



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Varroa*
PRESENTES EN APIARIOS DEL VALLE DE LOS CHILLOS
(ECUADOR), MEDIANTE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA**

AUTOR: CRUZ ARAUJO, CHRISTYNA FERNANDA

DIRECTOR: Lcda. MARTÍN SOLANO, SARAH M.Sc.

SANGOLQUÍ

2017



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE Varroa PRESENTES EN APIARIOS DEL VALLE DE LOS CHILLOS (ECUADOR), MEDIANTE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA**" realizado por la señorita **CHRISTYNA FERNANDA CRUZ ARAUJO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **CHRISTYNA FERNANDA CRUZ ARAUJO** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí 10 de Enero de 2017

Atentamente,

Director



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **CHRISTYNA FERNANDA CRUZ ARAUJO**, con cédula de identidad N° 1725622896, declaro que este trabajo de titulación **“DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Varroa* PRESENTES EN APIARIOS DEL VALLE DE LOS CHILLOS (ECUADOR), MEDIANTE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas. Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí 10 de Enero de 2017

CHRISTYNA FERNANDA CRUZ ARAUJO

C.C. 1725622896




**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

AUTORIZACIÓN

Yo, **CHRISTYNA FERNANDA CRUZ ARAUJO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **"DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE Varroa PRESENTES EN APIARIOS DEL VALLE DE LOS CHILLOS (ECUADOR), MEDIANTE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA"** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí 10 de Enero de 2017


CHRISTYNA FERNANDA CRUZ ARAUJO
C.C. 1725622896

DEDICATORIA

A Dios, quien ha sido mi guía en este camino, me ha brindado la fortaleza para continuar en los momentos difíciles y poder lograr todo lo que me he propuesto.

A mi hijo Joaquín, por ser la principal motivación que me ha permitido levantarme cada día para superarme y alcanzar mis metas. Por enseñarme a amar verdadera e incondicionalmente.

A mis padres, Nelson y Ximena por darme la vida, su amor incondicional y ser los principales promotores de mis sueños.

A mis maestros, quienes me han compartido sus conocimientos y consejos durante el transcurso de mi carrera universitaria.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la fuerza y fe para creer en mis sueños y permitirme alcanzar este logro, el cual es fruto de sus bendiciones.

A mi hijo, por cada día haberme brindado el amor y la fuerza necesaria para culminar la primera de muchas metas en mi vida.

A mis padres, por su confianza, su amor y su apoyo incondicional en cada decisión que he tomado.

A mi directora de tesis, Lcda. Sara Martín y a mi maestro, Dr. Jorge Ron, por sus conocimientos, orientación, paciencia y motivación, los cuales han sido fundamentales para el desarrollo de mi tesis y mi formación profesional.

A mis amigos y compañeros, porque cada uno de ellos me ha dejado una enseñanza especial y un recuerdo, permitiendo hacer de mi época estudiantil una hermosa experiencia.

Al Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana, GISAH – ESPE y al Laboratorio de Sanidad Animal de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, por permitirme el uso de material biológico e instalaciones para el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Darwin Rueda, por permitirme el uso de las instalaciones y equipos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	
CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I	
PROBLEMA	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.3 Justificación.....	3
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo general.....	4
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
1.5 Hipótesis.....	5
CAPÍTULO II	
MARCO TÉORICO	6
2.1 La importancia de la apicultura en la seguridad alimentaria.....	6
2.1.1 Reseña histórica de la apicultura.....	6
2.1.2 Importancia de las abejas en la polinización.....	7
2.2 Principales enemigos y enfermedades de las abejas.....	9
2.2.1 Enfermedades bacterianas.....	9
2.2.1.1 Loque Europea y Loque Americana.....	9
2.2.2 Enfermedades parasitarias.....	10

2.2.2.1	Ácaro de la tráquea.....	10
2.3	La varroosis: una parasitosis de importancia en las abejas.....	11
2.3.1	Generalidades del agente causal.....	11
2.3.2	Clasificación taxonómica.....	11
2.3.3	Ciclo de vida.....	12
2.3.3.1	Fase forética.....	12
2.3.3.2	Fase reproductiva.....	12
2.3.4	Diseminación de la parasitosis.....	14
2.3.4.1	Entre apiarios y colmenas.....	14
2.3.5	Daños producidos.....	14
2.3.5.1	Generalidades.....	14
2.3.5.2	Daños directos.....	15
2.3.5.3	Daños indirectos.....	16
2.3.6	Morfología de <i>Varroa</i> spp.....	17
2.3.6.1	Diferencias entre especies.....	17
2.3.6.2	Características morfológicas.....	18
2.3.6.2.1	En estados de desarrollo.....	18
2.3.6.2.2	En machos y hembras.....	19
2.3.7	Epidemiología de la varroosis.....	22
2.3.7.1	A nivel mundial.....	22
2.3.7.2	A nivel de América Latina.....	23
2.3.7.3	A nivel de Ecuador.....	24
2.3.7.3.1	Estudios de prevalencia y reportes de especies existentes.....	24
2.3.8	Caracterización de <i>Varroa</i> spp.....	26
2.3.8.1	Caracterización morfológica.....	26
2.3.8.1.1	Fundamentos, ventajas y desventajas.....	26
2.4	La morfometría geométrica, como herramienta de clasificación taxonómica.....	27
2.4.1	Aspectos históricos.....	27
2.4.2	Principios del análisis morfométrico.....	28

2.4.2.1	Fundamentos	28
2.4.2.2	Tamaño y forma	29
2.4.2.2.1	Forma	29
2.4.2.2.2	Tamaño.....	30
2.4.2.3	Tipos de landmark o puntos anatómicos de referencia	31
2.4.2.4	Métodos de Superposición.....	32
2.4.2.4.1	Análisis Generalizado de Procrustes.....	32
2.4.2.5	Métodos de Deformación	34
2.4.2.5.1	Cambio Uniforme y No-uniforme	35
2.4.2.6	Tipos de análisis en morfometría geométrica.....	36
2.4.2.6.1	Análisis de Componentes Principales (PCA).....	36
2.4.2.6.2	Análisis de Variables Canónicas (CVA)	36
2.4.2.6.3	Análisis Cluster o UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic averages).....	37
2.4.2.7	Herramientas informáticas existentes	37

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

39

3.1	Muestreo de especímenes	39
3.1.1	Lugar de muestreo previo	39
3.2	Materiales, reactivos y equipos	42
3.2.1	Materiales y reactivos para almacenamiento y montaje de especímenes.....	42
3.2.2	Equipos para la captura de imágenes	42
3.2.3	Programas informáticos usados para análisis	42
3.3	Métodos previos al análisis	43
3.3.1	Clasificación y etiquetado de especímenes.....	43
3.3.2	Preparación del medio PDA (Potato Dextrose Agar) para montaje de especímenes.....	44
3.3.3	Montaje y fotografía de los especímenes	44
3.3.4	Determinación y digitalización de los puntos anatómicos de referencia (landmarks)	45

3.4	Análisis estadístico	47
3.4.1	Análisis de Componentes Principales	47
3.4.1.1	Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos.....	47
3.4.2	Análisis de Variables Canónicas	47
3.4.2.1	Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos.....	47
3.4.3	Análisis Cluster	48
3.4.3.1	Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos.....	48
3.4.4	Análisis del Tamaño Centroide	48
3.4.4.1	Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos.....	48
3.4.5	Medición del tamaño corporal (ancho y largo) para determinación de especie de <i>Varroa</i>	49
3.4.5.1	Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos.....	49
3.5	Elaboración de ficha técnica de la especie de <i>Varroa</i> presente en los apiarios analizados	49
3.6	Elaboración del plan de acción sanitario para control de <i>Varroa</i> en los apiarios analizados.	50

CAPÍTULO IV

RESULTADOS	51	
4.1	Caracterización de la especie de <i>Varroa</i> mediante morfometría geométrica	51
4.1.1	Determinación de los landmarks o puntos anatómicos de referencia (PAR)	51
4.1.2	Análisis de Componentes Principales	53
4.1.3	Análisis de Variables Canónicas	54
4.1.4	Rejilla de deformación de Análisis de Variables Canónicas	55
4.1.5	Análisis Cluster	56

4.1.6	Diagrama Box - Plot para el Tamaño Centroide	58
4.1.7	Medición (μm) de la talla de especímenes de <i>Varroa</i>	59
4.2	Ficha técnica de <i>Varroa destructor</i>	60
4.3	Plan de acción sanitario para control de <i>Varroa destructor</i>	64
4.3.1	Protocolo tratamiento con Amitraz (Proaño, 2014).....	65
4.3.2	Protocolo tratamiento con Ácido Oxálico (Silvia, 2006)	65
CAPITULO V		
DISCUSIÓN		66
CAPÍTULO VI		
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		70
6.1	Conclusiones	70
6.2	Recomendaciones	71
6.3	Bibliografía.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Impacto económico de la polinización de los insectos en la producción agrícola utilizada directamente para la alimentación humana en todo el mundo.....	9
Figura 2	Ciclo biológico de <i>Varroa</i> spp., en su etapa adulta	13
Figura 3	Especies de <i>Varroa</i> : a. <i>V. jacobsoni</i> vista dorsal; b. <i>V. jacobsoni</i> vista ventral; c. <i>V. destructor</i> vista dorsal; d. <i>V. destructor</i> vista ventral; e. <i>V. rindereri</i> ; f. <i>V. underwoodi</i>	17
Figura 4	Vistas ventral y dorsal de las etapas de desarrollo de hembras de <i>Varroa destructor</i> (arriba) y machos (abajo) en la cría <i>Apis mellifera</i>	18
Figura 5	Estadíos de desarrollo de <i>Varroa destructor</i>	19
Figura 6	Macho de <i>Varroa destructor</i>	19
Figura 7	Vista ventral (izquierda) y dorsal (derecha) de macho de <i>Varroa destructor</i>	20
Figura 8	Vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de hembra de <i>Varroa destructor</i>	21
Figura 9	Vista ventral de <i>Varroa destructor</i> (hembra)	21
Figura 10	Distribución mundial de Varroosis.....	22
Figura 11	Distribución en América Latina de Varroosis.....	24
Figura 12	Mapa de localización de los focos Chimborazo-Chambo	25
Figura 13	Mapa de localización de los focos Pichincha-Nayón.....	26
Figura 14	Cambios en la forma “form” como resultado de cambios de tamaño “size” y de forma “shape”.....	29

Figura 15	Método para estimar el tamaño centroide	30
Figura 16	Análisis Generalizado de Procrustes: Traslación, Rotación y Escalamiento	34
Figura 17	Rejillas de deformación representando el cambio uniforme (a) y no uniforme (b).....	35
Figura 18	Clasificación y etiquetado de especímenes de <i>Varroa</i> según apiario y colmena.....	43
Figura 19	Montaje de especímenes de <i>Varroa</i> en medio PDA.....	45
Figura 20	Fotografiado de especímenes de <i>Varroa</i> con cámara fotográfica para acople directo al ocular y software informático Future Win Joe.....	45
Figura 21	Puntos anatómicos de referencia (landmark) digitalizados en especímenes de <i>Varroa</i> (n=818) presentes en apiarios (n=24) del Valle de los Chillos – Ecuador.....	52
Figura 22	Análisis Generalizado de Procrustes en base a landmarks (n=11) digitalizados para especímenes de <i>Varroa</i> (n=818) presentes en apiarios (n=24) del Valle de los Chillos– Ecuador.....	52
Figura 23	Puntos anatómicos de referencia (landmark) digitalizados en especímenes de <i>Varroa</i> (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador.....	53
Figura 24	Diagrama de Análisis de Componentes Principales para especímenes de <i>Varroa</i> (n=818) presentes en apiarios (n=24) del Valle de los Chillos – Ecuador.....	54
Figura 25	Diagrama de Análisis de Variables Canónicas para especímenes de <i>Varroa</i> (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador.....	55

Figura 26	Rejilla de deformación de Análisis de Variables Canónicas para especímenes de <i>Varroa</i> (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador.....	56
Figura 27	Diagrama de agrupamiento UPGMA (Análisis Cluster) a partir de Distancia Mahalanobis para especímenes de <i>Varroa</i> (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador.	57
Figura 28	Diagrama Box - Plot para el Tamaño Centroide de especímenes de <i>Varroa</i> (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador.....	59
Figura 29	Vista dorsal (A) y ventral (B) de <i>Varroa destructor</i> hembra	62
Figura 30	<i>Varroa destructor</i> macho.....	62
Figura 31	Distribución de <i>Varroa</i> spp.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Localización de los apiarios muestreados en el Valle de los Chillos - Ecuador.....	40
Tabla 2	Colmenas muestreadas y especímenes de <i>Varroa</i> recolectados por apiario.....	41
Tabla 3	Valores de significancia para distancia Mahalanobis para especímenes de <i>Varroa</i> (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador.	58
Tabla 4	Mediciones (μm) de la talla de especímenes de <i>Varroa</i> (n=48) presentes en apiarios (n=24) del Valle de los Chillos - Ecuador, en comparación con los de <i>V. jacobsoni</i> y <i>V. destructor</i> según lo informado por Anderson y Truman (2000); Zhang (2000); Boudagga et al. (2003) y Rahmani et al. (2006).	60

RESUMEN

En la presente investigación se realizó la caracterización morfométrica de *Varroa sp.*, presente en apiarios ubicados en el Valle de los Chillos - Ecuador. Primeramente se fotografiaron a un aumento de 30 x los especímenes de *Varroa* (n=818) pertenecientes a los apiarios (n=24) en estudio. Se digitalizaron los landmarks (n=8) en los ácaros a ser analizados y se determinó, mediante un Análisis de Variables Canónicas (CVA), que los especímenes de los apiarios en estudio, pertenecían a una misma población. Mediante la elaboración de una rejilla de deformación, se determinó que los landmarks ubicados en la placa esternal de *Varroa*, son los que aportaron mayor información para la diferenciación de forma entre apiarios. La realización del Análisis Cluster, para la construcción de un dendrograma basado en el algoritmo UPGMA y distancia Mahalanobis, mostró que el Apiario 4 fue el más disímil en comparación con los apiarios restantes. Para el análisis del Tamaño Centroide se realizó un Diagrama de Box – Plot y una prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, determinándose que no existían diferencias significativas para el tamaño centroide ($p=0,09016$) entre los apiarios en estudio. Al determinar que todos los ácaros analizados pertenecían a una misma población, se eligió al azar especímenes de *Varroa* (n=48), para realizar las mediciones de talla. La longitud corporal promedio de los especímenes analizados fue de 1152,8 μm (1,15 mm) y la medida del ancho del cuerpo fue de 1773,7 μm (1,77 mm). Luego de la realización de los análisis correspondientes se determinó que *Varroa destructor*, se encuentra parasitando a *Apis mellífera*, en apiarios del Valle de los Chillos – Ecuador.

PALABRAS CLAVE:

- *Varroa destructor*
- MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA
- *Apis mellífera*
- VALLE DE LOS CHILLOS (ECUADOR)

ABSTRACT

The present investigation was comprised of a morphometric characterization of *Varroa* sp., present in apiaries in the Los Chillos Valley (Ecuador). Initially, specimens of *Varroa* (n=818) were photographed at an index of 30x, all belonging to the apiaries (n=24) in the study. Geometric morphometry techniques were used as a basis for the analysis, and landmarks (n=8) were digitalized in the analyzed mites. It was determined thru Canonical Variable Analysis (CVA) that the mites present in the apiaries belonged to a unique population, since the superposition of said mites was observed in the multivariate space. It was determined, through use of a deformation grill, that the landmarks located on the sternal plate of *Varroa* were more useful for form differentiation between apiaries. Cluster Analysis resulted in a dendrogram based on the UPGMA algorithm and the Mahalanobis distance, and showed that Apiary 4, was the most dissimilar when compared to the other apiaries. For Centroid Size Analysis, a Box-Plot analysis and a Kruskal-Wallis (non-parametric) test were performed, and resulted in an observation that the centroid size (p=0.09016) did not possess significant differences. Once it was determined that all the mites belonged to the same population, samples of *Varroa* (n=48) were selected at random to perform size. Body length average, was 1152.8 μm , and average body width, was 1773.7 μm . This analysis shows that *Varroa destructor* is present and acting as a parasite on *Apis mellifera* in apiaries in the Los Chillos Valley (Ecuador).

KEY WORDS:

- *Varroa destructor*
- GEOMETRIC MORPHOMETRY
- *Apis mellifera*
- LOS CHILLOS VALLEY (ECUADOR)

CAPÍTULO I

PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

En el Valle de los Chillos, provincia de Pichincha (Ecuador), la apicultura es una actividad económica importante para los apicultores que se dedican a la producción y comercialización de miel de abeja, cera, polen y propóleo, sin embargo la presencia de plagas en las abejas, como el caso del ácaro *Varroa* spp., conllevan a una disminución de la producción, generando pérdidas económicas.

Los signos clínicos de la presencia del ácaro pueden presentarse como una disminución en la producción de la colmena, muchas veces inadvertida por el productor, o bien en los casos de infecciones severas puede provocar la muerte de la colonia. Además de la disminución en la producción individual de colmenas, existe peligro de contaminación de la miel con residuos tóxicos, debido al uso indiscriminado de productos químicos para su control, lo que puede causar una intoxicación al consumir los productos derivados de la apicultura. Puede presentarse también transmisión de otros agentes patógenos en los que *Varroa*, representa un huésped intermediario (Moreno, 2004).

La falta de estudios epidemiológicos y de caracterización de las especies de *Varroa* que se encuentran parasitando a *Apis mellifera* en los apiarios a nivel nacional, ocasiona principalmente que los apicultores no puedan elaborar y ejecutar un plan de acción sanitario adecuado y orientado al control de este ácaro, considerado actualmente como uno de los más perjudiciales a nivel mundial.

1.2 Antecedentes

Actualmente se considera que el 71 % de los cultivos más importantes en el mundo son polinizados por abejas (ELIKA, 2012). A más del rol tan importante que desarrollan las distintas especies de abejas en la polinización de cultivos, la apicultura como sistema de producción, contribuye a la obtención de miel como producto principal, a más de propóleo, jalea real, cera, polen y apitoxina.

En Ecuador la mayor población de colmenas se encuentra en los andes ecuatorianos. En la antigüedad, predominaban en el país las abejas sin aguijón denominadas meliponas, las cuales eran cultivadas por los indígenas (Cabrera, 2012). Con la llegada de las abejas europeas se produjo un impacto muy grande en la supervivencia de las abejas nativas. Posteriormente se ha venido manejando en Ecuador, la abeja italiana (*Apis mellífera ligústica*), hasta que en la década de los años setenta, ingresó al país la abeja africana (*Apis mellífera adansonii*) (Cabrera, 2012).

La producción apícola enfrenta actualmente muchas dificultades principalmente por problemas sanitarios, los cuales afectan directamente a la producción de miel, debido a la reducción de la población de abejas en la colmena por la presencia especialmente de parásitos, tales como el ácaro causante de la varroosis (Caballero, 2009).

El ácaro afecta la rentabilidad de las explotaciones y la calidad de los productos de la colmena. Una colonia infestada llega a producir hasta 65 % menos miel en comparación con una colmena sana (Martinez, Alcalá, Leal, Vivas, & Martinez, 2011). El propósito fundamental de controlar a *Varroa* es lograr mantener al ácaro por debajo de los niveles peligrosos, es decir bajo el nivel de daño económico (Caballero, 2009). Actualmente las líneas de trabajo para el control de *Varroa* spp., son la resistencia natural de la abeja al parásito, el control químico con ácidos orgánicos y buenas técnicas de manejo en los sistemas de producción (Moreno, 2004).

