

Métodos estándar para la investigación del pequeño escarabajo de las colmenas

Please cite this paper as:-

NEUMANN, P; EVANS, J D; PETTIS, J S; PIRK, C W W; SCHÄFER, M O; TANNER, G; ELLIS, J D (2013) Standard methods for small hive beetle research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research. Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.19>

Resumen

El pequeño escarabajo de la colmena, *Aethina tumida*, es un parásito y carroñero de la abeja de la miel y otras colonias de abejas sociales. Es originario de África subsahariana, donde sólo se comporta como plaga menor. Sin embargo, los escarabajos pueden ser parásitos dañinos de las subespecies de abejas europeas. Rápidamente, después de que *A. tumida* estableciera poblaciones fuera de su área endémica, el efecto devastador de este escarabajo en condiciones climáticas adecuadas impulsó un activo esfuerzo de investigación para comprender y controlar mejor esta especie invasora. En más de una década, *A. tumida* se ha extendido prácticamente por todos los EE.UU. y en toda la costa Este de Australia. Aunque comparativamente son pocos los investigadores que han trabajado con este organismo, surgió una diversidad de métodos de investigación utilizando diversas técnicas para lograr el mismo objetivo. La diversidad de métodos complica la comparación de los resultados, lo que dificulta la comprensión de este parásito. Aquí, ofrecemos protocolos fáciles de utilizar para la recolección, la identificación, el diagnóstico, la crianza, y para ensayos experimentales con *A. tumida*. Esperamos que estos métodos se adopten como normas estándar por la comunidad científica para el diseño y la realización de investigaciones sobre *A. tumida*.

TABLA DE CONTENIDOS

		No. de pag.			No. de pag.
1.	Introducción	4	3.1.5.	Técnicas de marcaje	
2.	Diagnóstico y toma de muestras	4	3.1.5.1.	Marcaje de larvas de PEC	
2.1.	Apariencia del escarabajo durante las diferentes etapas de desarrollo.	4	3.1.5.2.	Marcaje de PEC adultos	
2.1.1.	Huevos	4	3.1.5.2.1.	Marcaje de PEC adultos con alimentos pigmentados	
2.1.2.	Larvas	5	3.1.5.2.2.	Muecas torácicas en PEC adultos.	
2.1.3.	Pupas	5	3.1.6.	Efecto de las condiciones externas sobre PEC en laboratorio.	
2.1.4.	Adultos	5	3.1.6.1.	Investigación de efectos de la dieta sobre la reproducción del PEC	
2.2.	Localización del escarabajo durante los diferentes estadios de desarrollo.	6	3.1.6.2.	Determinación de los efectos del suelo en la pupación del PEC	
2.2.1.	Huevos	6	3.1.7.	El PEC como vector de patógenos de las abejas	
2.2.2.	Larvas	6	3.1.7.1.	Investigación de las interacciones potenciales entre <i>A. tumida</i> y <i>Paenibacillus larvae</i> , el organismo causante del Loque Americano	
2.2.3	Pupas	6	3.1.7.2.	Investigación del potencial de PEC como vector de virus de las abejas.	
2.2.4	Adultos	7	3.1.8.	Investigación de patógenos y parásitos del PEC	
2.3.	Envío de muestras de abejas	7	3.1.8.1.	Inoculando larvas de PEC con hongos entomopatógenos	
2.3.1.	Inspección de envíos de reinas contra el Pequeño Escarabajo de la Colmena	7	3.1.8.2.	Infestando PEC con nemátodos	
2.4.	Muestreo de adultos del PEC	7	3.1.8.2.1.	Infestación <i>In Vitro</i> de larvas errantes con una suspensión acuosa de nemátodos.	
2.4.1.	Recolección Manual	7	3.1.8.2.2.	Infestación <i>In Vitro</i> de larvas en el suelo usando bioensayos de arena.	
2.4.2.	Trampas en colonias	7	3.1.8.2.3.	Infestación <i>In Vitro</i> de pupas en suelo con suspensión acuosa de nemátodos	
2.4.3.	Trampas fuera de colonias	8	3.1.8.2.4.	Infestación <i>In Vitro</i> de pupas en suelo con cadáveres infectados con nemátodos.	
2.4.3.1.	Captura de PEC adultos	8	3.2.	Técnicas de campo	
2.4.3.2.	Captura de larvas de PEC	8	3.2.1.	Investigando interacciones intra coloniales entre abejas adultas y PEC adultos.	
2.4.4.	Almacenamiento y envío de muestras de PEC	9	3.2.1.1.	Establecimiento general de los experimentos.	
2.4.5.	Diagnósticos moleculares	9	3.2.1.2.	Categorías de comportamiento	
2.4.5.1.	Extracción de ADN	9	3.2.1.3.	Investigando interacciones de comportamiento de abejas adultas y adultos del PEC en la entrada de la colonia –dos opciones alternativas.	
2.4.5.2.	Análisis de ADN mitocondrial	9	3.2.2.	Investigando el comportamiento de ovoposición del PEC y las respuestas higiénicas de las abejas a los huevos y larvas jóvenes del PEC.	

