seleccionar para aumentar la tolerancia al parásito. Al momento de implementar una metodología para evaluar una característica valiosa heredable se debe tener en cuenta la incidencia de factores ambientales, y la practicidad y economía de su aplicación. Los resultados de este estudio indican que el empleo de grupos homogéneos de abejas confinadas y parasitadas con cantidades conocidas de *V. destructor* en condiciones de laboratorio, es una alternativa promisoriosa para evaluar el *grooming* de las colonias. El alto valor de asociación entre los resultados de estas pruebas y las evaluaciones de campo empleando pisos técnicos respaldan esta posibilidad. De todos modos, las evaluaciones del *grooming* en laboratorio llevan mucho tiempo, fundamentalmente en la obtención de cantidades importantes de hembras de *V. destructor* para infectar las abejas, por lo que quedarían restringidas a grupos de investigadores y profesionales técnicos que cuenten con los recursos necesarios.

La observación individual de abejas infectadas con *V. destructor* sirve para identificar las diferentes respuestas comportamentales, pero por el tiempo que insumen y por tratarse de individuos aislados, son de escaso valor práctico para evaluar indirectamente una colonia.

Los resultados de este estudio muestran que las abejas criollas presentes en Uruguay, con un importante grado de africanización (aunque en general no tanto como el de las abejas utilizadas) expresan el comportamiento de *grooming* frente a *V. destructor* de modo más eficiente que las abejas italianas. Como la Varroosis es el principal problema sanitario de las abejas melíferas en el país

(Invernizzi et al., 2011) se debería tener mucha precaución al momento de ingresar y multiplicar abejas italianas, ya que se corre el riesgo de ir debilitando este mecanismo de resistencia comportamental en las poblaciones de abejas debido a la imposibilidad de evitar el cruzamiento entre abejas de diferentes razas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D.L., Trueman, J.W.H., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24, 165–189.
- Allen, M., Ball, B., 1996. The incidence and world distribution of honeybee viruses. *Bee World* 77, 141-162.
- Aumeier, P., 2001. Bioassay for grooming effectiveness towards *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees. *Apidologie* 32, 81–90.
- Ball, B.V., Bailey, L., 1997. Viruses. In: *Honey bee pests, predators and diseases*. 3<sup>rd</sup> ed. (R.A. Morse and K. Flottum, Eds). A.I. Root Company; Medina, Ohio, pp 11-31.
- Boecking, O., Ritter, W., 1993. Grooming and removal behavior of *Apis mellifera intermissa* in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. *J. Apicult. Res.* 32, 127–134.
- Burgett, M., Shorney, S., Cordara, J., Gardiol, G., Sheppard, W.S., 1995. The present status of Africanized Honey Bees in Uruguay, *Am. Bee J.* 135, 328-330.
- Camazine, S., 1986. Differential reproduction of the mite, *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae), on Africanized and European honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, 801–803.
- Chen, Y.-P., Siede, R., 2007. Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* 70, 33–80.
- Collet, T., Ferreira, K.M., Arias, M.C., Soares, A.E.E., Del Lama, M.A, 2006. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. *Heredity* 97, 329-335.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P. 2007. Social Immunity. *Current Biology* 17, 693-702.
- Currie, R.W., Tahmasbi, G.H., 2008. The ability of high- and low-grooming lines of honey bees to remove the parasitic mite *Varroa destructor* is affected by environmental conditions. *J. Can. Zool.* 86, 1059–1067.
- Davis, A.R., 2009. Regular dorsal dimples on *Varroa destructor*— damage symptoms or developmental origin? *Apidologie* 40, 151–162.

- De Jong, D., Soares, A.E.E., 1997. An isolated population of Italian bees that has survived *Varroa jacobsoni* infestation without treatment for over 12 years. *Am. Bee J.* 137, 742–745.
- Diniz, N.M., Egea, A.E., Sheppard, W.S., Del Lama, M.A., 2003. Genetic structure of honey bee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* 26, 47-52.
- Evans, J.D., Spivak, M., 2009. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 62–72.
- Fell, R.D. 1997. Insects: Hymenoptera (ants, wasps, and bees). In: *Honey bee pests, predators, & diseases*. Morse, R A; Flottum, K (eds). A. I. Root Company, Medina, Ohio. Pp. 163 – 202.
- Flores, J.M., Ruiz, J.A., Ruiz, J.M., Puerta, F., Campano, F., Padilla, F., Bustos, M., 1998. El *grooming* en *Apis mellifera* ibérica frente a *Varroa Jacobsoni* Oud. *Arch. Zootec.* 47, 213-218.
- Fries, I., Wie, H., Shi, W., Huazhen, S.X., 1996. Grooming behavior and damaged mites (*Varroa jacobsoni*) in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apidologie* 34, 3–11.
- Harbo, J.R., Harris, J.W., 1999. Heritability in honey bees (Hymenoptera Apidae) of characteristics associated with resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *J. Econ. Entomol.* 92, 261–265.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. *The ants*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 733pp.
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Campa, J.P., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E., Zunino, P., 2011. Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria* 47, 15-27.
- 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.
- Michener, C.D., 1974. *The Social Behaviour of the Bees: A Comprehensive Study*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge. Massachusetts. USA. 404 pp.
- Mondragon, 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.
- Moretto, G., Goncalves, 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.
- Moretto, G., Goncalves, L.S., De Jong, D., 1993. Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. *Rev. Brasil. Genet.* 16, 71–77.
- Oudemans, A.C., 1904. On a new genus and species of parasitic acari. *Notes from the Leyden Museum* 24, 216–222.
- Peng, Y.S., Fang, Y., Xu, S., Ge, L., 1987. The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis*

- cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. J. Invertebr. Pathol. 49, 54–60.
- Pettis, J.S., Pankiw, T., 1998. Grooming behavior by *Apis mellifera* L. in the presence of *Acarapis woodi* (Rennie) (Acari: Tarsonemidae). Apidologie 29, 241-253.
- Rath, W., Drescher, W., 1990. Response of *Apis cerana* Fabr towards brood infested with *Varroa Jacobsoni* Oud and infestation rate of colonies in Thailand. Apidologie 21, 311-321.
- Rosenkranz, P., Tewarson, N.C., 1992. Experimental infection of *Apis cerana indica* worker brood with *Varroa* females. Apidologie 23, 365–367.
- Rosenkranz, P., 1999. Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. Apidologie 30, 159–172.
- Rosenkranz, P., Fries, I., Boecking, O., Stürmer, M., 1997. Damaged *Varroa* mites in the debris of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies with and without hatching brood. Apidologie 28, 427–437.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. J Invertebr. Pathol.103, S96-119.
- Ruttner, F., Hänel, H., 1992. Active defense against *Varroa* mites in a Carniolan strain of honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). Apidologie 23, 173-187.
- Seeley, T.D., 1995. The wisdom of the hive. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Simone, M., Evans, J.D., Spivak, M., 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. Evolution 63-11, 3016-3022.
- Spivak, M., 1996b. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. Apidologie 27, 245–260.
- Spivak, M., Reuter, G.S., 2001. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. J. Econ. Entomol. 94, 326–331.
- Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Nevenka, A., Stojic, V., 2010. Heritability of grooming behaviour in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*). Acta veterinaria 60, 313-323.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N.H., Starks, P.T., 2009. Genetic, Individual and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. Annu. Rev. Entomol. 54, 405-423.
- Winston, M., 1987. *The biology of the honey bee*. Harvard University Press; Cambridge, EUA. 281 pp.