1.3 Justificación

La apicultura contribuye principalmente a la producción de miel de abeja, la cual constituye uno de los alimentos más primitivos que el hombre aprovechó para nutrirse (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Reséndiz, & Rosas, 2010). Hoy en día, la miel es ampliamente consumida, debido a que es un edulcorante natural, posee varios minerales (hierro, potasio, calcio, zinc, fósforo, sodio), es una fuente de carbohidratos, se usa como antibiótico y se le atribuye propiedades terapéuticas (Ramos, 2012).

La apicultura en la actualidad presenta una serie de problemas sanitarios, dentro de ellos el principal es la varroosis, la cual es caracterizada como una parasitosis externa causada por el ácaro *Varroa* spp. (Martínez et al., 2011). Éste es considerado actualmente como el principal problema sanitario al que se enfrenta la apicultura a nivel mundial, ya que se ha observado la pérdida total de colonias después de dos a cuatro años de haber iniciado la infestación en caso de no recibir ningún tratamiento (Martínez, Medina, & Catzin, 2011).

Estos ácaros se alimentan de la hemolinfa de las abejas, se fijan a los esternitos de las adultas, perforan la cutícula y las debilitan afectando su comportamiento nervioso y provocando desorientación en el vuelo. Además pueden transmitir y crear las condiciones adecuadas para la aparición de otras enfermedades bacterianas, fúngicas o virales (SAGARPA, 2008).

Una abeja infestada vive la mitad del tiempo que una abeja sana debido a la reducción del contenido de proteína en la hemolinfa. La disminución llega a ser de 22 a 50 %, dependiendo si la abeja está infestada por uno o dos ácaros. Además cuando el grado de infestación en la cría es elevado, las abejas presentan deformaciones en alas, patas, tórax o abdomen (Martínez et al., 2011).

Esta plaga no solo puede producir una pérdida económica directa en los productos derivados de la apicultura, sino que también puede alcanzar una gravísima repercusión en la producción frutícola y de semillas de hortalizas, forrajeras y oleaginosas, como consecuencia de una baja en la masa

entomófila polinizante, en la cual la abeja es el insecto de mayor efectividad (Ibacache, 2006).

Por tales razones, determinar la especie de *Varroa* presente en apiarios de nuestro país, es el primer paso para diseñar un plan de acción sanitario que ayude a los apicultores a controlar los daños ocasionados por dicho ácaro. El empleo de técnicas de caracterización mediante el uso de morfometría geométrica, presenta ventajas frente a la caracterización molecular, principalmente por el tiempo empleado y el costo de inversión, los cuales se reducen significativamente.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar, mediante análisis morfométrico, la especie de *Varroa* presente en apiarios localizados en el Valle de los Chillos - Ecuador.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar los Puntos Anatómicos de Referencia (landmarks) adecuados para el análisis de muestras de *Varroa* spp., e interpretación de las variaciones de forma.
- Caracterizar morfométricamente a muestras de *Varroa* spp., recolectadas en apiarios del Valle de los Chillos (Ecuador), mediante el uso de morfometría geométrica.
- Elaborar una ficha técnica con las características morfológicas de la/las especies de *Varroa* que se encuentran parasitando a *Apis mellifera*, en los apiarios analizados.
- Recomendar un plan de acción sanitario para control de *Varroa* spp., para uso de los apicultores del Valle de los Chillos (Ecuador).

1.5 Hipótesis

Ho: Existe una especie de *Varroa* parasitando a *Apis mellifera*, en apiarios localizados en el Valle de los Chillos - Ecuador

Hi: Existe varias especies de *Varroa* parasitando a *Apis mellifera*, en apiarios localizados en el Valle de los Chillos - Ecuador

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 La importancia de la apicultura en la seguridad alimentaria

2.1.1 Reseña histórica de la apicultura

La apicultura es una de las actividades más antiguas de la humanidad. La historia menciona que los pueblos antiguos ya se dedicaban a la producción de miel, la cual es considerada hasta hoy en día, como uno de los alimentos más nutritivos que se conocen por su contenido de vitaminas, sales minerales y azúcares de fácil digestión (Caron, 2010).

Aunque la historia de la apicultura tiene sus raíces en los primeros asentamientos humanos, una vez que el hombre se volvió sedentario, existen evidencias arqueológicas de que la miel pudo utilizarse como alimento desde el periodo Mesolítico, 7000 años a.C (Nopala, 2006). También se sabe que la primera referencia escrita para la miel es una tablilla Sumeriana, fechada entre el año 2000 a.C, la cual describe el uso de la miel como droga y como un ungüento. Los antiguos egipcios, asirios, chinos y romanos también usaron la miel en combinación con otras hierbas para tratar heridas y enfermedades del intestino. En la Grecia antigua, Aristóteles afirmaba que la miel podría aplicarse como un ungüento para las heridas y el dolor de ojos. Se dice también que Dioscórides alrededor del año 50 d.C., recomendaba a la miel para el tratamiento de quemaduras del sol y manchas en la cara (Ulloa et al., 2010).

No todas las especies de abejas producen la misma cantidad y calidad de miel. A partir del siglo XVI comienza la apicultura moderna con la creación de colmenas elaboradas por el hombre, es ahí cuando se realizan importantes descubrimientos sobre el comportamiento y la vida de las abejas, procurando criar una especie con una buena producción. En el siglo XIX se diseña la colmena con paneles móviles, de tal forma que no hay que separarlos y es más cómoda la recolección. En el siglo XX se han introducido mejoras que han permitido tecnificar la crianza de las abejas,

obteniendo una mejor producción de miel y otros derivados de la apicultura (Calatayud, 2009).

La especie de abeja más reconocida a nivel mundial es *Apis mellifera* L. o abeja melífera, la cual fue introducida en América durante la colonización europea. Hoy en día, se han identificado más de 20.000 especies de abejas melíferas a nivel mundial, algunas de las cuales son utilizadas para la producción de miel, cera y resinas, entre otros productos, que al ser comercializados, se constituyen en una alternativa de ingresos adicionales para comunidades indígenas y campesinas (FAO, 2014).

La apicultura en el Ecuador, se inició con las primeras colmenas traídas por los Hermanos Cristianos desde Francia en el año de 1870, siendo Cuenca el principal centro de apicultura, desde dónde se propagaron a todo el país. En la antigüedad, predominaban en el país las abejas sin aguijón denominadas meliponas, las cuales eran cultivadas por los indígenas (Cabrera, 2012). Con la llegada de las abejas europeas se produjo un impacto muy grande en la supervivencia de las abejas nativas. Posteriormente se ha venido manejando en Ecuador, la abeja italiana (*Apis mellifera ligústica*), hasta que en la década de los años setenta, ingresa al país la abeja africana (*Apis mellifera adansonii*) (Cabrera, 2012).

2.1.2 Importancia de las abejas en la polinización

La FAO considera que de los 100 cultivos agrícolas más importantes en el mundo, los cuales generan el 90% del suministro de alimentos a nivel mundial, 71 de éstos, son polinizados por abejas (ELIKA, 2012).

Aunque la polinización puede ser llevada a cabo tanto por vectores bióticos (animales) como abióticos (agua o viento), la gran mayoría de plantas con flores, dependen de los primeros, principalmente de aquella realizada por insectos. Las abejas, son los insectos que por excelencia participan en esta labor, por esta razón poseen una gran importancia económica y ecológica en los agroecosistemas (FAO, 2014).

Durante el pecoreo, proceso mediante el cual la abeja sale al campo para llevar a cabo la recolección de los recursos alimentarios y materiales

necesarios para la colonia, la abeja visita y poliniza las flores. El aumento de la fertilización resultado de estas visitas, se traduce en la mayoría de casos, en un aumento en la producción y en una mejora en la calidad de los vegetales, frutas, granos y semillas que requieren o se benefician de la polinización por insectos (Nopala, 2006). Por ello hay que tener en cuenta que una gran parte de los alimentos que hoy en día se consumen y comercializan masivamente alrededor del mundo, dependen directa o indirectamente de la polinización realizada por abejas.

La polinización es un proceso esencial, tanto para los ecosistemas terrestres naturales como para los manejados por el hombre mediante sistemas de producción agrícola. En los últimos años, se evidencia que tanto la abundancia y diversidad de polinizadores silvestres, como la de las abejas domésticas, se encuentran seriamente amenazadas. Este descenso de las poblaciones de polinizadores, ha llevado a los investigadores a tratar de evaluar, del modo más fiable posible, las potenciales pérdidas económicas que esta baja de la masa entomófila polinizante podría suponer y a estimar el grado de dependencia de la agricultura mundial a dichos insectos (Rosado, 2007). Por todo lo mencionado, la polinización es vital para los ecosistemas y para las sociedades humanas.

La salud y el bienestar de los insectos polinizadores son cruciales para la vida, ya sea en el mantenimiento de los hábitats naturales o contribuir a las economías locales y globales. La contribución de los polinizadores para la producción de cultivos utilizados directamente para la alimentación humana se ha estimado en 153 mil millones de euros a nivel mundial, que es de aproximadamente 9,5 % del valor total de la producción de alimentos en todo el mundo (Ver Figura 1) (Kluser, Neumann, & Chauzart, 2010).

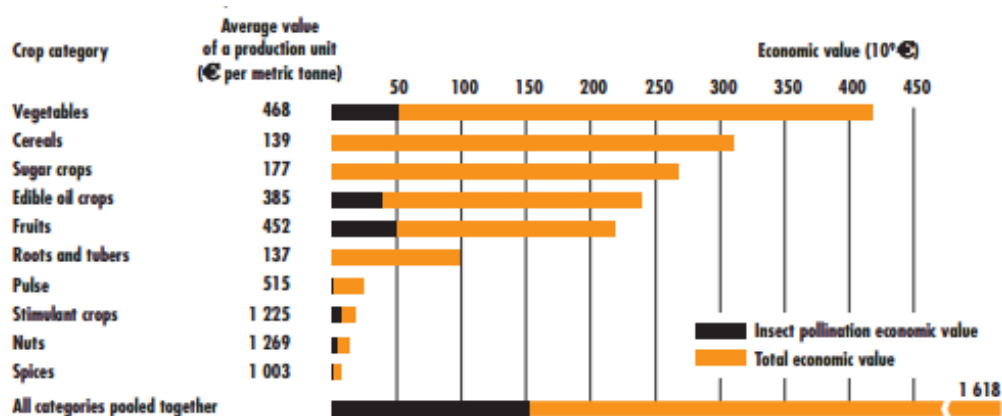


Figura 1 Impacto económico de la polinización de los insectos en la producción agrícola utilizada directamente para la alimentación humana en todo el mundo
Fuente: (Kluser et al., 2010)

2.2 Principales enemigos y enfermedades de las abejas

2.2.1 Enfermedades bacterianas

2.2.1.1 Loque Europea y Loque Americana

Loque Americana

La Loque americana es una enfermedad infecciosa que afecta a la larva (cría) de la abeja de miel *Apis mellífera* y de otras subespecies de *Apis* y está presente en todo el mundo. El microorganismo causante es *Paenibacillus larvae* (Weiss, 2008). La enfermedad provoca la muerte de las crías de abejas y su transformación en masas filantes y con mal olor, que luego se secan, formando costras firmemente adheridas a las paredes y el fondo de las celdas (Vaquero, Vargas, & Plata, 2010).

En las colmenas infectadas, la colonia presenta un aspecto irregular o salteado debido a las celdillas vacías y la cría tiene una apariencia viscosa o húmeda (SAGARPA, 2008). La infección puede transmitirse a las larvas a través de las abejas nodrizas o por las esporas que permanecen en la base de las celdas de las crías (Weiss, 2008).

Loque Europea

Es una enfermedad bacteriana que afecta a la cría y provoca su muerte antes de la operculación de la celda. El microorganismo causante de la loque europea en las abejas es la bacteria *Melissococcus plutonius* (Vaquero et al., 2010).

A pesar del nombre, se encuentra en Norteamérica, Sudamérica, Oriente Medio y Asia. Al igual que la loque americana, las bacterias de la loque europea matan las larvas dejando vacías las celdillas del panal. La enfermedad se transmite por contaminación mecánica de los panales y tiende, por tanto, a persistir año tras año. También puede ser transmitida por las abejas que sobreviven a una infección en la fase larval y diseminan las bacterias en las deyecciones (Weiss, 2008).

2.2.2 Enfermedades parasitarias

2.2.2.1 Ácaro de la tráquea

La acarapisosis, acariosis o enfermedad acarina es una enfermedad de la abeja adulta de la miel *Apis mellifera* L. y de otras especies de *Apis*. Es causada por *Acarapsis woodi*, conocido como ácaro traqueal. Es un parásito interno del sistema respiratorio, que vive y se reproduce sobre todo en la gran tráquea protorácica de la abeja. A veces se encuentra también en los sacos aéreos de la cabeza y en los torácicos y abdominales, se alimentan de la hemolinfa de su hospedador (Weiss, 2008).

Los efectos patológicos en las abejas infectadas dependen del número de parásitos en la tráquea y se deben tanto a los daños mecánicos como a las disfunciones fisiológicas derivadas de la obstrucción de los conductos aéreos, las lesiones en las paredes traqueales y el descenso de la hemolinfa. A medida que aumenta la población de parásitos, las paredes traqueales, que normalmente son blancas y traslúcidas, se vuelven opacas y descoloridas con manchas eruptivas negras, probablemente debidas a incrustaciones de melanina (SAGARPA, 2008).

2.3 La varroosis: una parasitosis de importancia en las abejas

2.3.1 Generalidades del agente causal

La varroosis, es una enfermedad causada por el ácaro externo *Varroa* spp., que afecta a las abejas obreras, reinas y zánganos dentro de la colmena (Martínez et al., 2011). El ácaro fue descubierto por Edward Jacobson en 1904 en la isla de Java, en colonias de *Apis cerana* y fue clasificado por A. C. Oudemans como *Varroa jacobsoni*. En 1912 H. Buttel Reepen describió los diferentes estadios del ácaro en ninfas de zánganos (Martínez et al., 2011).

En 1958 el ácaro fue detectado en Rusia y Japón, en 1960 en China y de 1967 a 1982 se distribuyó en Europa y norte de África. En 1971 Paraguay importó desde Japón abejas reinas infestadas con el parásito; este hecho dio lugar a la introducción y dispersión del ácaro por todo el continente americano (Moreno, 2004).

2.3.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Varroa* spp., es la siguiente: (Anderson & Trueman, 2000)

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Chelicerata

Clase: Arachnida

Subclase: Acárida

Orden: Mesostigmata

Familia: Varroidae

Género: *Varroa*

Especies:

- *V. jacobsoni* (Oudemans, 1904)
- *V. underwoodi* (Delfinado-Baker & Aggarwal, 1987)

- *V. rindereri* (De Guzmán & Delfinado-Baker, 1996)
- *V. destructor* (Anderson & Trueman, 2000)

2.3.3 Ciclo de vida

2.3.3.1 Fase forética

El ciclo biológico del ácaro en su etapa adulta se divide en dos fases: forética (del griego “fores”, cargar), y reproductiva. En la forética el ácaro parasita sobre el cuerpo de la abeja y en la reproductiva los ácaros se introducen al interior de las celdas con cría operculada (SAGARPA, 2008).

La fase forética se lleva a cabo en abejas adultas, consiste en la salida del ácaro hembra de la celda de cría con su hospedero sea zángano u obrera, siendo ésta la fase de propagación de la especie en nuevas colmenas (Flores, Padilla, & Pérez, 2007). *Varroa* principalmente se encuentra en las placas abdominales de su hospedero, adheridas en las membranas íter segmentales gracias a sus extremidades y partes bucales, donde se alimenta de la hemolinfa. Los ácaros pueden llegar a una población grande dentro de una colonia a pesar de que solo unos pocos son visibles en abejas adultas (Goodwin & Van Eaton, 2001).

2.3.3.2 Fase reproductiva

La hembra de *Varroa* solo se fecunda y reproduce al interior de la celdilla de cría operculada (Martín, 2006). El ingreso a celdillas de crías de obreras ocurre cuando éstas se encuentran en su quinto estadio larval, al igual que las crías de zánganos, momento en el cual los pesos larvales son mayores a 100 y 200 mg, respectivamente. Una vez que ha ocurrido el ingreso, el ácaro se encuentra entre la pared de la celdilla y el cuerpo de la larva, localizándose preferentemente en el fondo, inmerso en el alimento larval, lugar donde permanece inactivo. Esta inactividad cesa cuando la larva ha consumido completamente su alimento, momento en que el parásito comienza a succionar la hemolinfa de su hospedero (Flores et al., 2007)

La oviposición de la hembra fundadora comienza alrededor de 60 horas después de la operculación de la celdilla. Las hembras depositan 5 o 6 huevos en celdillas de obreras y hasta 7 en celdillas de zánganos. Los huevos son puestos en forma simple, a intervalos de aproximadamente 30 horas; son ovalados y de color blanco, miden cerca de 0.3 mm de largo por 0.2 mm de ancho. El primer huevo es generalmente macho, y los restantes son hembras. El desarrollo de los machos, desde huevo a adulto demora cerca de 5.5 a 6.2 días, en tanto las hembras demoran 6.5 a 6.9 días (Martín, 2006).

Los descendientes del ácaro se desarrollan en el interior de la celdilla hasta que la abeja alcanza su estado adulto y rompe el opérculo para salir al exterior. El macho llega a la madurez antes que la hembra, debido a esto, el macho debe esperar que la hembra alcance el estado adulto para realizar la cópula. Las hembras que no logran ser fecundadas sufren una atrofia de su órgano copulador que impide la posterior fecundación, por lo que pasan a ser hembras infértiles. En algunos casos, el macho muere antes de aparearse, por lo que las hembras de esa celdilla permanecerán infértiles (Goodwin & Van Eaton, 2001).