2.4.5.3.	Análisis microsatelitales	10	3.2.2.1.	Promover el comportamiento de ovoposición del PEC en celdas de cría descubiertas.	
2.4.5.4.	Cribado de PEC en escombros de la colmena.	10	3.2.2.2.	Identificación y marcaje de las celdas en las cuales el PEC ha ovopositado	
2.4.5.5.	Trabajo genético, a futuro, con el Pequeño Escarabajo de la Colmena.	11	3.2.2.3.	Determinar la respuesta higienista de las abejas hacia los huevos y las larvas jóvenes de PEC	
3.	Técnicas para investigación experimental	11	3.2.3.	Determinar el número y distribución de PEC adultos dentro de una colonia en campo, racimos invernales y colonias jóvenes sin PEC	
3.1.	Técnicas de laboratorio	11	3.2.3.1.	Monitorear visualmente el número de escarabajo en colonias vivas y/remover los escarabajos para comenzar colonias libres de escarabajo	
3.1.1.1.	Dieta	19	3.2.3.2.	Contando el número y distribución de los escarabajos en colonias recientemente sacrificadas	
3.1.1.2.	Condiciones de transporte y mantenimiento del PEC	20	3.2.3.2.1.	Sacrificar con nitrógeno líquido	
3.1.1.2.1	Mantenimiento de colonias		3.2.3.2.2.	Sacrificar con gasolina	
3.1.1.2.2	Mantenimiento individual		3.2.3.2.3.	Sacrificio por congelamiento	
3.1.3.	Técnica de cría		3.2.3.3.	Contar el número de escarabajos y definir su distribución espacial en racimos invernales sacrificados por sumersión en nitrógeno líquido	
3.1.3.1.	Procedimiento de crianza		3.2.4.	Colectar huevos de PEC	
3.1.3.2.	Crianza individual		3.2.5.	Introducir PEC adultos a la colmena	
3.1.4.	Determinación del sexo		4.	Agradecimientos	
3.1.4.1.	Determinación del sexo en adultos		5.	Referencias	
3.1.4.2.	Determinación del sexo en pupas				

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) fue nombrada y descrita en 1867 por Andrew Dickson Murray en los Anales y la Revista de Historia Natural de Londres (Murray, 1867). Recibió dos muestras procedentes de la Antigua Calabar, en la costa oeste de África. El pequeño escarabajo de la colmena (PEC) es un parásito y carroñero de abejas y otras colonias de abejas sociales nativas de África subsahariana, donde se consideran por lo general sólo una plaga menor (Lundie, 1940; Schmolke, 1974; Hepburn and Radloff, 1998; Neumann and Elzen, 2004; Neumann and Ellis, 2008). En 1996, el PEC fue descubierto fuera de su área de distribución natural en colonias de abejas de subespecie europea en el sudeste de los EE.UU. (Elzen et al, 1999; Hood, 2004). Desde entonces, se han reportado introducciones de PEC en otros países (Neumann and Elzen, 2004; Ellis y Munn, 2005; Neumann y Ellis, 2008). En estas nuevos rangos, los escarabajos pueden ser parásitos dañinos de las colonias de abejas de subespecies europeas (Elzen et al, 1999; Hood, 2004) y también puede dañar colonias no pertenecientes al género *Apis* como los abejorros y las abejas sin aguijón (Spiewok y Neumann, 2006a; Hoffmann et al, 2008; Greco et al, 2010; Halcroft et al, 2011). Muy rápidamente después de que *A. tumida* establecido poblaciones fuera de su área endémica, los efectos devastadores de este escarabajo en las colonias de abejas melíferas (dadas las

condiciones climáticas y de suelos adecuados, Ellis et al., 2004c) dio lugar a un esfuerzo activo de investigación para entender y controlar mejor esta plaga. En más de una década, *A. tumida* se ha extendido y establecido casi en todos los EE.UU. y en toda la costa este de Australia (Neumann and Ellis, 2008). Aunque relativamente pocos laboratorios han trabajado con este organismo, ha surgido una gama de diferentes métodos de investigación. Aquí ofrecemos una visión general de los métodos de campo y laboratorio de ensayos experimentales de *A. tumida*, que esperamos se acepten como estándares por la comunidad científica en el diseño y la realización de investigaciones sobre el PEC.

2. DIAGNÓSTICO Y TOMA DE MUESTRAS

La investigación del pequeño escarabajo de la colmena requiere aproximaciones diagnósticas y experimentales e involucra una amplia gama de técnicas diferentes para los ensayos de laboratorio y de campo. Para ambos, el diagnóstico y los experimentos, es crucial para encontrar e identificar el PEC. El conocimiento sobre el aspecto del escarabajo y la ubicación en la colonia durante las diferentes etapas de desarrollo son necesarios para trabajar con esta plaga.

2.1. APARIENCIA DEL ESCARABAJO DURANTE LAS DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO

2.1.1. HUEVOS

Los huevos de *A. tumida* son blanco perla y unos 2/3 del tamaño de un huevo de abeja (Fig. 1). Por lo general se pueden encontrar agrupados en racimos típicos (Lundie 1940). Normalmente, los huevos eclosionan en unos tres días, a veces hasta en más de seis días (Lundie, 1940). Con baja humedad relativa, la eclosión del huevo puede reducirse (Somerville, 2003; Stedman, 2006).

(Schmolke, 1974; Fig. 2). El desarrollo larvario toma 10-14 días, pero puede extenderse a 30 días, dependiendo de los recursos alimenticios y la temperatura (Stedman, 2006). Tienen tres pares de patas cerca de la cabeza, una fila característica de espinas dorsales en pares en cada segmento y dos pares de espinas sobresalientes sub-terminales en el extremo posterior del dorso que las distinguen de las larvas de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*).



Fig 1. Huevos del pequeño escarabajo de la colmena dispuestos en racimos dentro de la cámara de cría. Son ~ 1,4 mm de longitud y ~ 0,26 mm de anchura (Lundie, 1940).

2.1.2. LARVAS

Las larvas de PEC son de color blanco crema y emergen del cascarón del huevo a través de una ranura longitudinal en el extremo anterior (Lundie, 1940). Después de la eclosión, las larvas tienen alrededor de 1,3 mm de largo y crecen a un tamaño final de alrededor de 8.6 a 10.5 mm de longitud

2.1.3. PUPAS

Las pupas de *A. tumida* son del tipo exaratas, lo que significa que sus extremidades tales como las patas y las vainas de las alas son, en contraste

con las pupas obteatas, no pegadas al cuerpo (fig. 3). Las pupas en las primeras etapas (Fig. 3a) son de color blanco-nacarado con una serie de proyecciones característicos en el tórax y el abdomen, pero se oscurecen a medida que desarrollan (fig. 3b); su exoesqueleto se endurece, con pigmentación que aparece primero en los ojos y luego las alas posteriores



Fig. 2. Pequeño escarabajo de la colmena. El estado 'ambulante' se muestra en la fotografía.