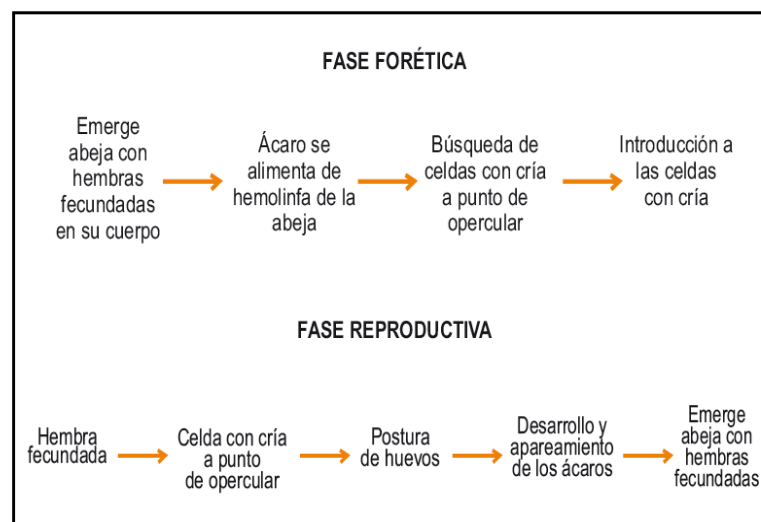


Figura 2 Ciclo biológico de *Varroa* spp., en su etapa adulta

Fuente: (SAGARPA, 2008)

2.3.4 Diseminación de la parasitosis

2.3.4.1 Entre apiarios y colmenas

La diseminación del parásito ocurre de las siguientes formas:

En un mismo apiario:

- A través de los zánganos que tienen entrada libre en la colmena
- Abejas que entran equivocadamente a otra colmena al regresar del campo (deriva)
- Mal manejo de las colmenas: intercambio de bastidores (marcos) con cría parasitada
- Pillaje

De un apiario a otro:

- Por zánganos provenientes de colmenas infestadas
- Por abejas extraviadas
- Pillaje
- Por introducción de reinas no certificadas y enjambres silvestres
- Movilización de apiarios infestados a zonas no contaminadas

Entre regiones:

- Por movilización incontrolada de abejas reinas
- Material biológico infestado
- Enjambres

(SAGARPA, 2008)

2.3.5 Daños producidos

2.3.5.1 Generalidades

Después de un año, los signos de presencia de varroosis son evidentes, al inicio de la infestación se observan abejas débiles que se arrastran en el suelo y algunas otras muertas alrededor de la colmena. Al revisar la colonia se observan obreras con malformaciones en alas y abdomen, principalmente. Debido a la acción irritante que causa el parásito, la abeja

tiene un comportamiento desordenado que da lugar a movimientos en el interior de la celda tratando de quitarse al ácaro. La lesión que produce en el exoesqueleto puede ser detonante para la aparición de enfermedades secundarias. En los panales se observan opérculos perforados y deformados como respuesta de las obreras a la detección del ácaro en la celdilla de la cría en desarrollo (SAGARPA, 2008).

Dentro de los daños que puede causar *Varroa* spp., en las abejas se toman en cuenta dos tipos, los daños directos causados sobre el hospedero, y los daños indirectos como resultado de diferentes enfermedades transmitidas por el ácaro.

2.3.5.2 Daños directos

- El consumo de hemolinfa de la abeja adulta por un ácaro es alrededor de 0,2 µl de hemolinfa durante su vida, provocando daños en el sistema nervioso y desorientándolas durante el vuelo. Las abejas afectadas presentan pérdida de su peso alrededor de un 7 y 25 % según el número de ácaros que las han parasitado, además el 30% del total de las abejas parasitadas presentan malformaciones, y su vida media presenta una disminución entre el 30 y 70 % según la cantidad de ácaros presentes (Bounous & Boga, 2005).
- Se presentan cambios en los componentes inmunológicos de la hemolinfa de las abejas que son alimento de *Varroa*, como la pérdida de proteínas de la hemolinfa. La razón es aún desconocida, aunque se menciona que puede ser debido a la reducción en la cantidad de hemolinfa o la reacción del sistema inmunológico de la abeja en el orificio hecho por el cual el ácaro se alimenta (Goodwin & Van Eaton, 2001).
- El desarrollo natural dentro de la colmena se ve afectado, las abejas infestadas se muestran particularmente inquietas, no realizara la construcción de panales en forma constante, además muestran falta de vitalidad y se presenta muerte prematura; lo que en conjunto ocasionan debilitamiento de la colonia con su posterior destrucción (Bounous & Boga, 2005).

Otros daños directos son:

- Disminución del peso corporal de los adultos
- Alas y abdomen deformes
- Glándulas hipofaríngeas más pequeñas
- Cambios en la fisiología de zánganos
- Cambios en la edad que comienzan a la búsqueda de alimento
- Deficiencia en el retorno a las colmenas tras vuelos de orientación
- Reducción de la vida útil de las obreras
- Reducción de la vida útil de los zánganos
- Secreción de cera reducida
- Reducción de la tolerancia a los pesticidas

(Goodwin & Van Eaton, 2001)

2.3.5.3 Daños indirectos

Corresponden a patologías provocadas por infecciones secundarias, relacionadas a la inoculación o puerta de entrada de microorganismos patógenos causados por el ácaro *Varroa*.

- Dentro de los microorganismos patógenos se encuentra *Hafnia alvei*, causante de la septicemia (Bounous & Boga, 2005).
- El uso continuo de acaricidas destruyen también los ácaros benéficos, los cuales se encargan de consumir los hongos y al disminuir la población de estos ácaros se crean en la colmena condiciones que favorecen el desarrollo del hongo *Ascophaera apis*, responsable de la “cría yesificada” (Bounous & Boga, 2005).
- Introducción de virus, como es el caso del virus de la parálisis aguda (APV). Normalmente no se cree que causen síntomas de enfermedad en las abejas, pero se ha sugerido que el virus tiene la capacidad de aumentar al entrar a su hemolinfa como parte del proceso de alimentación de la *Varroa*. Las abejas con altos niveles de APV pueden transmitir el virus a otras abejas adultas y larvas a través del intercambio de alimentos. Este virus parece matar a las abejas

adultas en colonias infestadas de *Varroa* (Goodwin & Van Eaton, 2001).

2.3.6 Morfología de *Varroa* spp.

2.3.6.1 Diferencias entre especies

Para la diferenciación de especies de *Varroa* se toman en cuenta aspectos en cuanto a su morfología, como el tamaño del cuerpo (largo y ancho), estructura y quetotaxia de los escudos o placa esternal, genital, anal y metapodal. Además del número, disposición y morfología de los pelos presentes en patas y palpos; como características más relevantes. Las especies *Varroa destructor* y *Varroa jacobsoni* son morfológicamente similares, excepto en el tamaño y la forma del cuerpo, *V. jacobsoni* es mucho más pequeño y más de forma circular en comparación con *V. destructor* (Ver Figura 3).

Además investigaciones en Asia, ha sugerido una clave en cuanto a la relación en el tamaño del cuerpo, (ancho – largo), indicando que *V. jacobsoni* mantiene una relación 1.2–1.3:1, mientras que *V. destructor* debe ser ≥ 1.4 (Dietemann et al., 2015).

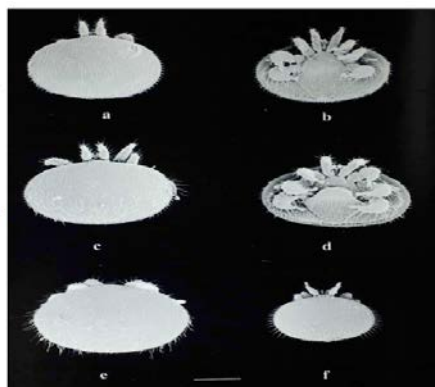


Figura 3 Especies de *Varroa*: a. *V. jacobsoni* vista dorsal; b. *V. jacobsoni* vista ventral; c. *V. destructor* vista dorsal; d. *V. destructor* vista ventral; e. *V. rindereri*; f. *V. underwoodi*

Fuente: (Dietemann et al., 2015)

2.3.6.2 Características morfológicas

2.3.6.2.1 En estados de desarrollo

Los diferentes estadios de desarrollo de *Varroa* spp., son huevo - larva, protoninfa, deutoninfa y adulto. El huevo mide 0.5 mm de diámetro aproximadamente, tiene forma esférica y es de color blanquecino. La protoninfa, también de forma esférica o redonda, de color blanquecino, mide 0.7 mm. La deutoninfa hembra tiene forma similar al adulto, es de color blanquecino - pardo y mide 1 mm aproximadamente (SAGARPA, 2008).

El tiempo de desarrollo aproximado por cada estadio se indica por encima de las líneas horizontales de diferentes espesores que delimitan las etapas. Las líneas continuas denotan fases móviles y líneas de trazos fases inmóviles antes de la muda (Ver Figura 4) (Dietemann et al., 2015).

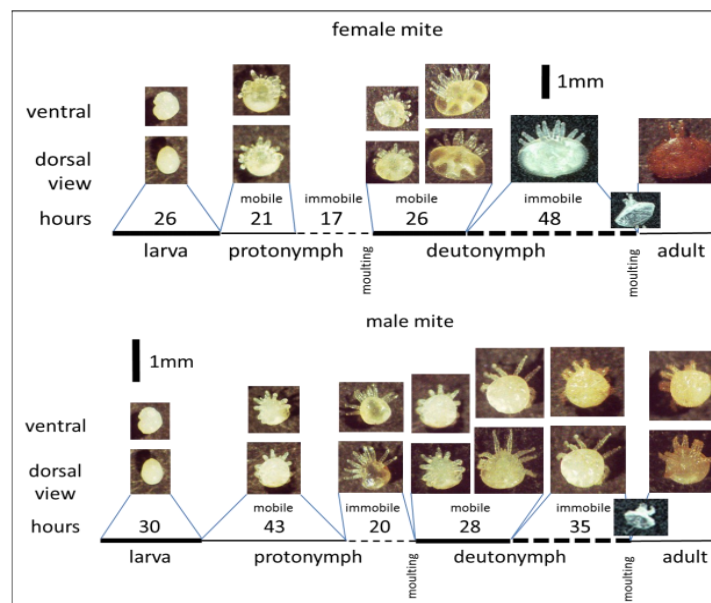


Figura 4 Vistas ventral y dorsal de las etapas de desarrollo de hembras de *Varroa destructor* (arriba) y machos (abajo) en la cría *Apis mellifera*

Fuente: (Dietemann et al., 2015)



Figura 5 Estadios de desarrollo de *Varroa destructor*

Fuente: (Rosenkranz *et.al.*, 2010)

2.3.6.2.2 En machos y hembras

Macho adulto

Varroa spp., presenta un claro dimorfismo sexual, observándose solamente a las hembras sobre las abejas adultas (Bolois, 2012). El macho es translúcido, periforme y mide 0.7 mm de largo aproximadamente (SAGARPA, 2008). Es muy poco esclerotizado, con excepción de sus patas que resultan más oscuras. Se localiza solamente en el interior de las celdas de cría, no se alimenta y vive unos pocos días.

Sus quelíceros no tienen forma de cuchillo como en las hembras, sino que son en forma de tubo y están adaptados para transferir los espermatozoides dentro de las hembras (Moreno, 2004). Debido a esta modificación, el macho no es capaz de alimentarse y por tanto muere dentro de la celdilla, lugar donde se lleva a cabo la reproducción y fecundación de la hembra (Martín, 2006).



Figura 6 Macho de *Varroa destructor*

Fuente: (Bolois, 2012)

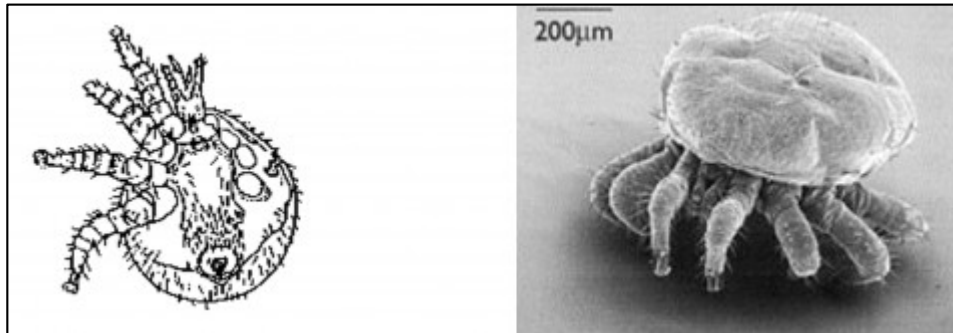


Figura 7 Vista ventral (izquierda) y dorsal (derecha) de macho de *Varroa destructor*

Fuente: (Dietemann et al., 2015)

Hembra adulta

El cuerpo de la hembra de *Varroa* adulta está plenamente adaptado para ser un ectoparásito y para la foresis (desplazamiento de una colmena a otra transportados por las abejas), ya que su cuerpo tiene una forma elipsoidal, es deprimido dorsoventralmente y sus patas terminan en una ventosa (Portales, 2003).

Son más grandes que los machos y de coloración marrón-rojizo. Los juveniles tienen una coloración menos acentuada. Su cuerpo es más ancho que largo (Moreno, 2004). La hembra mide 1.1 mm de largo por 1.6 mm de ancho aproximadamente (SAGARPA, 2008). La superficie dorsal está muy bien esclerotizada y densamente cubierta de pelos de longitud uniforme. Los márgenes laterales presentan pelos de mayor tamaño y en forma de espinas. Los quelíceros tienen forma de cuchillo y conforman una estructura particularmente adaptada para lacerar la cutícula de las abejas. Las patas terminan en ambulacros bien desarrollados, membranosos, con fuertes escleritos basales y sin uñas, perfectamente adaptados para adherirse a las abejas (Moreno, 2004).



Figura 8 Vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de hembra de *Varroa destructor*

Fuente: (Bolois, 2012)

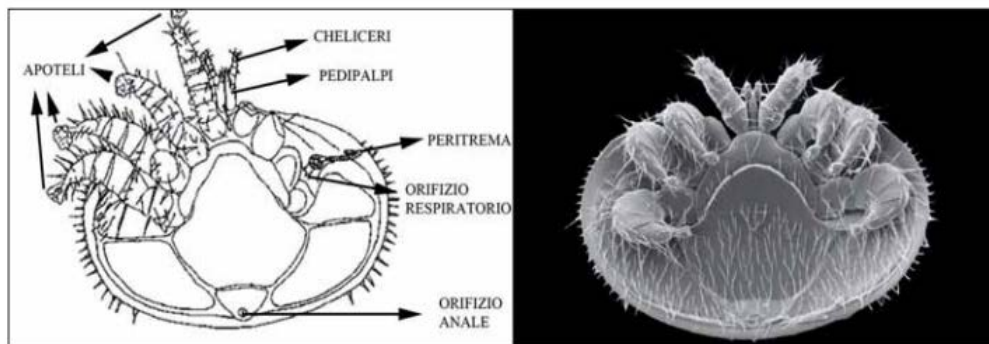


Figura 9 Vista ventral de *Varroa destructor* (hembra)

Fuente: (Giacomelli et al., 2013)

El sistema musculo esquelético de la hembra se compone de cuatro pares de patas, se encuentran en posición antero-lateral y cubiertas de pelos. El primer par está inclinando hacia adelante y dotado de órganos de los sentidos; los otros tres pares de patas se utilizan para la locomoción. Las patas se articulan en coxas y terminan con una pequeña ventosa transparente llamada apotele, estas características permiten a la hembra moverse muy rápidamente dentro de la colmena. La respiración del parásito es a través de un sistema interno de tráqueas que convergen hacia un orificio respiratorio colocado entre el segundo y el tercer par de patas. El orificio está escondido en una depresión de las placas ventrales de quitina, adornado con pequeñas cerdas (Giacomelli, Pietropaoli, Pizzariello, Capomolla, & Formato, 2013).

2.3.7 Epidemiología de la varroosis

2.3.7.1 A nivel mundial

El ácaro *Varroa* spp., fue reportado por primera vez en el año de 1904 por Edward Jacobson, quién encontró dichos parásitos en colonias de *Apis cerana* en la isla de Java. Posteriormente Oudemans presentó una descripción más detallada y los clasificó como *Varroa jacobsoni* (Usabiaga, Gallardo, & Cajero, 2002).

En el año de 1952, *Varroa* se encontró parasitando abejas europeas. El ácaro unos años más tarde se propagó y registró en Japón, China y Pakistán. Su dispersión fue acelerada principalmente por la movilización de colmenas pobladas, material biológico apícola y migración natural de enjambres. En los años sesenta apareció al este de Europa, después se propago hasta el oeste de Europa e incluso América del Sur en los años setenta y posteriormente a finales de los años ochenta el ácaro infestó los Estados Unidos (Ellis & Nalen, 2013).

Según la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE), en el año 2014 se registra la distribución mundial de *Varroa*, presentándose en todos los continentes como se observa en la Figura 10 (Cherrez, 2015).

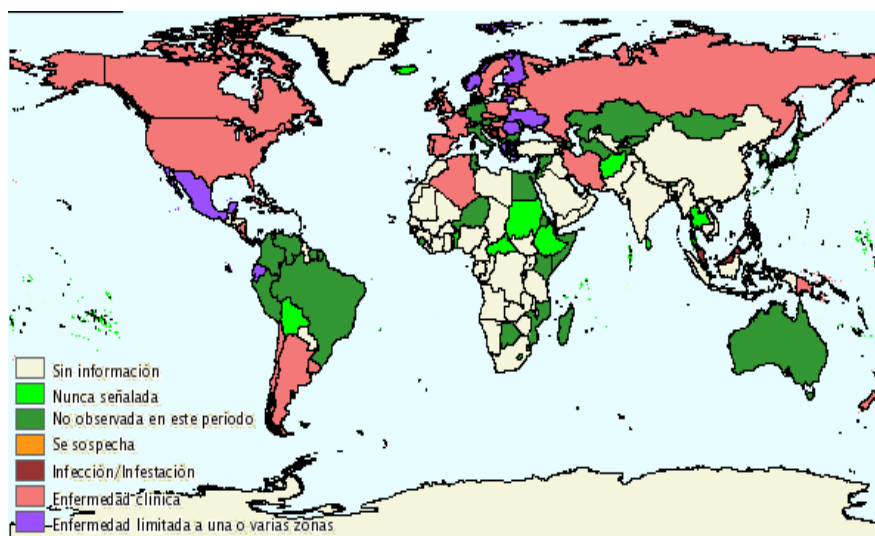


Figura 10 Distribución mundial de Varroosis

Fuente: (OIE, 2014)

Se puede observar que existe distribución de *Varroa* a lo largo de todo el mundo, aunque en algunos países como se detalla en la Figura 10, no existe mucha información o la consideran como enfermedad nunca señalada, a pesar de estar limitados por países los cuales están catalogados con la enfermedad en fase clínica o poseen infección e infestación (Cherrez, 2015).

2.3.7.2 A nivel de América Latina

En el año de 1971, Paraguay importó abejas procedentes de Japón, las cuales estaban infestadas por el ácaro, de esta manera se introdujo el parásito en América Latina. A partir de ello, *Varroa* comenzó a distribuirse a toda América Latina, primeramente a través de Brasil. Otro motivo de la diseminación de la enfermedad fue la transhumancia y la presencia de enjambre silvestres contaminados (Salvachua, 1989).

El ácaro en Venezuela se encontró por primera vez en el año 1991 en colmenas ubicadas en el estado Barinas (Salamanca Grosso, Osorio Tangarife, & Rodríguez Arias, 2012).

En Argentina se detectó al ácaro por primera vez en 1976 en colmenas de Laguna Blanca en la provincia de Formosa, aunque se cree que el ácaro había ingresado al país unos años antes (Crespo, Crespo, Viader, & López, 2010). Por otro lado, en Chile, la varroosis se diagnosticó por primera vez en el año 1992. En ese mismo año dada a la gravedad de la infestación y el impacto en la agricultura, el Ministerio de Agricultura declaró a la varroosis como enfermedad infecto-contagiosa en todo el país, con carácter de emergencia sanitaria (Cruzat & Baasch, 2009).

En el año 1996 se detectó la presencia de *Varroa* en la zona occidental de El Salvador, ubicado cerca de la frontera con Guatemala (Gómez & Rodríguez, 2011).

Según la OIE, como se muestra en la Figura 11, existe la presencia de la enfermedad en Ecuador, Argentina, Uruguay y Chile. Se reporta como enfermedad ausente en Brasil, Perú, Colombia, Venezuela y como nunca

señalada en Bolivia. Finalmente se muestra que en Paraguay no existe información al respecto (OIE, 2016).