Fotografía: Marc Schäfer.

(Lundie, 1940). Dependiendo de la temperatura del suelo, el tiempo de pupación varía entre 15 a 74 día (Neumann *et al.*, 2001a), pero puede tardar hasta 100 días en los períodos fríos (Stedman, 2006). Durante la

eclosión, el pupario se rompe y el escarabajo adulto emerge (Fig. 3c).

2.1.4. ADULTOS

Los escarabajos adultos de *A. tumida* (Fig. 3d) son aproximadamente 1/3 del tamaño de una abeja obrera. Son de forma ovalada y varían en tamaño de 5 a 7 mm de longitud y 3 a 4,5 mm de anchura. Los cuerpos de los adultos son anchos y dorsoventralmente aplanado. Durante un corto período después de la emergencia, son de color marrón rojizo (Fig. 3c), pero durante la maduración se oscurecen a marrón oscuro o incluso negro (fig. 3d). La cabeza, el tórax y el abdomen están bien separados. Sus élitros son cortos, por lo que un par de segmentos de su abdomen son visibles; sus antenas son distintivamente capitadas. Todo el cuerpo está cubierto de setas cortas y finas.



Fig. 3. Pupas y adultos del Pequeño escarabajo de la colmena: A. Pupa en estadio temprano; B. Pupa en estadio maduro; C. Adulto listo para emerger de la cámara de pupación; D. Adulto en un panal de abeja (vista dorsal) con antenas típica y élitros cortos.

Fotografías A-C: Anna Röttger; D: Nelles Ruppert.

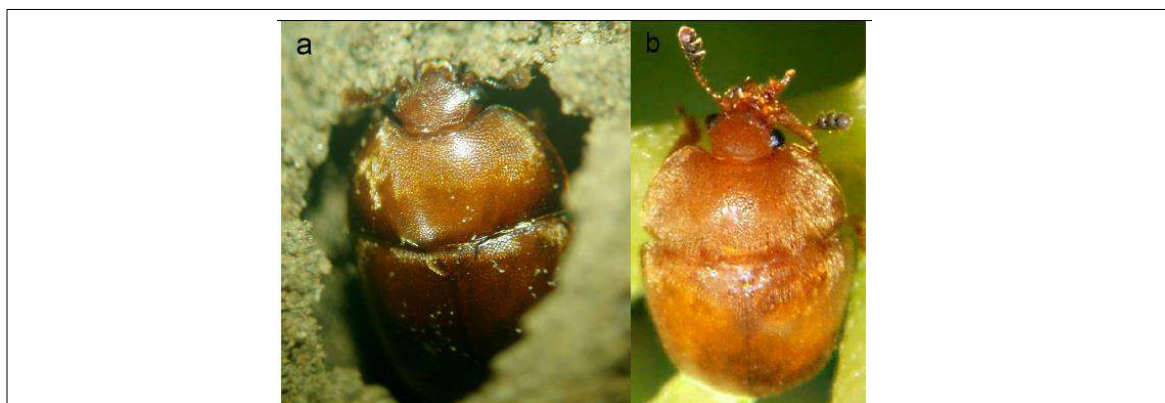


Fig. 4. Escarabajos adultos de la familia Nitidulidae los cuales están asociados con colonias de abejas: a. *Aethina tumida* listo para emerger de la cámara de pupación. Fotografías: Anna Röttger; b. *Cychramus luteus*.

Fotografías: Frank Koehler.

Nota: Se debe tener cuidado de no confundir PEC con otros escarabajos Nitidúlidos estrechamente relacionados. Esto es especialmente

cierto para *Cychramus luteus*, el cual pueden ser fácilmente confundido con un PEC adulto en desarrollo (Neumann y Ritter, 2004, Fig. 4). En caso de duda, la especie debe ser confirmada con base en características morfológicas definitivas (por ejemplo, la forma del ovopositor y antenas, la coloración, forma del pronoto, longitud de los élitros, y otros atributos definidos, Freude *et al.*, 1967).

Las siguientes características de PEC son también útiles para distinguirlos de otros Nitidúlidos en el campo:

- Antenas capitadas son tan largas como anchas.
- Élitros cortos: el final del abdomen es visible.
- Márgenes laterales del pronoto con bordes dentados.

2.2. LOCALIZACIÓN DEL ESCARABAJO DURANTE LAS DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO

2.2.1. HUEVOS

Los Huevos de *A. tumida* son depositados principalmente en racimos (Fig. 1) que se puede encontrar en cualquier lugar dentro de la colmena. Las hembras parecen preferir las grietas o cavidades para ovopositar (Neumann y Härtel, 2004), sin embargo, los huevos también se pueden encontrar en celdas o debajo de celdas de miel operculadas (Neumann y Hoffmann, 2008) o directamente con las pupas de abejas por debajo de los opérculos de las celdas (Ellis *et al.*, 2003f; Ellis and Delaplane, 2008).

2.2.2. LAS LARVAS

Todas las etapas de larvas se pueden encontrar caminando sobre y dentro de los panales donde especialmente perforan los opérculos y paredes laterales de celdas recientes. Por el

contrario, panales más viejos con varias capas de capullos parecen resistir mejor la penetración. Las larvas también se puede encontrar debajo de los panales de miel operculados (Neumann y Hoffmann, 2008) y en el fondo del cajón, siempre que haya suficiente alimento (por ejemplo, las abejas adultas muertas, Spiewok y Neumann, 2006b). Cuando se ha desarrollado por completo, llamada larvas 'errantes' (Fig. 5; Lundie, 1940) también se puede encontrar en el suelo que rodea la colonia infestada, donde buscan tierra adecuada para pupar. Las larvas también se pueden observar en las instalaciones apícolas (por ejemplo, almacenes de miel) debido a bajos estándares de calidad, condiciones de almacenamiento inadecuado de panales u otro material. Tenga en cuenta que las larvas errantes de PEC puede moverse a distancias considerables buscando suelo adecuado (> 200 m, Stedman, 2006). Raramente se reportan larvas de PEC fuera de las colmenas, apiarios u otras instalaciones apícolas (por ejemplo, de vez en cuando en cubetas de fruta, Buchholz *et al.*, 2008).

2.2.3. PUPAS

La pupación tiene lugar en el suelo que rodea la colonia en cámaras individuales a poca profundidad (rara vez más profundo que 20 cm, de Guzmán *et al.*, 2009). Las pupas se pueden tamizar, con cuidado, del suelo (tamiz: 20 x 20 cm; ancho de malla: 1 mm) y luego recogerlas con pinzas o

un aspirador (Pettis y Shimanuki, 2000).

2.2.4. ADULTOS

En la colmena, el PEC se encuentra regularmente en todas partes, donde pueda esconderse de las abejas o en áreas de la colmena con una baja densidad de abejas, pero parecen preferir las tablas de fondo (hasta el 40 % de la población de PEC en la colmena, Neumann y Hoffmann, 2008). La mayoría de PEC no deambulan libremente por la colmena porque las



Fig. 5. Larvas errantes del pequeño escarabajo de la colmena.

Fotografía: Peter Neumann.

abejas se defienden contra ellos acorralándolos y encerrándolos en sitios de confinamiento (Neumann *et al.*, 2001c; Ellis, 2005). Los apicultores que trabajan en una colonia suelen abrir estos confinamientos, lo que libera a los escarabajos dispersándose por todo el material. Sin embargo, los adultos PEC son a menudo muy difíciles de detectar durante la revisión de colonias debido a su coloración oscura y su tendencia a evitar la luz solar,



Fig. 6. Colección manual de adultos del Pequeño Escarabajo de la Colmena usando un aspirador de boca (para detalles por favor referirse a Neumann y Hoffmann (2008)).