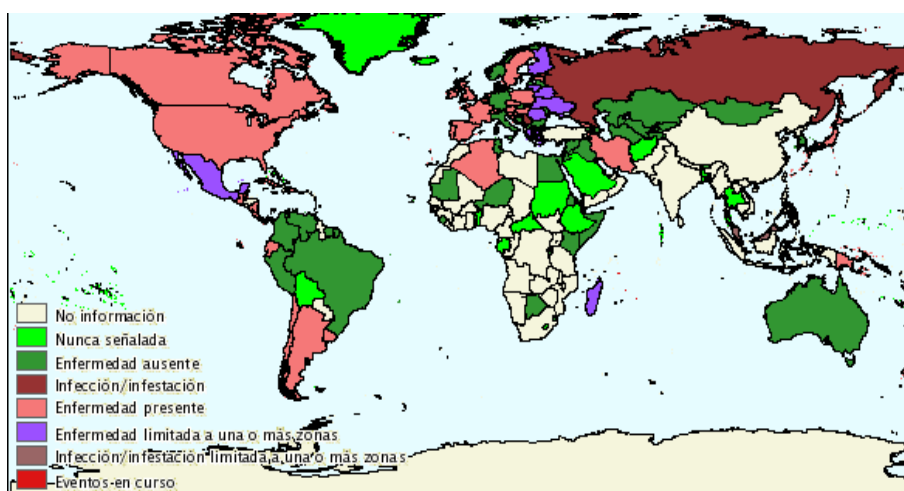


Figura 11 Distribución en América Latina de Varroosis

Fuente: (OIE, 2016)

2.3.7.3 A nivel de Ecuador

2.3.7.3.1 Estudios de prevalencia y reportes de especies existentes

El primer registro de *Varroa* en el Ecuador fue la investigación en la cual se determinó la presencia de *Varroa jacobsoni*, parasitando a *Apis Mellifera* en apiarios de las provincias El Oro y Loja (Onore, 1990).

El 26 de Abril del año 2013, el Dr. Diego Alfonso Vizcaíno Cabezas, Ingeniero Agrónomo, del Ministro de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca de Ecuador, informó a la OIE un foco de varroosis de abejas melíferas, localizado en la provincia de Chimborazo en el cantón Chambo como se muestra en la Figura 12. En el reporte se indica que se encontraron afectadas 12 de 40 colmenas en el apiario, siendo la fuente de infección desconocida o no concluyente. El diagnóstico fue llevado a cabo por análisis entomológico, en el laboratorio de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) y se detalla el foco de infección como resuelto en julio del 2013.

Dentro de los detalles como resultado de la vigilancia epidemiológica no se han detectado nuevos focos en la zona. Después de aplicar un tratamiento a las colmenas se indica que se logró controlar la infestación. Además se determinó que el ingreso del parásito se produjo a través de la introducción de colmenas migratorias en el predio (captura de enjambres). Se mantuvo el período de cuarentena establecido y se respetaron los tiempos de retiro del antiparasitario externo (Cherrez, 2015).



Figura 12 Mapa de localización de los focos Chimborazo-Chambo
Fuente: (OIE, 2013)

El 22 de Julio del año 2013, se informó a la OIE otro foco de varroosis, localizado en la provincia de Pichincha en la Parroquia de Nayón (Ver Figura 13), el cual afectó a 20 de 20 colmenas en el apiario, teniendo una tasa de morbilidad aparente de 100%. La fuente de infección fue desconocida y se tomaron medidas de control como sacrificio sanitario parcial y aplicación de antiparasitario externo. Dentro del total de colmenas en el apiario una colmena murió y dos fueron destruidas. El diagnóstico fue llevado a cabo por análisis entomológico, en el laboratorio de AGROCALIDAD; se detalla el foco de infección como resuelto en Agosto del 2013 (Cherrez, 2015).

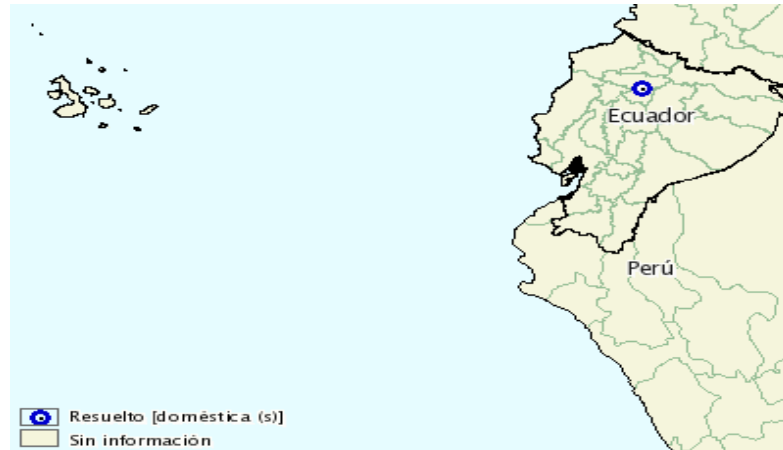


Figura 13 Mapa de localización de los focos Pichincha-Nayón
Fuente: (OIE, 2013)

2.3.8 Caracterización de *Varroa* spp.

2.3.8.1 Caracterización morfológica

2.3.8.1.1 Fundamentos, ventajas y desventajas

En sus comienzos, la morfología se centró en la descripción de las estructuras observadas por los investigadores y las comparaciones entre grupos o poblaciones estaban basadas en el análisis de las diferencias de sus dimensiones lineales entre dos putos anatómicos (Toro, Manriquez, & Suazo, 2010).

La morfometría, como se menciona, en sus orígenes usaba variables lineales como medidas, distancias, ángulos o proporciones; a partir de estas medidas, se obtenía un conjunto de datos que se analizaban por métodos estadísticos multivariados. Los resultados se expresaban como un conjunto de coeficientes y gráficas a través de los cuales las variaciones de tamaño y forma eran difíciles de interpretar, a este enfoque se le llama actualmente morfometría tradicional (López, 2015).

La morfometría ha sido ampliamente usada para la caracterización y clasificación de especies, la cual involucra la medición de distintas estructuras relevantes, que permiten diferenciar una especie de otra. Estudios sugieren que resultados provenientes de caracterización molecular

presentan diferencia frente a datos morfológicos y esto ha generado controversia, pero es importante recalcar que las diferencias morfológicas de las especies, son resultantes de diferencias en genes y que en muchos casos pequeñas diferencias en ciertos genes, podrían producir enormes cambios morfológicos (Terán, 2006).

La morfometría se ha beneficiado grandemente del desarrollo de las computadoras y la tecnología. Ahora es posible automatizar el proceso de toma de mediciones, la manipulación computarizada de grandes matrices de datos y los análisis con un despliegue de gráficas muy elaboradas. Además la ventaja de usar caracterización morfológica frente a la molecular, radica principalmente en el tiempo empleado y el costo requerido, el cual es mucho menor (Jaramillo & Dujardin, 2012).

2.4 La morfometría geométrica, como herramienta de clasificación taxonómica

2.4.1 Aspectos históricos

Inicialmente, las descripciones de la forma de un organismo completo o de alguna de sus partes se hacían cualitativamente, es decir, se comparaban con alguna forma fácilmente reconocible, usando términos como en forma de círculo, forma alargada, fusiforme, entre otros (López, 2015). A pesar de que los naturalistas del mundo antiguo y renacentista se interesaron tempranamente por la variación morfológica de los organismos, el pensamiento Biométrico se sustenta principalmente en los avances introducidos a partir del siglo XIX por Adolphe Quetelet, Francis Galton, Karl Pearson y sir Ronald Fisher (Van der Molen, Martinez, & González, 2007).

A inicios del siglo XX ocurrió una transición en la biología, cambiando de estudios descriptivos a una ciencia más cuantitativa, lo que resultó en el desarrollo de la morfometría, que es “el estudio cuantitativo de la variación de las formas biológicas” (López, 2015).

A partir de la década de 1930, Pearson y Fisher desarrollaron métodos de análisis, y luego especialistas en biometría, con el objetivo de describir patrones de variación morfológicos intra e intergrupales, comenzaron a

utilizar los análisis estadísticos multivariados realizando análisis de componentes principales, de variables canónicas, función discriminante, entre otros (Toro et al., 2010).

Debido a las dificultades y limitaciones de la morfometría tradicional, a finales del siglo XX surgió la morfometría geométrica, que ha sido descrita como “una fusión empírica de la geometría con la biología”, ya que analiza la forma de los organismos o de alguna de sus estructuras, considerando el espacio geométrico y empleando métodos estadísticos multivariados (Jaramillo, 2011).

2.4.2 Principios del análisis morfométrico

2.4.2.1 Fundamentos

La Morfometría Geométrica (MG) definida como la fusión entre la geometría y la biología, comprende el estudio de la forma en un espacio bi o tridimensional permitiendo investigar en profundidad los cambios morfológicos (Van der Molen et al., 2007).

La Morfometría Geométrica, actualmente se ha convertido en una herramienta fundamental para el estudio de estructuras fenotípicas. La diferencia con la morfometría tradicional, radica en un cambio rotundo en la aproximación al tamaño y la forma de las estructuras bajo estudio. En lugar de enfocarse en el análisis multivariante de un conjunto de medidas lineales entre puntos morfométricos, la morfometría geométrica, propone estudiar los cambios en el tamaño y la forma a partir del desplazamiento en el plano (2D) o en el espacio (3D) de un conjunto de puntos morfométricos o “landmarks” (Van der Molen & González, 2010).

Aunque el concepto de forma señala que esta propiedad geométrica no varía por efecto del tamaño, en morfometría geométrica, no ha sido posible analizar separadamente la “forma” del “tamaño”, debido a que son características biológicas que están íntimamente ligadas, es decir, organismos de diferentes tamaños tendrán diferentes formas aunque sean

de la misma especie, lo que se debe al desarrollo y crecimiento natural u ontogenético de los organismos vivos (López, 2015).

2.4.2.2 Tamaño y forma

La morfometría, por definición, comprende el estudio cuantitativo de la forma. En los estudios de MG, la forma de un objeto (Ver Figura 14) se descompone en tamaño y en forma (conformación) propiamente dicha (en inglés, “form” es igual a “size + shape”, y forma es simplemente “shape”) (Van der Molen et al., 2007).

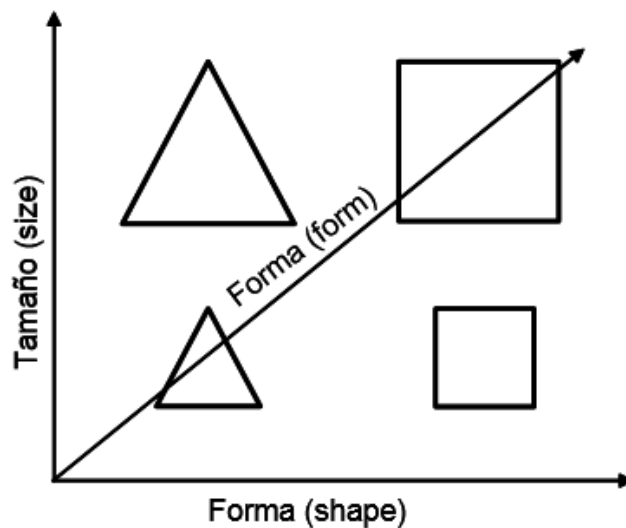


Figura 14 Cambios en la forma “form” como resultado de cambios de tamaño “size” y de forma “shape”

Fuente: (Van der Molen et al., 2007)

2.4.2.2.1 Forma

En la morfometría geométrica, la forma se puede definir como, toda la información geométrica que permanece cuando la ubicación, escala y los efectos de rotación se eliminan de un objeto determinado. En otras palabras la forma se define técnicamente como todas las características geométricas de un objeto a excepción de su tamaño, posición y orientación (Jaramillo & Dujardin, 2012).

2.4.2.2.2 Tamaño

En un objeto, el tamaño es matemáticamente independiente de la forma, aunque, el tamaño puede correlacionarse con la forma porque los organismos más grandes tienen configuraciones generalmente distintas a comparación de los organismos pequeños. El hecho de medir “forma” y “tamaño” separadamente, no significa que se pierda alguna información sobre las relaciones entre ellas. Uno de los puntos clave para conocer el tamaño es determinar la ubicación del centro de la forma, es decir, “el centroide”, “tamaño centroide” o “centro de gravedad” (Jaramillo & Dujardin, 2012).

Tamaño centroide

En el análisis basado en coordenadas cartesianas de landmarks, el tamaño se define a partir del tamaño del centroide (TC). El tamaño del centroide, “centroid size” en inglés, es una medida de tamaño que cuantifica la extensión de los landmarks entorno a su centro de gravedad (Torcida & Perez, 2012).

El TC es igual a, la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado, desde un conjunto de landmarks al centroide que ellos definen (Ver Figura 15) (Van der Molen et al., 2007).

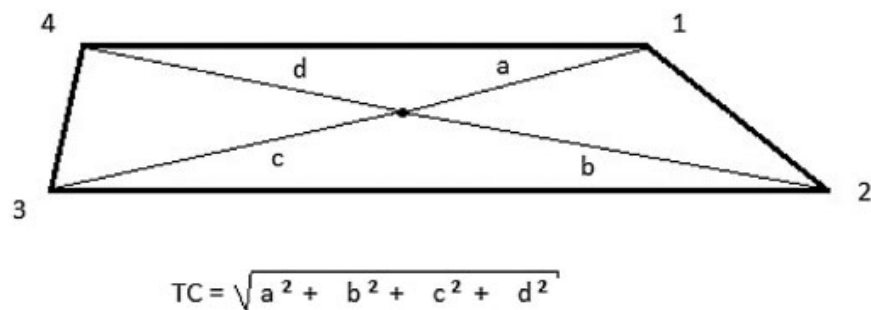


Figura 15 Método para estimar el tamaño centroide

Fuente: Toro et al., (2010)

2.4.2.3 Tipos de landmark o puntos anatómicos de referencia

Los datos utilizados para un análisis utilizando morfometría geométrica, corresponden a un conjunto de hitos representativos de una forma determinada. Un hito, "landmark" o punto anatómico de referencia (PAR), corresponde a un punto del espacio que tiene un nombre y posee coordenadas cartesianas en formas bidimensionales (x, y), y tridimensionales (x, y, z), que son las que describen su posición en el espacio (Toro et al., 2010).

Los PAR se pueden localizar sobre todo el cuerpo de un insecto, como las cabezas, alas, patas, palpos, antenas y abdomen, ésta última estructura es la menos recomendada debido a los grandes cambios de forma causados por la alimentación (Jaramillo, 2011).

Existen landmark Tipo 1, los cuales corresponden a puntos anatómicos de referencia localizados en la intersección de tres estructuras, centros de estructuras muy pequeñas e intersecciones de curvas. Este tipo de hito permite observar de manera más precisa, el efecto de procesos biológicos como el crecimiento, ya que el hito va a cambiar su posición de acuerdo a lo que esté sucediendo en cualquier parte alrededor de él, debido a que siempre va a estar rodeado de tejidos.

Los landmark Tipo 2, corresponden a puntos anatómicos de referencia ubicados en curvaturas máximas, donde existe aplicación de fuerzas biomecánicas como las cúspides de los molares o la parte más prominente de una tuberosidad donde se inserta algún músculo (Toro et al., 2010).

Los landmark Tipo 3 son puntos con al menos una coordenada ambigua; por ejemplo, los extremos de un diámetro máximo o el punto inferior de una concavidad (Torcida & Perez, 2012).

2.4.2.4 Métodos de Superposición

2.4.2.4.1 Análisis Generalizado de Procrustes

La variación morfológica puede ser estudiada mediante morfometría geométrica utilizando los siguientes métodos: 1) superposición, 2) deformación, 3) métodos basados en distancias lineales y 4) análisis de contornos (Liria, 2016).

El Análisis Generalizado de Procrustes (AGP) o llamado también método de superposición o superposición de procrustes, elimina toda la variación en las configuraciones de puntos anatómicos que no impliquen a la forma y se definen como la transformación de dos o más figuras con el fin de que adquieran algún tipo de relación geométrica con otra figura. Esta técnica se basan en colocar una configuración de puntos anatómicos directamente sobre otra, haciendo que sus puntos anatómicos homólogos coincidan lo máximo posible de manera tal que pueda obtenerse una mínima medida de distancia entre ambas configuraciones (criterio de optimización) (Liria, 2016).

El método AGP consiste, de manera general, en tres pasos: 1) las configuraciones de los landmarks son escaladas a un mismo tamaño para remover el efecto de este factor, 2) se elimina el efecto de la posición, al trasladar las configuraciones de los landmarks a un mismo origen del sistema de coordenadas y 3) las configuraciones de los landmarks se rotan para minimizar las desviaciones entre los ellos (López, 2015).

El nombre de Procrustes proviene de la mitología griega: Procrusto ofrecía alojamiento a los viajeros solitarios quienes se convertían en sus víctimas, ya que los ataba a las cuatro esquinas de la cama y si la víctima era más grande que el tamaño de su cama les cortaba las partes que sobresalían de ésta, mientras que si la persona era más chica que el tamaño de la cama los estiraba hasta ajustarse al tamaño de ésta (Van der Molen & González, 2010).

Como se mencionó previamente, la superposición de procrustes se basa en tres pasos para remover toda la información no relacionada a la forma. La

variación en el tamaño se elimina al ajustar cada configuración de landmarks de modo que tenga un tamaño de centroide igual a 1. La variación en la posición es removida mediante el desplazamiento de las configuraciones de manera que compartan la misma posición de su centro de gravedad (López, 2015).

Rotación

Por rotación se entiende a los cambios en la orientación caracterizada como movimiento alrededor de un eje. Luego de la rotación, la localización relativa de los puntos que representan el objeto permanecen iguales, pero las coordenadas de estos landmarks cambian (Van der Molen et al., 2007).

Traslación

La traslación representa el desplazamiento en cualquier dirección, mientras que la rotación alrededor de los ejes de coordenadas permanece constante. Al igual que con la rotación, las posiciones relativas de los puntos de una forma determinada se mantienen cuando una forma es trasladada, pero las coordenadas exactas de los landmarks varían. En términos prácticos la eliminación de los efectos de traslación se logra desplazando los centroides de todos los objetos al origen del sistema de coordenadas, los nuevos landmark se denominan “centrados” (Van der Molen et al., 2007).

Escalamiento

Las diferencias de escala se eliminan escalando los landmarks centrados (esto es, luego de eliminar la traslación) a un tamaño centroide igual a 1. En este caso, el TC, y en consecuencia la información referente al tamaño, es descartada así del análisis, aunque el TC puede ser estudiado independientemente (Van der Molen et al., 2007).

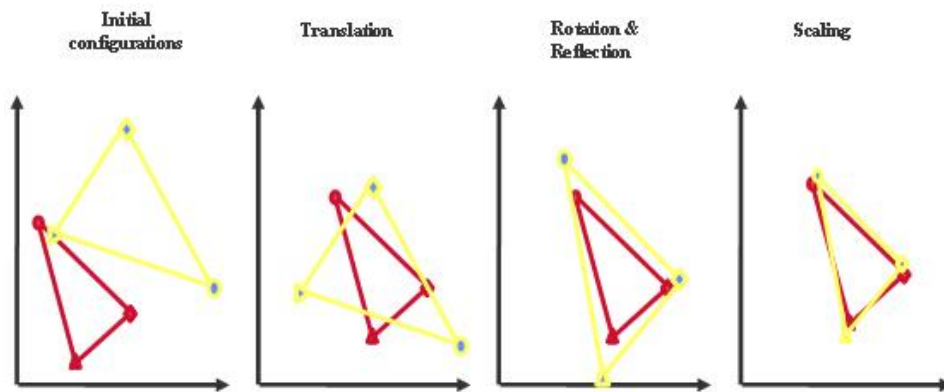


Figura 16 Análisis Generalizado de Procrustes: Traslación, Rotación y Escalamiento

Fuente: (Van der Molen et al., 2010)

2.4.2.5 Métodos de Deformación

En los métodos de deformación, se modifica el área o volumen de la forma de referencia hasta que se corresponde con la “forma target”. El primer trabajo sobre el uso de esta técnica es el de Sir D’Arcy Thompson en 1917, el cual para demostrar las diferencias entre formas, creó las Transformaciones Cartesianas, donde una rejilla bidimensional se superpone a la forma consenso de referencia y se deforma hasta que coincide con la segunda forma (target) (Van der Molen et al., 2007).

La técnica de deformación más utilizada para estudiar las diferencias en la forma es el Thin-plate spline (TPS, delgada lámina deformada) propuesta por Bookstein en 1989, así, la diferencia entre objetos puede ser descrita en términos de diferencias en las deformaciones de rejillas que representan a los objetos (Liria, 2016).

El TPS resuelve el problema de integrar la información acerca de las posiciones relativas de todos los landmarks y el clásico problema planteado por D’Arcy Thompson de expresar las diferencias de forma entre dos especímenes como el cambio del espacio cartesiano de un espécimen cuando se lo superpone con otro (Van der Molen & González, 2010).

2.4.2.5.1 Cambio Uniforme y No-uniforme

Con el fin de describir las diferencias morfológicas entre las muestras, Bookstein (1991) propuso descomponer la deformación en dos componentes: la componente uniforme (affine transformation) y la componente no-uniforme (non-affine transformation) (Van der Molen et al., 2007).

El componente uniforme puede ser descrito como las diferencias en la forma (shape), una vez que las formas han sido trasladadas, rotadas y escaladas para obtener la forma consenso, de manera tal que cada conjunto de líneas paralelas de la forma permanezcan paralelas luego de la transformación. En otras palabras, la componente uniforme engloba todas aquellas transformaciones que afectan en igual medida a todos los puntos de la forma bajo estudio y describe en qué medida un espécimen se “estira” en una dirección con respecto a otra (López, 2015).

El componente no-uniforme del cambio en la forma representa todos los demás movimientos de los landmarks, es decir, las variaciones locales, no lineales, que señalan los cambios que se producen en landmarks puntuales (López, 2015).

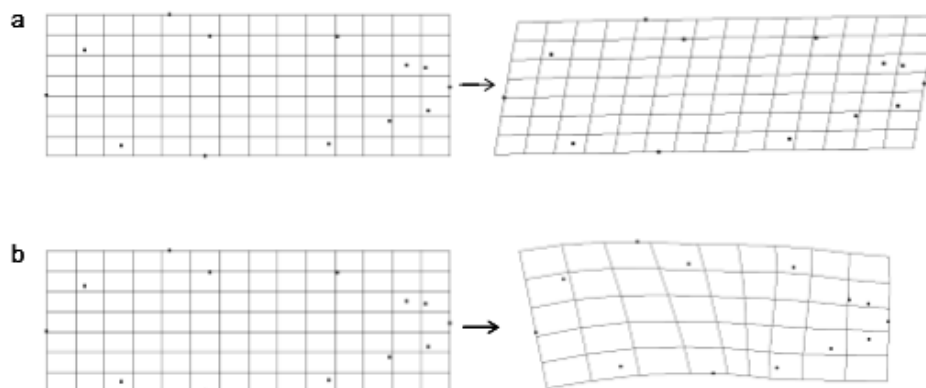


Figura 17 Rejillas de deformación representando el cambio uniforme (a) y no uniforme (b)

Fuente: (Van der Molen et al, 2007)

2.4.2.6 Tipos de análisis en morfometría geométrica

2.4.2.6.1 Análisis de Componentes Principales (PCA)

Una vez que las configuraciones han sido superpuestas por alguno de los métodos tradicionales, las diferencias de conformación pueden describirse por medio de los cambios entre objetos en las coordenadas de los puntos anatómicos correspondientes o bien a partir de análisis multivariante, debido a esto pueden realizarse algunos métodos estadísticos para analizar las diferencias de conformación a partir de datos superpuestos (Liria, 2016).

El Análisis de Componentes Principales (PCA, en inglés) permite explorar los principales ejes de variación morfológica en el espacio tangente, observar las tendencias de variación entre y dentro de las muestras y reducir la dimensionalidad de los datos. El PCA proyecta y representa las unidades de estudio como puntos en un espacio bi o tridimensional, donde la mayor similitud entre las unidades se expresa por una mayor proximidad entre las mismas (López, 2015).

Asimismo, a partir los valores (*scores*) del PCA puede realizarse un Análisis de Varianza (ANOVA) con el fin de determinar la significación de los efectos de los factores estudiados (población, sexo, sitio de muestreo) a lo largo de cada componente (Toro et al., 2010).

A partir de los valores (*scores*) del PCA también pueden llevarse a cabo pruebas de análisis discriminante, como análisis de variables canónicas (CVA) o D2 de Mahalanobis, concebidas para maximizar la separación entre grupos (Van der Molen & González, 2010).

2.4.2.6.2 Análisis de Variables Canónicas (CVA)

El Análisis de Variables Canónicas (CVA) es uno de los análisis multivariados que encuentra transformaciones lineales de los datos para maximizar la separación entre los grupos, que pueden ser por ejemplo, diferentes especies, grupos de edad, sexo o cualquier otra categoría establecida a priori (López, 2015). El CVA se usa para determinar la existencia de uno o más grupos, ya que los ejes canónicos permiten

determinar y visualizar que tan alejados están los grupos en el espacio multivariado (Liria, 2016).

2.4.2.6.3 Análisis Cluster o UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic averages)

El Análisis Cluster (AC) es una técnica cuya idea básica es agrupar un conjunto de elementos o variables en un número dado de clusters o grupos. Este agrupamiento se basa en la idea de distancia o similitud entre las variables (De la Fuente, 2011).

El AC construye un dendrograma a partir de una nube de puntos original constituida por una serie de individuos en estudio, para ello define una noción de distancia entre puntos, la cual es una medida que cuantifica la separación o distancia entre los individuos dentro de la nube de puntos original (Nuñez & Escobedo, 2011). Una de las más utilizadas es la distancia Mahalanobis, la cual es la distancia existente en las medias de los grupos existentes (Liria, 2016).

2.4.2.7 Herramientas informáticas existentes

Muchos de los análisis multivariados convencionales utilizados en la morfometría tradicional se pueden llevar a cabo con paquetes estadísticos estándar de uso general, tales como el SPSS, BMDP y SAS. El programa JMP permite hacer análisis de estadística univariada y multivariada, como por ejemplo Análisis Discriminante, generando gráficas de gran impacto visual (Jaramillo & Dujardin, 2012).

Para los análisis más sofisticados en morfometría tradicional se usan programas como ACPC y ACPmg. Para la morfometría geométrica se recomienda actualmente programas como NTSYSpc y el conjunto de programas TPS (Tpsutil, Tpsdig, Tpsregr, Tpsrelw, Tpsplin), los cuales son de acceso libre (Jaramillo & Dujardin, 2012).

Para la realización de análisis como ACP y CVA, a más de la elaboración de gráficas acerca de métodos de superposición y métodos de deformación, existen programas como MorphoJ y paquetes informáticos de la serie IMP

(CoordGen, PCAGen, CVAGen), los cuales también son de uso libre (Liria, 2016).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo de especímenes

Para la obtención de especímenes de *Varroa* spp., en primer lugar se contactó con los dueños de los apiarios en el Valle de los Chillos, mediante la ayuda de registros proporcionados por Agrocalidad, Municipio de Rumiñahui y bases de datos. De cada apiario se tomó el punto GPS (Sistema de Posicionamiento Geográfico), el cual permitió conocer las coordenadas geográficas de cada apiario y de esa manera determinar el punto exacto de ubicación del lugar muestreado. Se recolectó de cada colmena muestras de abejas (aproximadamente 100) en frascos plásticos de boca ancha (Cherrez, 2015).

Posteriormente se le agregó 30 ml de agua destilada y 60 µl de jabón neutro. Se realizó una agitación por cinco minutos para separar los ácaros de las abejas. Luego se pasó el contenido del frasco a un tamiz con dos mallas de diferente tamaño de poro. Se realizó un lavado de las abejas reteniéndose éstas en la malla de mayor poro y la *Varroa* en la malla de menor tamaño de poro. De esta manera se recolectaron los especímenes de *Varroa* presente en la malla y se realizó la identificación macroscópica – microscópica y posterior conteo sobre una tela de color blanco (Cherrez, 2015).

3.1.1 Lugar de muestreo previo

Ubicación Política Cantón Quito y Rumiñahui

Provincia: Pichincha

Parroquias cantón Quito: Alangasí, Guayllabamba, Nayón, Amaguaña, Conocoto, Píntag y La Mena.

Parroquias cantón Rumiñahui: Sangolquí, Rumipamba.

Ubicación Geográfica del Valle de los Chillos

Norte: Volcán Ilaló

Sur: Paschoa

Este: Volcán Antisana

Oeste: Lomas de Puengasí

Ubicación Ecológica Valle de los Chillos

Altitud: 2500msnm

Temperatura Promedio: 15 °C

Temperatura Máxima: 29°C

Temperatura Mínima: 10°C

Precipitación Anual: 1000mm³**Humedad Relativa:** 67-85%

Tabla 1

Localización de los apiarios muestreados en el Valle de los Chillos – Ecuador

APIARIO	LOCALIZACIÓN	CANTÓN	PARROQUIA	PROPIETARIO
1	Los Cuarteles Santa Rosa de Chillo Jijón	Quito	Amaguaña	Ximena Neacato
2	San José "La Salle"	Quito	Conocoto	Gabriel Crespo
3	Barrio Buenos Aires Av. Simón Bolívar	Quito	San Sebastián	Luis Tapia
4	Guayllabamba	Quito	Guayllabamba	Benito Santillán
5	Playa Chica	Quito	Alangasí	José Lascano
6	Secas, Píntag	Quito	Píntag	Ximena Neacato
7	Alangasí	Quito	Alangasí	Xavier Alarcón
8	Barrio Cuendia	Quito	Amaguaña	José Gualotuña
9	Entrada Píntag	Quito	Píntag	Jorge Suntaxi
10	Santa Teresa II Etapa	Quito	Píntag	Fany Brusil
11	Rumipamba	Rumiñahui	Rumipamba	Luis Días
12	Sector Los Tubos	Rumiñahui	Los Tubos	Luis Días
13	San Jorge Sangolquí	Rumiñahui	San Jorge	Luis Días
14	La Balvina Los Cuarteles	Quito	Amaguaña	Luis Días
15	Aloag	Mejía	Aloag	Ramiro Hidalgo
16	Píntag San Alfonso	Quito	Píntag	Ramiro Hidalgo
17	Píntag San Alfonso	Quito	Píntag	Ramiro Hidalgo
18	Sur de Quito La Mena	Quito	La Mena	Manuel Navarrete
19	Cuendina, Santa Rosa	Quito	Amaguaña	Freddy Ñato
20	Cuendina, Santa Rosa	Quito	Amaguaña	Freddy Ñato
21	Cuendina, Santa Rosa	Quito	Amaguaña	Samuel Gualotuña
22	Barrio Patagua, Cotogchoa	Rumiñahui	Cotogchoa	Juan Salazar
23	Nayón	Quito	Nayón	Leonardo Merino
24	Conocoto	Quito	Conocoto	Jorge Ron

3.1.1. Especímenes a ser analizados

Tabla 2

Colmenas muestreadas y especímenes de *Varroa* recolectados por apiario

APIARIO	COLMENAS	VARROAS
	MUESTRADAS	RECOLECTADAS
1	10	69
2	2	4
3	2	6
4	6	21
5	2	6
6	7	12
7	4	6
8	10	76
9	7	75
10	10	32
11	8	42
12	6	34
13	5	35
14	6	50
15	10	33
16	5	10
17	4	4
18	15	40
19	8	53
20	9	75
21	5	50
22	3	18
23	10	25
24	5	42
	TOTAL	818

3.2 Materiales, reactivos y equipos

3.2.1 Materiales y reactivos para almacenamiento y montaje de especímenes

MATERIALES

- Tubos Eppendorf de 200 µL
- Pinza entomológica curva de 12 cm, ENTO SPHINX
- Pinza entomológica recta de 10 cm, ENTO SPHINX
- Aguja de disección
- Cajas Petri de plástico sin división 100 x 15 mm, SENNA
- Papel milimetrado

REACTIVOS

- Etanol absoluto para análisis al 99% ,MERK
- Medio PDA M096 Potato Dextrose Agar HIMEDIA

MUESTRAS

- Especímenes de *Varroa* spp. (Apiarios del Valle de los Chillos – Ecuador)

3.2.2 Equipos para la captura de imágenes

La captura de imágenes de los especímenes analizados, se realizó con la ayuda de los siguientes equipos:

- Estereomicroscopio modelo S4E con zoom 4, 8:1, LEICA
- Cámara fotográfica para acople directo al ocular modelo 1300, MEM
- Computadora, ACER Core I5
- Monitor Panasonic Viera 55"

3.2.3 Programas informáticos usados para análisis

La caracterización de *Varroa* spp, se realizó con el uso de los siguientes programas informáticos:

- Future WinJoe (Obtención de fotografías)
- TPSUtil (Creación de archivo TPS)

- TPSDig (Digitalización de landmarks)
- MorphoJ (AGP- Análisis Generalizado de Procrustes, PCA – Análisis de Componentes Principales, CVA – Análisis de Variables Canónicas)
- PAST (Análisis de mediciones)
- SOFA (Análisis del Tamaño Centroide)
- NEIGHBOR (Análisis Cluster)

3.3 Métodos previos al análisis

3.3.1 Clasificación y etiquetado de especímenes

Se realizó la clasificación y etiquetado de los 818 especímenes de *Varroa*, obtenidos de una investigación previa (ver detalle de localización de apiarios en la Tabla 1.) (Chérrez, 2015). Los ácaros obtenidos del muestreo realizado en los apiarios existentes en el Valle de los Chillos – Ecuador, fueron clasificados por colmena y por apiario, posteriormente colocados en tubos Eppendorf de 200 μ L de capacidad que contenían etanol absoluto al 99 % y finalmente se etiquetaron para su correcta y fácil identificación.

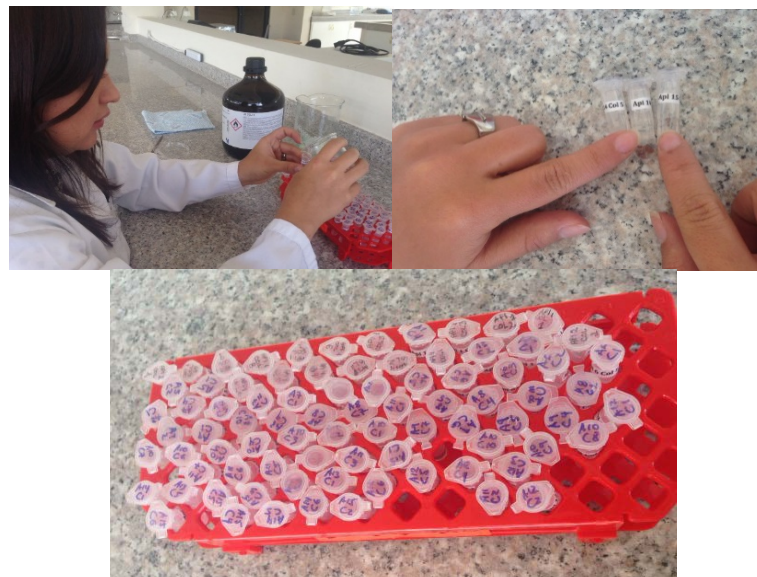


Figura 18 Clasificación y etiquetado de especímenes de *Varroa* según apiario y colmena.

3.3.2 Preparación del medio PDA (Potato Dextrose Agar) para montaje de especímenes

Se preparó medio PDA, el cual al ser dispensado en cajas petri, fue usado para la colocación de los especímenes en el proceso de captura de fotografías. El Medio PDA M096 HIMEDIA, contiene patata 200.000 g/l, dextrosa 20.000 g/l, agar 15.000 g/l y pH de $5,6 \pm 2$ a 25°C. Para la preparación se procedió a suspender 39 g del contenido en 1000 ml de agua destilada. Se calentó hasta ebullición para disolver el medio completamente. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión (121° C) durante 15 minutos. Finalmente se mezcló bien antes de dispensarlo en las cajas petri sin división 100 x 15 mm.

3.3.3 Montaje y fotografía de los especímenes

Para el estudio de caracterización morfométrica de *Varroa* spp., el primer paso fue la obtención de las imágenes que fueron digitalizadas y posteriormente analizadas. Los 818 especímenes se colocaron con la ayuda de pinzas entomológicas (pinza curva de 12 cm, pinza recta de 10 cm) en cajas Petri plásticas con medio PDA M096 HIMEDIA, para facilitar la toma de fotografías. Posteriormente se colocó una tira de papel milimetrado junto a un ácaro, lo cual sirvió como escala de tamaño para el análisis.

Las muestras, una vez realizado el montaje, fueron colocadas en un estereomicroscopio para la correcta visualización de su estructura externa con aumento 30 x. Las fotografías se obtuvieron con la ayuda de la cámara fotográfica para acople directo al ocular y el software Future WinJoe.



Figura 19 Montaje de especímenes de *Varroa* en medio PDA

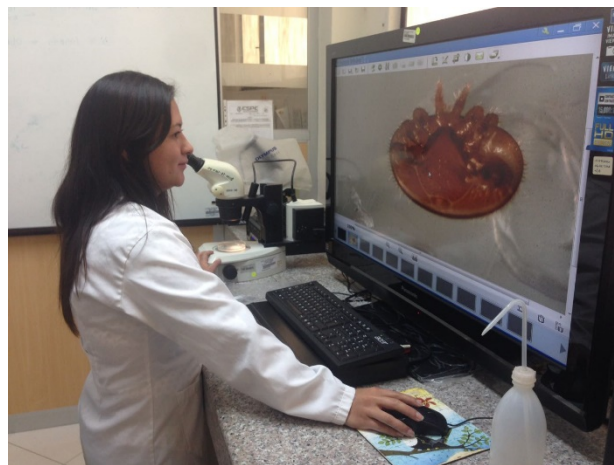


Figura 20 Fotografiado de especímenes de *Varroa* con cámara fotográfica para acople directo al ocular y software informático Future WinJoe.

3.3.4 Determinación y digitalización de los puntos anatómicos de referencia (landmarks)

Los landmarks o puntos anatómicos de referencia se determinaron en base a referentes bibliográficos basados en estudios de las especies de *Varroa* spp., descritas mediante morfometría tradicional y morfometría geométrica y en base a realización de análisis previos. La selección de landmarks describió estructuras de interés para identificar externamente los especímenes.