Fotografía: Dorothee Hoffmann.

escondiéndose en las esquinas o debajo del material. Fuera de las colmenas, los adultos a menudo se pueden observar en los almacenes de miel y debajo de las colmenas, dependiendo de la densidad poblacional de las abejas y de la eficacia de saneamiento del (los) apicultor(es) respectivo(s) (Spiewok et al, 2007; 2008). El adulto de PEC raramente se han reportado fuera de las colmenas o instalaciones apícolas (por ejemplo, en los cubos de frutas, Buchholz et al., 2008).

2.3. ENVÍO DE MUESTRAS DE ABEJAS

La rápida detección e identificación del PEC es crucial para limitar aún más la distribución de esta especie. Para evitar que el escarabajo se introduzca a



Fig. 7. Uso de tiras de diagnóstico para detectar adultos del pequeño escarabajo de la colmena. Las tiras son colocadas en el fondo de la cámara de cría deslizándolas a través de la piquera. Se debe tener especial cuidado de que las tablas del fondo estén limpias para evitar que los escarabajos se escondan debajo de las tiras y no dentro.

Fotografía: USDA.

otras áreas o países se deben inspeccionar cuidadosamente las reinas, obreras o colonias de abejas importadas. En cualquier caso, muestras sospechosas de abejas procedentes de países donde se conoce la presencia del PEC deben ser enviados de inmediato a los respectivos laboratorios de referencia nacional o la autoridad competente para su examen e identificación.

2.3.1. INSPECCIÓN DE ENVÍOS DE REINAS CONTRA EL PEQUEÑO ESCARABAJO DE LA COLMENA.

Cuando se recibe un envío de abejas reinas que han de ser inspeccionados para detectar la presencia del pequeño escarabajo de la colmena, los siguientes métodos pueden ser utilizados:

- 1) Retire la reina de su jaula y haga una inspección visual de ella para localizar signos de PEC (adultos,

larvas o huevos; Fig. 1-3) o de cualquier otra especie que puedan introducirse, tales como los ácaros *Tropilaelaps* spp. (vea el artículo de BEEBOOK sobre *Tropilaelaps* (Anderson et al., 2013)) o *Varroa destructor* (ver el artículo de BEEBOOK sobre *Varroa* (Dietemann et al., 2013)).

- 2) Resguarde la reina apropiadamente (por ejemplo, en una colonia), de acuerdo con los procedimientos y las regulaciones locales.
- 3) Coloque inmediatamente el recipiente de transporte y jaula de la reina, incluyendo las obreras nodrizas, en una bolsa de cierre hermético y guárdelo en un congelador durante al menos 24 horas para matar a las nodrizas y las especies introducidas como PEC o *Tropilaelaps* spp.
- 4) Lleve a cabo una segunda inspección visual en la jaula de la reina, las nodrizas, los contenedores de transporte y otros materiales de embalaje a la mayor brevedad posible después del período de congelación.

Nota: Un protocolo similar se puede aplicar para envíos de abejas obreras.

2.4. MUESTREO DE ADULTOS DEL PEC

Para muchos experimentos es necesario recoger escarabajos en el campo. *Aethina tumida* puede ser

muestreado no sólo directamente de las colonias de abejas (Neumann y Hoffmann, 2008), sino también de su entorno (Pettis y Shimanuki, 2000). Varias técnicas pueden ser utilizadas para el muestreo de PEC.