Los datos a ser analizados en este estudio morfométrico fueron del tipo coordenadas X - Y, por ello fue necesario digitalizar las imágenes. Para ello, se empleó el programa TPSDIG, con el fin de recolectar coordenadas en bidimensionales. Este programa utiliza un formato de salida denominado TPS que es reconocido por todos los programas de análisis de la conformación.

Antes de digitalizar la imagen, se preparó el archivo de datos, para lo cual se empleó el programa TPSUTIL, una aplicación que permite construir un archivo TPS a partir del conjunto de imágenes antes obtenidas. Una vez realizado esto, el archivo aun sin datos de coordenadas, fue abierto en el programa TPSDIG y se procedió a la digitalización de los puntos anatómicos de referencia (landmark) en cada una de las 818 imágenes.

La literatura sugirió inicialmente elegir como base para el análisis morfométrico de *Varroa* spp., puntos en la placa esternal (n=6), placa metapodal (n=3) y placa anal (n=2), ya que son estructuras que presentan diferencias marcadas entre especies.

Se realizó el AGP en el programa MorphoJ, con los landmark (n=11) seleccionados en base a referentes bibliográficos, en las imágenes previamente obtenidas (n=818). Los resultados del análisis sugirieron la eliminación de los landmark (n=3) que aportaban menor información para la determinación de las variaciones de forma entre especímenes. Se procedió a la eliminación de los landmark innecesarios en el programa TPSUtil, obteniendo finalmente una base de datos con los puntos finales (n=8). Se eligieron landmark en la placa esternal (n=4), placa metapodal (n=3) y placa anal (n=1).

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Análisis de Componentes Principales

3.4.1.1 Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos

En primer lugar se procedió a realizar un archivo de membresía, el cual es un tipo de archivo que contiene la codificación o identidad de los grupos (apiarios) que ingresaron en los análisis multivariados (ACP o CVA). El archivo de membresía se realizó en el Bloc de Notas, el mismo que contenía los 24 grupos, identificados con numeración en forma ascendente.

En el programa MorphoJ se creó un conjunto de datos a partir del archivo TPS previamente elaborado con los landmark digitalizados y el archivo de membresía. Se procedió a generar una matriz de covarianza y se ejecutó el Análisis de Componentes Principales, obteniéndose el diagrama de los grupos en estudio. El ACP se realizó con los apiarios totales ($n=24$) y landmark iniciales ($n=11$), con un total de 818 especímenes, usado como una técnica exploratoria.

3.4.2 Análisis de Variables Canónicas

3.4.2.1 Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos

En primer lugar, previo a la realización del análisis, se procedió a crear un nuevo archivo TPS con los landmark definidos luego de los análisis previos ($n=8$), eliminando los apiarios que no cumplían la regla básica en morfometría geométrica (número mínimo de especímenes por grupo \geq landmark \times 2); reduciendo el archivo a 17 apiarios y 770 especímenes.

En el programa MorphoJ se creó un conjunto de datos a partir del nuevo archivo TPS previamente elaborado y el archivo de membresía. Se procedió a generar una matriz de covarianza y se ejecutó el Análisis de Variables Canónicas, como técnica confirmatoria, obteniéndose el diagrama de los grupos en estudio.

En MorphoJ se realizó un análisis mediante un método de deformación, en el cual se realizó una comparación con la *forma consenso*, donde la “diferencia de forma” fue descrita en términos de “diferencias en las deformaciones de rejillas” que representan a los especímenes.

3.4.3 Análisis Cluster

3.4.3.1 Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos

Se realizó un análisis de agrupamiento UPGMA en el programa Neighbor, como una técnica multivariante utilizada para clasificar al conjunto de individuos (n=770) en grupos homogéneos.

Se realizó el análisis en base a la distancia Mahalanobis de los 17 apiarios analizados, la cual es la distancia existente entre las medias de los grupos existentes. Se tomó en consideración la distancia o disimilaridad entre los individuos de cada grupo, para medir mediante ésta, el grado de semejanza entre ellos. Además se realizó una tabla donde se mostró los valores de significancia para la distancia Mahalanobis, dentro del análisis UPGMA, para determinar qué tan significativa es la similitud entre apiarios.

3.4.4 Análisis del Tamaño Centroide

3.4.4.1 Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos

Para interpretar las variaciones en el tamaño de los especímenes (n=770), pertenecientes a los grupos en estudio (n=17), se realizó un Análisis del Tamaño Centroide mediante un Diagrama de Cajas y Bigotes, donde se representaron los tres cuartiles (Q1, mediana, Q3) y los valores mínimo y máximo de los datos. El análisis se realizó en el programa SOFA.

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el tamaño centroide de los apiarios, para probar si el grupo de datos analizados provenían de la misma población.

3.4.5 Medición del tamaño corporal (ancho y largo) para determinación de la especie de *Varroa*

3.4.5.1 Fundamento y procedimiento realizado con los programas informáticos

Una vez que se determinó que no existían diferencias significativas, tanto en forma como en tamaño entre los apiarios analizados, se realizó una comparación de las medidas (largo y ancho) corporales de *Varroa* presentes en el Valle de los Chillos, con resultados de investigaciones relacionadas.

En primer lugar, se eligió al azar especímenes de *Varroa* (n=48), pertenecientes a los apiarios analizados (n=24), con dichos especímenes se procedió a crear un archivo TPS en el programa TPSUtil. En el programa TPSDig, primeramente, se escaló las 48 imágenes con la finalidad de obtener posteriormente distancias en milímetros. Se procedió a digitalizar los landmark necesarios (n=4) en el contorno del espécimen para poder realizar la medición de la longitud corporal y ancho del cuerpo.

En el programa PAST se procedió a abrir el archivo TPS previamente elaborado, con las imágenes ya digitalizadas y escaladas. Se obtuvo las distancias entre los landmark 1 – 2 (ancho del cuerpo) y landmark 3 – 4 (longitud corporal) en milímetros. Una vez obtenidas las distancias requeridas, en el programa Excel, se obtuvo el promedio para cada variable de medida y se transformó dichos valores a micrómetros.

3.5 Elaboración de ficha técnica de la especie de *Varroa* presente en los apiarios analizados

Para la elaboración de la ficha técnica de *Varroa destructor*, se describió información relevante de la especie en cuanto a clasificación taxonómica, descripción morfológica, distribución, biología de la especie y problemas sanitarios ocasionados, la cual se obtuvo de revisión bibliográfica citada en el proyecto de investigación.

3.6 Elaboración del plan de acción sanitario para control de *Varroa* en los apiarios analizados.

En base al estudio epidemiológico realizado para los especímenes de *Varroa*, se determinó la prevalencia de varroosis en los apiarios del Valle de los Chillos (Cherrez, 2015), la cual es una medida que cuantifica la proporción de individuos de una población que padecen una enfermedad en un momento o periodo de tiempo determinado (Pita, Pértegas, & Valdés, 2004).

Debido al porcentaje de prevalencia de la enfermedad en la zona de muestreo, se elaboró en base a revisión bibliográfica, dos planes de acción sanitario o tratamientos para el control de *Varroa*.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Caracterización de la especie de *Varroa* mediante morfometría geométrica

4.1.1 Determinación de los landmarks o puntos anatómicos de referencia (PAR)

Inicialmente, mediante revisión bibliográfica, se eligió como base para el análisis morfométrico de *Varroa* spp., puntos en la placa esternal (n=6), placa metapodal (n=3) y placa anal (n=2), ya que son estructuras que presentan diferencias marcadas entre especies (Ver Figura 22).

Al realizar el Análisis Generalizado de Procrustes (AGP) con los landmark (n=11) seleccionados en las imágenes previamente obtenidas (n=818), los resultados del análisis sugirieron la eliminación de los landmark (n=3) que aportaban menor información para la determinación de las variaciones de forma entre especímenes, descartando el landmark 1, landmark 2 y landmark 7 (Ver Figura 23).

Se procedió a la eliminación de los landmark innecesarios, obteniendo finalmente una base de datos con los puntos finales (n=8). Luego de dicho análisis, se digitalizaron landmark en la placa esternal (n=4), placa metapodal (n=3) y placa anal (n=1) (Ver Figura 24).

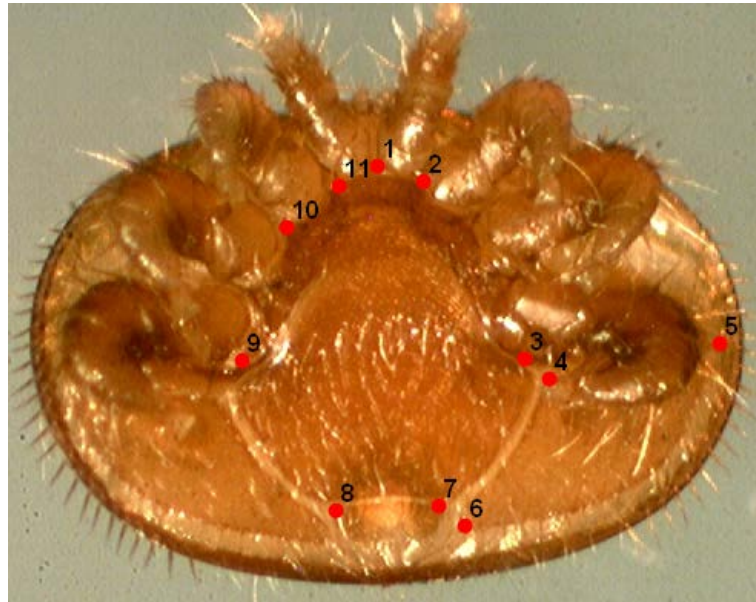


Figura 21 Puntos anatómicos de referencia (landmark) digitalizados en especímenes de *Varroa* (n=818) presentes en apiarios (n=24) del Valle de los Chillos – Ecuador

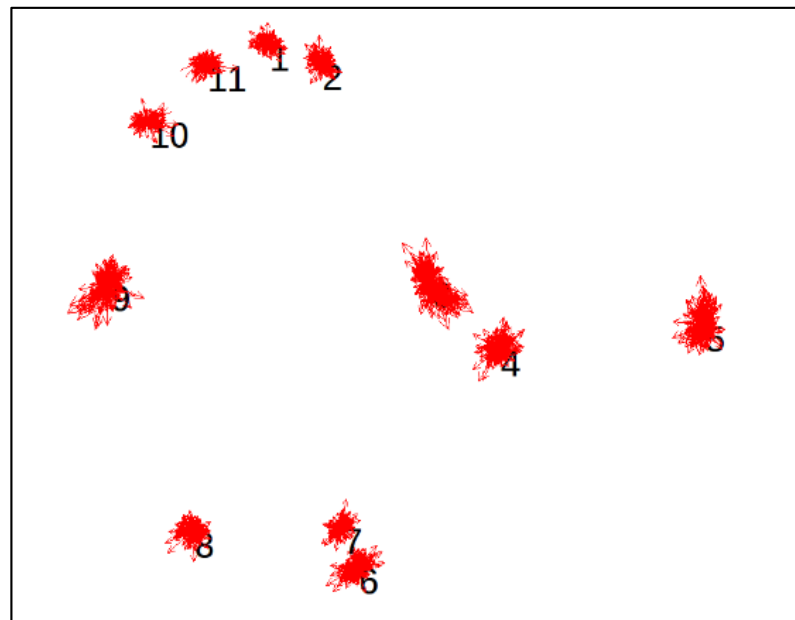


Figura 22 Análisis Generalizado de Procrustes en base a landmarks (n=11) digitalizados para especímenes de *Varroa* (n=818) presentes en apiarios (n=24) del Valle de los Chillos – Ecuador

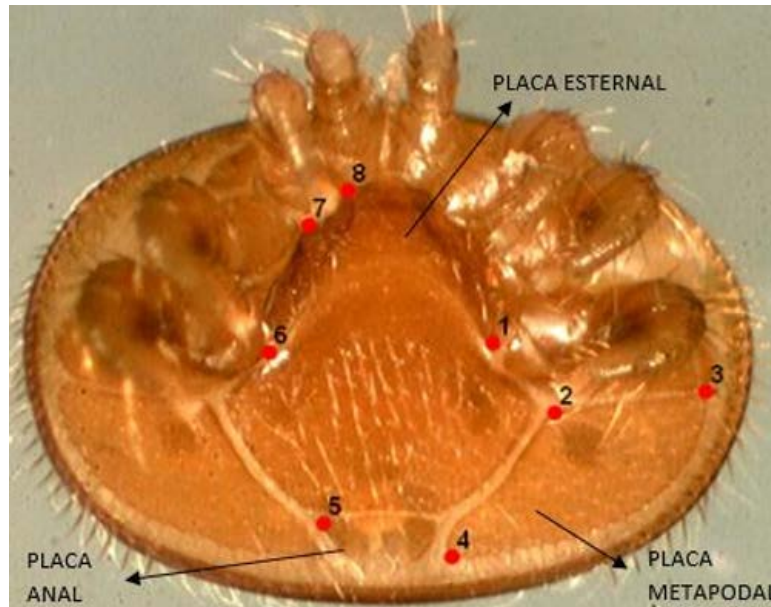


Figura 23 Puntos anatómicos de referencia (landmark) digitalizados en especímenes de *Varroa* (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador

4.1.2 Análisis de Componentes Principales

Una vez que las configuraciones fueron superpuestas por medio del Análisis Generalizado de Procrustes, las diferencias de conformación para los especímenes de *Varroa* en estudio, fueron descritas por medio de los cambios en las coordenadas de los puntos anatómicos correspondientes (n=11), por medio del Análisis de Componentes Principales (ACP). El ACP, usado como una técnica exploratoria, permitió observar las tendencias de variación entre y dentro de las muestras y reducir la dimensionalidad de los datos. En la Figura 25., se muestra el diagrama resultante del ACP para los 818 especímenes de *Varroa* de los 24 apiarios analizados, pudiendo observarse que todos los apiarios o poblaciones estaban superpuestas, evidenciando que no existían diferencias significativas entre las mismas.

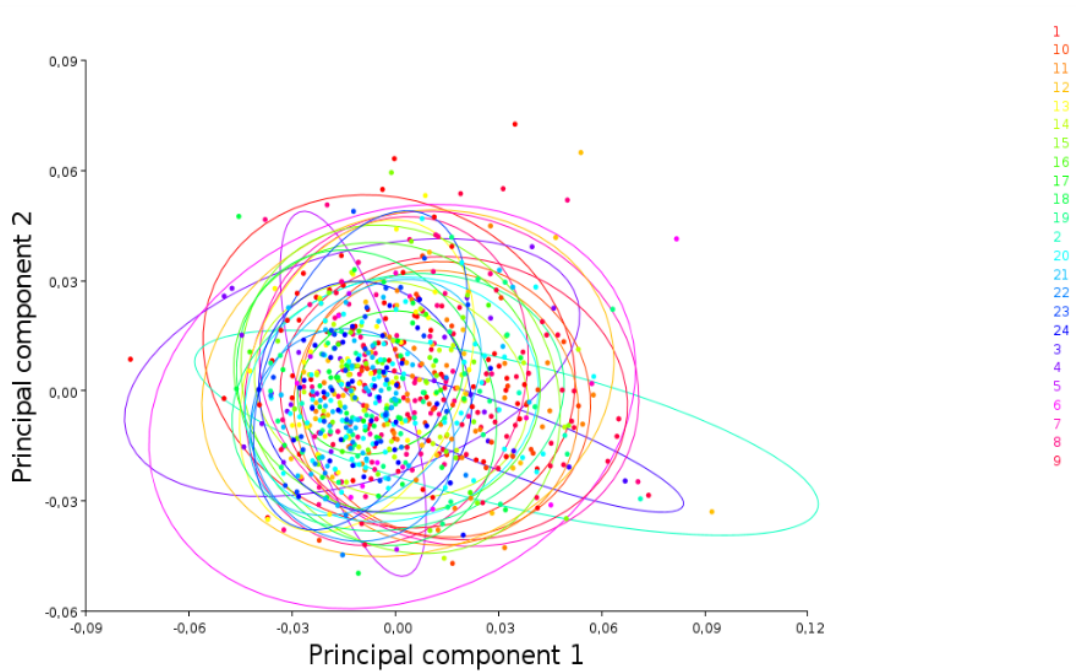


Figura 24 Diagrama de Análisis de Componentes Principales para especímenes de *Varroa* (n=818) presentes en apiarios (n=24) del Valle de los Chillos – Ecuador

4.1.3 Análisis de Variables Canónicas

Se realizó un Análisis de Variables Canónicas (CVA) como técnica confirmatoria, para lograr maximizar la separación entre grupos (apiarios) y determinar de esta manera si existían una o más especies de *Varroa* en los apiarios analizados, ya que los ejes canónicos permiten diferenciar que tan alejados están los grupos en el espacio multivariado. El CVA se realizó con el archivo de superposición previamente elaborado con los landmark (n=8) escogidos luego de los análisis previos.

En la Figura 26., se puede apreciar una superposición de los 17 apiarios analizados, evidenciando que los 770 especímenes de *Varroa* pertenecían a una misma especie.

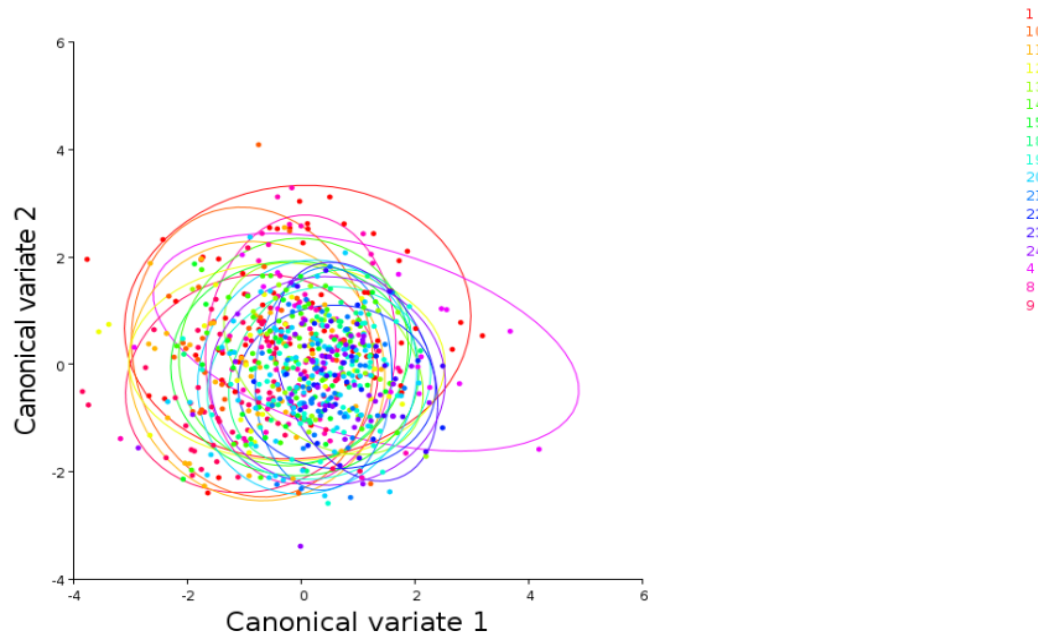


Figura 25 Diagrama de Análisis de Variables Canónicas para especímenes de *Varroa* (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador

4.1.4 Rejilla de deformación de Análisis de Variables Canónicas

La Figura 27, muestra la rejilla de deformación exagerada en 2x, para el CVA de los 770 especímenes de *Varroa* de los apiarios analizados, donde se apreció que los landmark 1, 6, 7 y 8, que se encuentran en la placa esternal de *Varroa*, son los que aportaron más información para la diferenciación entre apiarios, los mismos que se comprimieron hacia el interior de los especímenes en estudio.

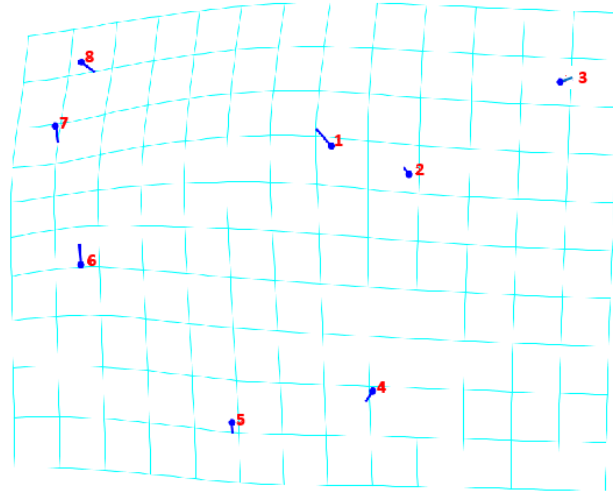


Figura 26 Rejilla de deformación de Análisis de Variables Canónicas para especímenes de *Varroa* (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador.

4.1.5 Análisis Cluster

Se realizó un Análisis Cluster para construir un dendrograma constituido por los especímenes en estudio.

La Figura 28, muestra el diagrama de agrupamiento basado en el algoritmo de UPGMA y distancia Mahalanobis para los 770 especímenes de *Varroa* pertenecientes a los 17 apiarios analizados. Se puede apreciar que el Apiario 4 fue el más disímil con respecto a los 16 apiarios restantes.

Se apreciaron dos grupos más dentro del dendrograma, donde se observó que los apiarios: Apiario 1, Apiario 12, Apiario 8, Apiario 13, Apiario 14, Apiario 18 y Apiario 10, Apiario 9 y Apiario 11, presentaban mayor similitud, perteneciendo a un mismo grupo (Grupo A); mientras que los apiarios: Apiario 15, Apiario 20, Apiario 21, Apiario 24 Apiario 23, Apiario 19 y Apiario 22 pertenecían a otro grupo (Grupo B).

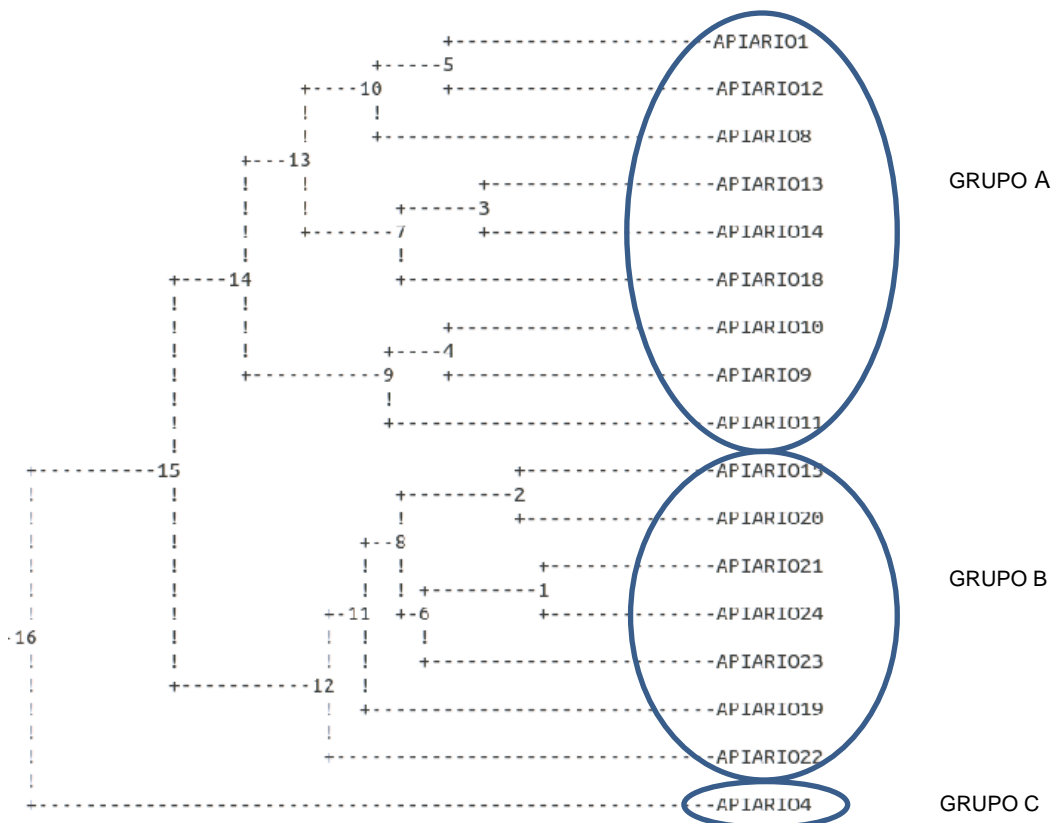


Figura 27 Diagrama de agrupamiento UPGMA (Análisis Cluster) a partir de Distancia Mahalanobis para especímenes de *Varroa* (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador

En la Tabla 3, se muestran los valores de significancia para distancia Mahalanobis para los 770 especímenes de *Varroa*., tomando en consideración los apiarios que presentan mayor similitud entre ellos, se apreció, dentro del Grupo A, que los apiarios: Apiario 1 y Apiario 12, Apiario 13 y Apiario 14, Apiario 9 y Apiario 10; y dentro del Grupo B, que los apiarios: Apiario 15 y Apiario 20, Apiario 21 y Apiario 24, no presentaban diferencias significativas. El Apiario 4, al ser el más disímil en comparación con los apiarios restantes presentó diferencias en los valores de significancia mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3

Valores de significancia para distancia Mahalanobis para especímenes de *Varroa* (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador

	1	10	11	12	13	14	15	18	19	20	21	22	23	24	4	8
10	*															
11	***	n.s														
12	n.s	n.s	n.s													
13	*	****	***	n.s												
14	n.s	*	*	n.s	n.s											
15	*	*	n.s	n.s	n.s	n.s										
18	**	***	**	n.s	n.s	n.s	n.s									
19	****	***	****	n.s	**	**	*	**								
20	****	***	**	n.s	n.s	*	n.s	n.s	**							
21	****	****	****	*	n.s	*	*	n.s	**	n.s						
22	*	***	**	n.s	n.s	*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s					
23	**	****	****	**	n.s	****	*	**	*	**	**	n.s				
24	***	****	****	*	n.s	*	n.s	n.s	*	n.s	n.s	n.s	n.s			
4	**	****	****	***	***	****	**	*	****	***	****	*	*	***		
8	****	***	****	**	**	****	**	**	****	***	****	**	****	****	****	
9	****	n.s	n.s	n.s	****	****	*	****	****	****	****	****	****	****	****	****

* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$,

n.s = no significativo

4.1.6 Diagrama Box - Plot para el Tamaño Centroide

En la Figura 29, se muestra el Diagrama Box - Plot para el Tamaño Centroide de los 770 especímenes de *Varroa* pertenecientes a los 17 apiarios. Se apreció que los valores de la mediana de los apiarios analizados se localizaban en el mismo rango.

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el tamaño centroide de los apiarios, para probar si el grupo de datos analizados provenían de la misma población. La prueba realizada arrojó un valor de $p=0,09016$, mostrando que no existían diferencias significativas para el tamaño centroide entre los apiarios en estudio.

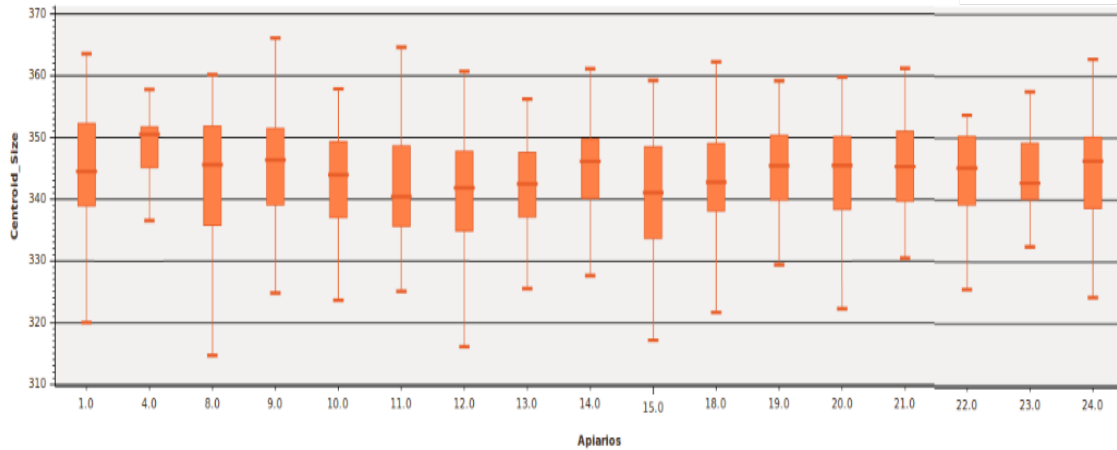


Figura 28 Diagrama Box - Plot para el Tamaño Centroide de especímenes de *Varroa* (n=770) presentes en apiarios (n=17) del Valle de los Chillos – Ecuador.

4.1.7 Medición (μm) de la talla de especímenes de *Varroa*

Fueron elegidos al azar 48 especímenes de *Varroa* (2 especímenes por apiario) pertenecientes a los 24 apiarios muestreados para realizar las mediciones de la talla (longitud corporal y ancho del cuerpo). La longitud corporal promedio de los especímenes analizados fue de $1152,8 \mu\text{m}$ (1,15 mm), y la medida del ancho del cuerpo promedio fue de $1773,7 \mu\text{m}$ (1,77 mm).

Tabla 4

Mediciones (μm) de la talla de especímenes de *Varroa* (n=48) presentes en apiarios (n=24) del Valle de los Chillos - Ecuador, en comparación con los de *V. jacobsoni* y *V. destructor* según lo informado por Anderson y Truman (2000); Zhang (2000); Boudagga et al. (2003) y Rahmani et al. (2006)

Especies	Longitud corporal	Ancho del cuerpo	N° de especímenes analizados
<i>V. destructor</i> (Anderson & Trueman 2000)	1167,3	1708,9	42
<i>V. jacobsoni</i> (Anderson & Trueman 2000)	1063,0	1506,8	73
<i>V. destructor</i> (Zhang 2000)	1159,0	1700,0	5
<i>V. destructor</i> (Boudagga et al. 2003)	1188,9	1735,5	60
<i>V. destructor</i> (Rahmani et al. 2006)	1198,8	1782,4	180
<i>V. destructor</i> (Valle de los Chillos - Ecuador)	1152,8	1773,7	48

Luego de la realización de los análisis en cuanto a la forma y tamaño de los especímenes en estudio mediante técnicas de morfometría geométrica y una vez comprobado que las muestras poseen medidas mayores en cuanto a ancho del cuerpo vs longitud corporal (forma del cuerpo ovalada), se evidencia que la especie de *Varroa* que se encuentra parasitando a *Apis mellifera* en los apiarios del Valle de los Chillos - Ecuador, es *Varroa destructor*.

4.2 Ficha técnica de *Varroa destructor*

Una vez realizado el análisis morfométrico y la medición de talla (longitud del cuerpo y ancho corporal) de los especímenes, se determinó que la especie presente en el Valle de los Chillos (Ecuador), es *Varroa destructor*. A continuación en la Ficha técnica N°1, se detalla dicho hallazgo.

FICHA TÉCNICA N°1

INFORMACIÓN GENERAL:

- **Nombre científico:** *Varroa* spp.
- **Nombre común:** Ácaro de las abejas

Clasificación taxonómica:

- **Clase:** Arachnida
- **Subclase:** Acárida
- **Orden:** Mesostigmata
- **Familia:** Varroidae
- **Género:** *Varroa*
- **Especies:**
 - *V. jacobsoni* (Oudemans, 1904),
 - *V. underwoodi* (Delfinado-Baker & Aggarwal, 1987)
 - *V. rindereri* (De Guzmán & Delfinado-Baker, 1996)
 - *V. destructor* (Anderson & Trueman, 2000)

Especie que parasita: *Apis mellifera*

DESCRIPCIÓN:

El ácaro *Varroa sp.*, causante de la varroosis en abejas, fue descubierto por Edward Jacobson en 1904 en la isla de Java, en colonias de *Apis cerana*.

CICLO DE VIDA:

El ciclo biológico del ácaro en su etapa adulta se divide en dos fases: forética y reproductiva. En la forética el ácaro parasita sobre el cuerpo de la abeja (siendo ésta la fase de propagación de la especie en nuevas colmenas) y en la reproductiva los ácaros se introducen al interior de las celdas con cría operculada, donde se produce la ovoposición. Los diferentes estadios de desarrollo de *Varroa* son: huevo - larva, protoninfa, deutoninfa y adulto.

Varroa se alimenta de la hemolinfa de la abeja adulta, el consumo de hemolinfa por un ácaro es alrededor de 0,2 μ l durante su vida. Vive de 2 a 3 meses en verano y 4 a 6 meses en invierno.

MORFOLOGÍA:

Hembra: El cuerpo de la hembra de *Varroa destructor* adulta tiene una forma elipsoidal, es deprimido dorsoventralmente, sus patas terminan en una ventosa y mide 1.1 mm de largo por 1.7 mm de ancho aproximadamente, además es más grande que el macho y de coloración rojiza.

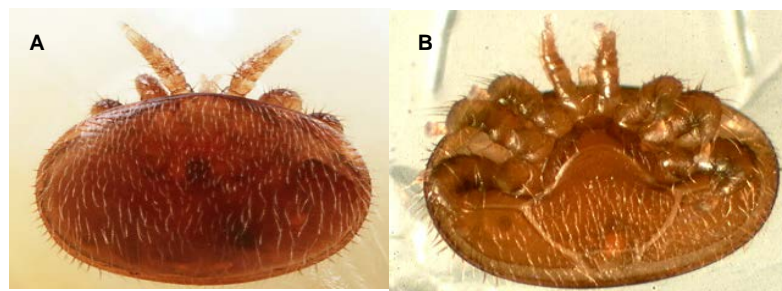


Figura 29 Vista dorsal (A) y ventral (B) de *Varroa destructor* hembra

Fuente: (Cruz, 2016)

Macho: El macho es translúcido, periforme y mide 0.7 mm de largo aproximadamente.



Figura 30 *Varroa destructor* macho

Fuente: (Ron, 2015)

DISTRIBUCIÓN:

En 1958, el ácaro fue detectado en Rusia y Japón, en 1960 en China y de 1967 a 1982 se distribuyó en Europa y norte de África. En 1971 Paraguay importó desde Japón abejas reinas infestadas con el parásito; este hecho dio lugar a la introducción y dispersión del ácaro por todo el continente americano. Según el mapa de distribución mundial de varroosis de la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) hasta el 2014, se evidencia la presencia de *Varroa* a lo largo de todo el mundo, aunque en algunos países no existe mucha información o la consideran como enfermedad nunca señalada.

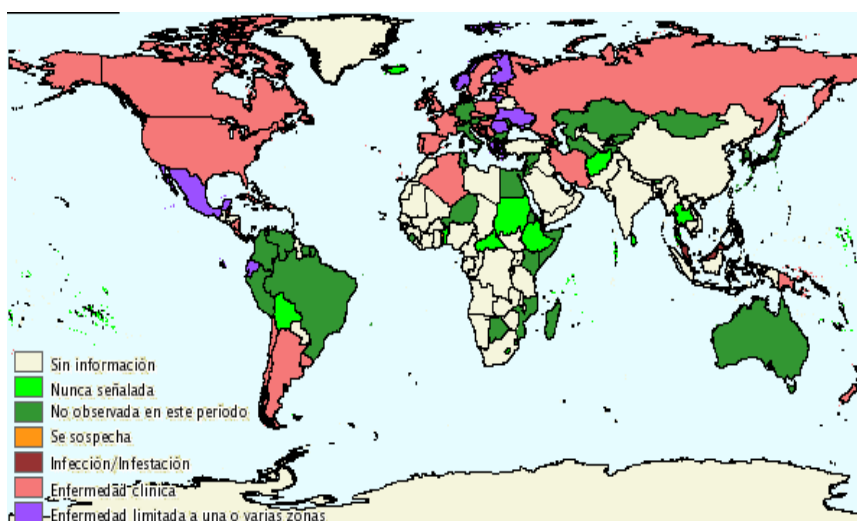


Figura 31 Distribución de *Varroa* spp.

Fuente: (OIE, 2016)

Varroa no se encuentra bajo una categoría de amenaza o CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres).

NUEVO REGISTRO:

- **Especie:** *Varroa destructor*
- **Especie parasitada:** *Apis mellifera*
- **Técnica de identificación:** Morfometría geométrica
 - **Identificado por:** Christyna Cruz Araujo y Jonathan Liria Salazar

- **Técnica de identificación:** Molecular - Gen de la subunidad 1 de citocromo oxidasa (*Cox-1*, 458pb)
 - **Identificado por:** Estefanía Cherrez Neacato y Jorge Ron Román
- **Técnica de recolección:** Recolección directa sobre *Apis mellifera* (Fase forética de *Varroa destructor*)
- **Fecha de recolección:** Febrero – Abril 2015
- **Lugar de recolección:**
 - **País:** Ecuador
 - **Provincia:** Pichincha
 - **Cantón:** Quito / Rumiñahui
 - **Localidad:** Valle de Los Chillos
- **Ubicación Ecológica Valle de Los Chillos:**
 - **Altitud:** 2500 m.s.n.m.
 - **Temperatura promedio:** 15°C
 - **Precipitación anual:** 1000 mm³
 - **Humedad Relativa;** 67 – 85%
- **Recolectado por:** Estefanía Cherrez - Neacato y Jorge Ron - Román
- **Lugar de conservación:** Laboratorio de Sanidad Animal, Carrera de Ingeniería Agropecuaria (IASA), Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.
 - **Tipo de conservante:** Ethanol 70° + refrigeración

4.3 Plan de acción sanitario para control de *Varroa destructor*

El estudio epidemiológico previo realizado en los apiarios del Valle de los Chillos (Ecuador), mostró una alta prevalencia de varroosis, determinando una prevalencia del 100 % por apiario (24/24), un 96.98 % por colmena (161/166) y de acuerdo al tipo de apiario se evidenció índices de infestación del 3.89% en apiarios pequeños, 5.45 % en apiarios medianos y 2.25 % en apiarios grandes (Cherrez, 2015). Por esta razón se recomienda a los apicultores de la zona poner en práctica un plan de acción sanitario que

ayude a controlar este problema. Para ello, se proponen dos tipos de tratamientos.

El primer tratamiento consiste en la utilización de un acaricida sintético cuyo principio activo es el Amitraz y el segundo se fundamenta en un tratamiento alternativo con un producto orgánico, el Ácido Oxálico.