2.4.1. RECOLECCIÓN MANUAL

Para la recolecta manual de adultos de PEC, muchos dispositivos son factibles de utilizar (por ejemplo, aspiradores de batería) y se pueden modificar para la recolección de PEC. Sin embargo, los más fáciles y más comunes son los aspiradores de boca (por ejemplo Spiewok et al, 2007; 2008; Neumann y Hoffmann, 2008, Fig. 6), que son ampliamente utilizados para la recolección de insectos en general. Tales aspiradores consisten en un recipiente para la muestra y dos mangueras conectadas al contenedor. La manguera más larga permite la succión conectando el recipiente con la boca del colector, mientras que la manguera más corta sirve para guiar el objetivo hacia el contenedor. La manguera más larga está cubierta con tela de malla para evitar la aspiración accidental de la muestra. Dado que este método es muy fácil y no requiere preparativos previos, se recomienda para cualquier tipo de recolección de PEC, pero sobre todo para la recolección en las explotaciones apícolas que se visita una sola vez y en donde ninguno de los términos siguientes se pueden aplicar.

Nota: Es altamente recomendado etiquetar con claridad las dos

mangueras para evitar la ingestión accidental de PEC o abejas durante la recolección.

2.4.2. TRAMPAS EN COLONIAS.

Varios dispositivos están disponibles para atrapar adultos de PEC dentro de las colonias. Todos ellos tienen entradas las cuales permiten entrar los PEC pero evitan el ingreso de las abejas. La mayoría de esas trampas usan aceite mineral o vegetal como agente letal. Hay trampas disponibles para todas las posiciones en la colmena: debajo de la madera de fondo, sobre la tabla de fondo, en los bastidores, como repuesto de un bastidor, entre extremos superiores de bastidores y a la entrada de la colmena. Dos dispositivos muy similares ampliamente usados son el 'Beetle Eater ®' y el 'Beetle Blaster®'. Ambos están diseñados para localizarse entre dos bastidores, ya sea en el fondo de la cámara de cría o en las alzas. La mayoría de estos mecanismos intra-colmenares están diseñados para matar PEC y sólo permitir una medida aproximada para el rango de infestación de PEC en las colonias. Para coleccionar escarabajos vivos para estudios de laboratorio, se recomienda una técnica muy simple para atrapar PEC adultos dentro de la colonia usando tiras diagnósticas (Schäfer et al., 2008; 2010a). Estos dispositivos están hechos de tiras de plástico corrugado (75 x 500 x 4 mm) las cuales crean una serie de túneles estrechos donde se alojan los escarabajos, pero previenen el acceso

de las abejas. Las tiras de diagnóstico tienen una eficacia de captura promedio del 30% del total de la población de PEC en una colonia, y provee un diagnóstico cuantitativo fácil, rápido y barato para estimar el tamaño de la población en el campo (Schäfer et al., 2008). Además, a la luz de la tasa de detección tan eficiente (96,3%), estas tiras de diagnóstico también son una herramienta adecuada para detectar colonias en áreas donde PEC no ha sido reportada aún (Schäfer et al., 2010a).

Esto fomentará una respuesta rápida de saneamiento para prevenir la propagación de PEC dada la introducción accidental. Por favor referirse al caso de prevención exitosa de la difusión de Portugal (Muirias, 2005) y a las consecuencias de detecciones tardías en Australia / EE.UU. (Neumann y Ellis, 2008). El uso es como sigue (Schäfer et al, 2008; 2010a):

1. Colocar una tira de diagnóstico en el fondo de la colmena deslizándola a través de la piquera (Fig. 7).
2. Deje las tiras en las colmenas por dos noches para dar tiempo a PEC de encontrar los refugios.
3. Retire las tiras tirando de ellos hacia fuera rápidamente y agite los PEC encerrados dentro de bandejas para contar o para la recolección con un aspirador de boca u otros dispositivos de succión (ver sección 2.4.1.).

Nota: Se debe tener cuidado con respecto tanto a los residuos del tablero inferior (las tablas del fondo deben estar limpias para evitar que

quede espacios entre la tira y la madera que permita que los escarabajos se escondan debajo de ellas y no dentro; así como con las condiciones climáticas. Por ejemplo, en condiciones de frío muestrear PEC en racimos de abejas, donde los escarabajos se agrupan con las abejas en busca de calor (Pettis y Shimanuki, 2000; Schäfer et al., 2011).