4.3.1 Protocolo tratamiento con Amitraz (Proaño, 2014)

1. Colocar sobre los marcos de las colmenas azúcar impalpable de manera uniforme (50 g/colmena).
2. Realizar una solución de Amitraz al 12,5% (12,5 g Amitraz en 100 ml de agua).
3. Obtener tiras de papel filtro de 3 mm de espesor, 5 cm de ancho y 28 cm de largo.
4. Empapar las tiras de papel filtro en 8 ml de la solución de Amitraz preparada previamente (dosis equivalente a 1g Amitraz / colmena).
5. Colocar las tiras de papel filtro con la solución de Amitraz sobre los marcos de las colmenas.

4.3.2 Protocolo tratamiento con Ácido Oxálico (Silvia, 2006)

1. Preparar una solución azucarada en proporción 2:1 (agua/azúcar) y calentar a 30°C para facilitar su disolución.
2. Preparar una solución de ácido oxálico al 10% (10,0 g ácido oxálico en 100 ml de solución azucarada).
3. Colocar la solución previamente elaborada en una jeringuilla de 50 ml.
4. Aplicar una dosis de 5 ml entre marco o nebulizar 3 a 4 ml de la solución sobre ambas caras del marco de la colmena.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

La varroosis, causada por ácaros del género *Varroa* y definida como una parasitosis externa, afecta tanto a la cría como a las abejas adultas y es considerada como uno de los problemas sanitarios que ha provocado graves daños a nivel mundial, causando gran mortalidad en colmenas (SAGARPA, 2008). A pesar que el Ecuador está rodeado de países que reportan varroosis, la sanidad apícola por parte de los organismos de control en el país no ha presentado reportes actuales y estudios continuos (OIE, 2013).

El género *Varroa* consta de cuatro especies reconocidas: *Varroa jacobsoni*, *V. destructor*, *V. underwoodi* y *V. rindereri*, las cuales se caracterizan por ser morfológicamente distintas y muestran diferencias claras en las secuencias de su ADN mitocondrial (Anderson & Trueman, 2000). El presente estudio, es una investigación, que gracias a la utilización de técnicas de morfometría geométrica, realiza el reporte de la presencia de *Varroa destructor* en Ecuador; ubicándose la zona de estudio en el Valle de los Chillos, mediante muestro previo de 24 apiarios pertenecientes a dicha zona.

Los datos usados para el análisis morfométrico, denominados landmarks o puntos anatómicos de referencia, se determinaron en base a referentes bibliográficos y mediante la realización de análisis previos, los mismos que se ubicaron en la placa esternal, metapodal y anal de *Varroa*.

En un estudio realizado en Argentina sobre identificación de morfotipos de *Varroa destructor*, se analizó las dimensiones en cuanto al largo y ancho de la placa esternal, placa metapodal y placa anal de *Varroa*, determinando que dichas regiones contribuyeron a evidenciar diferencias morfológicas (Maggi, Sardella, Ruffinengo, & Eguaras, 2009). De igual manera la investigación realizada en Estados Unidos (Wisconsin y Florida) en *Varroa jacobsoni*, determinó que al examinar las dimensiones de las placas esternal, anal y metapodal, se pudo analizar la similitud entre las poblaciones de *Varroa* (Delfinado-Baker & Houck, 1989).

Tomando en cuenta lo antes mencionado, en la presente investigación se digitalizó landmarks en dichas estructuras o placas, evidenciándose que los puntos ubicados en la placa esternal, fueron los que aportaron mayor información para la interpretación de las variaciones de forma. Por tal razón, se puede usar los landmark descritos para análisis morfométrico de *Varroa*, sin ser necesaria la realización de análisis previos para su selección. Permite además, en investigaciones, disminuir el número de especímenes a recolectar, ya que se conoce el número de landmark necesarios para evidenciar e interpretar las variaciones de forma entre especies de *Varroa*.

Por otro lado, los landmark seleccionados, son válidos para investigaciones ya que se encuentran en placas o estructuras rígidas, las cuales no presentan deformaciones; además de que fueron analizadas solamente en hembras de *Varroa* en estado adulto; parámetros que permiten realizar un análisis uniforme.

Al realizar el Análisis de Variables Canónicas como técnica confirmatoria para determinar de esta manera si existían una o más especies de *Varroa*, los ejes canónicos permitieron evidenciar que los grupos estaban superpuestos (Ver Figura 26), indicando que no existían diferencias significativas en cuanto a la forma de los especímenes analizados.

Se pudo evidenciar entonces, que todos los apiarios de la zona estaban infectados con la misma especie de *Varroa*, pudiendo este hallazgo deberse a la proximidad de los apiarios analizados y gracias a esto, pudo distribuirse fácilmente la parasitosis. Por otro lado la diseminación pudo haberse producido por la trashumancia que realizan los apicultores (movilización de colmenas entre zonas).

Al realizar un Análisis Cluster para construir un dendrograma constituido por los especímenes en estudio, mostró que el Apiario 4 fue el más disímil con respecto a los 16 apiarios restantes, los cuales formaron dos grupos de acuerdo a su similitud (Ver Figura 27).

De acuerdo a dicho resultado, el Apiario 4 contiene especímenes que posiblemente podrían ser un morfotipo distinto al de los apiarios restantes,

ya que debido a que en el CVA no se mostraron diferencias significativas entre grupos, no se puede concluir que es una especie de *Varroa* diferente. Se determinó mediante Análisis Cluster, que existían siete morfotipos distintos de *Varroa destructor*, los cuales diferían de acuerdo a la ubicación geográfica donde se recolectaron las muestras (Maggi et al., 2009). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en la presente investigación.

Por esta razón la ubicación geográfica (Guayllabamba – Quito) del Apiario 4, podría ser un indicador de porque dicho apiario es el más disímil en comparación con las apiarios restantes. Además según las encuestas realizadas a los apicultores de la zona de nuestro, el Apiario 4 es el único que no tiene monte natural ni presencia de trébol rojo y blanco en sus alrededores, por lo que el medio ambiente donde se desarrolla *Varroa*, sería otro indicador de cambios en la forma.

Los resultados obtenidos determinaron que todos los especímenes analizados pertenecen a *Varroa destructor*, ya que se estableció que la longitud corporal promedio de los especímenes analizados fue de 1152,8 μm (1,15 mm), y la medida del ancho del cuerpo promedio fue de 1773,7 μm (1,77 mm). Anderson & Trueman (2000), Boudagga, Barbouche, Laarif, & Ben Hamouda (2003), Rahmani, Kamali, Saboori, & Nowzari (2006), en base a mediciones de talla en cuanto al largo y ancho del cuerpo de especímenes de *Varroa destructor*, obtuvieron valores cercanos a los obtenidos en la presente investigación (Ver Tabla 4).

El estudio de caracterización morfométrica de *Varroa*, es el primero realizado en Ecuador y de acuerdo a la comparación de los valores obtenidos para los especímenes pertenecientes al Valle de los Chillos con las investigaciones anteriormente mencionadas, se determinó que se trata de *Varroa destructor*. Este resultado concuerda con la investigación de caracterización molecular, donde se analizaron fragmentos de ADNmt que codifican el gen de la subunidad 1 de citocromo oxidasa (*Cox-1*, 458pb) de ácaros procedentes 8 apiarios del Valle de los Chillos (Ecuador). Se encontró que las 8 muestras analizadas presentaron identidad del 100% a la secuencia perteneciente al genoma completo de ADNmt de *Varroa*

destructor (Cherrez, 2015). Se demuestra entonces que la caracterización morfométrica de *Varroa*, para los 24 apiarios analizados en la presente investigación, coincide con los resultados obtenidos de caracterización molecular, pudiendo afirmarse que la especie presente en los apiarios analizados, es *Varroa destructor*.

Los resultados obtenidos para apiarios del Valle de los Chillos, difieren con los publicados por Onore en 1990, al exponer la presencia de *Varroa jacobsoni* en las provincias de El Oro y Loja. Esto podría deberse a que en la presente investigación se usaron técnicas de morfometría geométrica, las cuales en años anteriores no se utilizaban para caracterización de especies, además que se analizó un número extenso de especímenes (n=818), por lo que el estudio arroja resultados más precisos y finalmente que las zonas de estudio en las investigaciones fueron diferentes.

Las técnicas empleadas y validadas en la presente investigación y de acuerdo a los resultados obtenidos por otros autores, pueden ser usadas como una metodología previa, es decir, servir de filtro, para luego de analizar el 100% de especímenes con morfometría, posteriormente analizar un número mínimo mediante técnicas moleculares. Por esta razón, es necesario incorporar el uso de técnicas de morfometría geométrica, como una etapa de trabajo en estudios de caracterización de especies.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Mediante caracterización morfométrica se determinó que el ácaro presente en apiarios del Valle de los Chillos (Ecuador), es *Varroa destructor*.
- Los puntos anatómicos de referencia o landmarks ubicados en la placa esternal, placa metapodal y placa anal, son los referentes más importantes para la identificación de especies de *Varroa*.
- El análisis de la forma y tamaño centroide de los especímenes analizados determinó que todos los individuos pertenecen a *Varroa destructor*.
- Mediante el uso de morfometría geométrica fue posible la elaboración de una ficha técnica guía, sencilla y muy práctica, para la identificación de *Varroa destructor*.
- La aplicación de planes de acción sanitarios para el control de *Varroa destructor* (Amitraz y Ácido oxálico) presentados en la presente investigación deben ser usados en las dosis y protocolos establecidos.

6.2 Recomendaciones

- La morfometría geométrica es una herramienta de identificación y caracterización de especies, de bajo costo y de fácil implementación, por lo que se recomienda usarla como un paso previo a la caracterización molecular.
- Se recomienda el uso de landmarks ubicados en la zona ventral (placa esternal, placa metapodal y placa anal anal) de *Varroa* para caracterización de especies, ya que son estructuras que permiten evidenciar variaciones en la forma.
- Para realizar un adecuado control sanitario de *Varroa* se recomienda usar una solución de Amitraz al 12,5% y Ácido oxálico al 10%, sobre los marcos de las colmenas.

6.3 Bibliografía

- Anderson, D. L., & Trueman, J. W. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & Applied Acarology*, 24(3), 165-189. doi: 10.1023/a: 1006456720416
- Bolois, M. (2012). *Amitraz frente a Varroa destructor: Eficacia y detección de resistencia* (Tesis de Maestría). Universidad de Zaragoza, España.
- Boudagga, H., Barbouche, N., Laarif, A., & Ben Hamouda, M. H. (2003). Morphological identification of the *Varroa* species (Acari: Varroidae) colonizing Tunisian apiaries. *Systematic and Applied Acarology*, 8(0), 97. doi: 10.11158/saa.8.1.12
- Bounous, C., & Boga, V. (2005). *Fundamentos para el control de Varroa y Loque americana*. Unidad de Agronegocios y Difusión: INIA.
- Caballero, D. (2009). *Manual de enfermedades apícolas*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- Cabrera, J. (2012). La Apicultura en Ecuador: Antecedentes Históricos. *La Melífera*, 8(12),1-5.
- Calatayud, F. (2009). *Historia de la Apicultura: Evolución y conceptos básicos*. Chile: Fundación para la Innovación Agraria.
- Caron, D. (2010). Manual práctico de apicultura. *Honey Bee Biology & Beekeeping*. 5(1),1-65.
- Crespo, L., Crespo, R., Viader, S., & López, G. (2010). Ensayo a campo de la eficacia de acaricidas comerciales para el control de *Varroa destructor* (Acari: varroidae). *Ministerio de Asuntos Agrarios*, 7(12), 226-230.

- Cruzat, R., & Baasch, V. (2009). Productos en Base a Aceites Esenciales Microencapsulados para el Control del Ácaro *Varroa*. *Experiencias de Innovación para el emprendimiento Agrario*, 1-52.
- Cherrez, E. (2015). *Estudio epidemiológico y caracterización molecular de Varroa sp. en sistemas de producción de miel de abeja (Apis mellifera) en el Valle de los Chillos - Ecuador* (Tesis de Pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador, Sangolquí.
- De la Fuente, S. (2011). Análisis de Conglomerados. *Universidad Autónoma de Madrid*, 3-57.
- Delfinado-Baker, M., & Houck, M. (1989). Geographic variation in *Varroa jacobsoni* (Acari, Varroidae) : application of multivariate morphometric techniques. *Apidologie*, 20(4), 345-348.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Ellis, J. D. (2015). Standard methods for *Varroa* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-54. doi: 10.3896/ibra.1.52.1.09
- ELIKA. (2012). La importancia de la Sanidad Animal en la Apicultura, más allá de los beneficios económicos. *Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria*. 2(3), 6.
- Ellis, J., & Nalen, Z. (2013). *Varroa* Mite, *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Arachnida: Acari:Varroidae). *Department of Entomology and Nematology, University of Florida*, 1-7.
- FAO. (2014). Principios y avances sobre la polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y El Caribe. *FAO Publications*. 6(2), 1-49.

- Flores, J., Padilla, F., & Pérez, A. (2007). Aspectos aplicados del ciclo biológico de varroa y de su dinámica estacional. *Departamento de Zoología. Universidad de Córdoba*, 19-27.
- Giacomelli, A., Pietropaoli, M., Pizzariello, M., Capomolla, I., & Formato, G. (2013). Pillole di anatomia e biologia di *Varroa destructor*. *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana*, 66-70.
- Gómez, M., & Rodríguez, B. (2011). *Evaluación del uso de diferentes concentraciones de acaricida comercial en el control de Varroa (Varroa destructor), en apiario infestado* (Tesis de Pregrado). Universidad de El Salvador. San Miguel.
- Goodwin, M., & Van Eaton, C. (2001). Control of Varroa - A Guide for New Zealand Beekeepers. *New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry*, 5-114.
- Ibacache, A. (2006). *Evaluación de cuatro tratamientos alternativos en el control de Varroa destructor Anderson y Trueman en Apis mellifera L. en la zona de Valparaíso* (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Católica de Valparaiso. Chile.
- Jaramillo, N. (2011). Morfometría Geométrica: Principios Teóricos y Métodos de Empleo. *Research Gate*. 7(4), 23.
- Jaramillo, N., & Dujardin, j. (2012). Análisis Morfométrico: significado biológico del tamaño y la conformación. Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, 1-20.
- Kluser, S., Neumann, P., & Chauzart, M. (2010). Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators. *United Nations Environment Programme (UNEP)*, 1-12.

- Liria, J. (2016). Análisis morfométrico II: ACP, CVA/MANOVA, Regresión, EDMA, Filogenia. *IKIAM*, 39.
- López, A. (2015). Morfometría geométrica: el estudio de la forma y su aplicación en biología. *Universidad del Mar*. 19(2), 53-59.
- Maggi, M. D., Sardella, N. H., Ruffinengo, S. R., & Eguaras, M. J. (2009). Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitol Res*, 105(6), 1629-1636. doi: 10.1007/s00436-009-1605-8
- Martín, F. (2006). *Evaluación de la aplicación estival de Apilife Var en el control de Varroa destructor Anderson y Trueman, ectoparásito de Apis mellifera L* (Tesis de Pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Martinez, J., Alcalá, K., Leal, M., Vivas, J., & Martinez, E. (2011). Prevención de Varroosis y Suplementación. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 5-25.
- Martinez, J., Medina, L., & Catzin, A. (2011). Frecuencia de *Varroa destructor*, *Nosema apis* y *Acarapis woodi* en colonias manejadas y enjambres silvestres de abejas (*Apis mellifera*) en Mérida, Yucatán. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 25-38.
- Moreno, A. (2004). Manual control de enfermedades apícolas (Descripción, Diagnóstico y Tratamiento). *Red Nacional Apícola*, 3-59.
- Nopala, D. (2006). Historia de la apiicultura. *INPE*, 1-23.
- Nuñez, C., & Escobedo, D. (2011). Uso correcto del Análisis Cluster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*. 22(2), 415-427.

- OIE. (2013). Varroosis of honey bees, Ecuador. *Informes 2013 OIE*. 1-2.
- Onore, G. (1990). Primer registro en el Ecuador de *Varroa jacobsoni*, ácaro parasito de *Apis Mellifera*. *Centro de Diagnóstico Entomológico, Departamento de Ciencias Biológicas - PUCE*, 4.
- Özkan, A., & Kandemir, I. (2012). Comparison of two morphometric methods for discriminating honey bee (*Apis mellifera* L.) populations in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 2013 (37), 205-210. doi: 10.3906/zoo-1104-10
- Pita, S., Pértegas, S., & Valdés, F. (2004). Medidas de frecuencia de enfermedad. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística*. Editorial España, 1-6.
- Portales, D. (2003). *Aplicación primaveral de mentol para el control de Varroa destructor Anderson & Trueman, en Apis mellifera L.* (Tesis de Pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Proaño, L. (2014). *Evaluación de la toxicidad de ácido oxálico, aceite esencial de eucalipto y amitraz en abejas Apis mellifera adultas infestadas con el ácaro Varroa destructor* (Tesis de Pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador, Sangolquí.
- Rahmani, H., Kamali, K., Saboori, A., & Nowzari, J. (2006). Report and Survey of Morphometric Characteristics of *Varroa destructor* (Acari: *Varroidae*) Collected from Honey Bees in Tehran Province, Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 8, 351-355.
- Ramos, J. (2012). Las propiedades maravillosas de la miel de abeja y cómo saber si es pura. *Revista Apicultura*, 8-12.

- Rosado, M. (2007). Polinizadores y biodiversidad. Asociación española de Entomología, 1-156.
- Sadeghi, S., Adriaens, D., & Dumont, H. (2009). Geometric morphometric analysis of wing shape variation in ten european populations of *Calopteryx splendens* (Harris, 1782) (Zygoptera: Odonata). *Odonatologica*. 38(4), 343-360.
- SAGARPA. (2008). Manual de Patología Apícola. *Revista México*, 1-53.
- Salamanca Grosso, G., Osorio Tangarife, M. P., & Rodríguez Arias, N. (2012). Presencia e incidencia forética de *Varroa destructor* A. (Mesostigma: *Varroidae*) en colonias de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), en Colombia. *Zootecnia Tropical*. 30, 183-195.
- Salvachua, J. (1989). La transhumancia en la apicultura. *Control regional apícola de Castilla - La Mancha*, 1-28.
- Silvia, A. (2006). *Evaluación del ácido oxálico sobre Varroa destructor* (Tesis de Pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Terán, R. (2006). *Caracterización de dos morfotipos encontrados en machos de Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata mediante marcadores morfométricos y moleculares* (Tesis de Pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Ecuador, Quito.
- Torcida, S., & Perez, I. (2012). Análisis de Procrustes y el estudio de la variación morfológica. *Revista Argentina de Antropología Biológica*. 14(1), 11.
- Toro, M. V., Manriquez, G., & Suazo, I. (2010). Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la

- Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*. 28, 977-990.
- Ulloa, J., Mondragón, P., Rodríguez, R., Reséndiz, J., & Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Universidad Autónoma de Nayarit*. 4(2007 - 0713), 17.
- Usabiaga, J., Gallardo, J., & Cajero, S. (2002). Patología Apícola. *Revista IICA*, 1-86.
- Van der Molen, S., & González, R. (2010). Introducción a la Morfometría Geométrica: Curso teórico - práctico. *CENPAT - CONICET*, 1-4.
- Van der Molen, S., Martínez, N., & González, R. (2007). Introducción a la Morfometría Geométrica. *Univesidad de Barcelona*, 1-78.
- Vaquero, J., Vargas, P., & Plata, D. (2010). Guía Técnica de Sanidad Apícola. *Revista BID*, 1-89.
- Weiss, K. (2008). Loque Americana y Loque Europea. *Informe OIE 2008*, 1-8.