2.4.3. TRAMPAS FUERA DE COLONIAS

2.4.3.1. CAPTURA DE PEC ADULTOS

Una variedad de diferentes trampas y cebos se han utilizado para capturar PEC adultos fuera de la colmena (Elzen *et al.*, 1999; Arbogast *et al.*, 2007; Benda *et al.*, 2008; Buchholz *et al.*, 2008; Neumann y Hoffmann, 2008, de Guzmán *et al.*, 2011). Cubeta de plástico con agujeros de 7 cm de diámetro cubiertas por tela metálica de 8 mallas (agujeros lo suficientemente grandes como permitir la entrada de los escarabajos adultos) se han utilizado para atrapar PEC fuera de las colonias. La selección de un cebo atractivo es fundamental para la captura de PEC fuera del entorno de la colmena. Si bien una mezcla de miel, el polen y abejas adultas muestra el mayor número de capturas en el campo (Elzen *et al.*, 1999), las frutas no son cebos eficientes (Buchholz *et al.*, 2008). Arbogast *et al.* (2007) utilizaron masa de polen inoculado con la levadura *Kodamaea ohmeri* (Benda *et al.*, 2008) como cebo en trampas hechas de secciones de tubo de PVC de 25,5 cm

con una tapa extraíble en cada extremo. Dos aberturas cubiertas con pantalla de 4 mallas permiten que escarabajos entren en la trampa.

Un cono invertido de tela de 18 mallas, que se coloca justo debajo de las piqueras, canaliza PEC hacia el fondo a través de un pequeño agujero en el vértice del cono. Trampas de este tipo situado a 46 cm (misma altura que las entradas de colonias) muestran las cifras de captura más altas del campo. Aunque estas trampas generalmente no cogen un alto número de escarabajos, estas trampas permiten observaciones continuas que proporcionan una medida relativa de la migración de *A. tumida* (de Guzmán *et al.*, 2011).

2.4.3.2. CAPTURA DE LARVAS DE PEC

Hasta donde sabemos, la trampa para larvas errantes (montado en la entrada de la colonia) de Arbogast *et al.* (2012) es la única trampa publicada que captura larvas errantes a una escala de colonia. La trampa consta de dos partes construidas de plástico acrílico de tres octavos de pulgada (0,95 cm) que se mantienen unidos por asas. La parte inferior de la trampa es impermeable y se llena a la mitad con una solución de detergente y agua. La parte superior intercepta las larvas y está cubierto, excepto por un espacio de 3 mm a nivel de la placa de fondo. Las larvas entran por esta perforación y cae a través de una pantalla (de 18 mallas de acero inoxidable con aberturas de 2 mm). La pantalla evita

que las abejas caigan en la solución de detergente. La trampa está unida a la tabla del fondo por dos extensiones de 18 cm en la parte superior. Recomendamos la trampa principalmente como una herramienta de investigación de la dinámica de poblaciones de PEC a nivel de colonia.

Nota: Por favor, consulte las publicaciones originales para un dibujo de la trampa.

2.4.4. Almacenamiento y envío de muestras PEC

Las Condiciones de almacenamiento y transporte, obviamente, dependen de los análisis posteriores planificados (por ejemplo, para análisis virales ver el artículo en BEEBOOK por de Miranda *et al.*, 2013). Para el análisis morfológico, las muestras se deben preservar de inmediato en etanol al 70-95%. Esto asegura que los especímenes sean adecuados para este tipo de análisis, por lo menos un par de meses, y a menudo por mucho más tiempo. Alternativamente, para un uso posterior en el análisis del ADN, las muestras se deben almacenar en un congelador a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ para ralentizar la degeneración de ADN en los tejidos. Con este método el ADN permanece viable durante varios años, pero para seguir siendo viables durante más tiempo, las muestras deben almacenarse a -70°C (para más detalles consulte la sección 9.3). En 'Almacenamiento de adultos muertos' en la revista BEEBOOK en métodos diversos de Human *et al.*, 2013). Si se envían las muestras PEC para fines

científicos, es importante tener en cuenta que ningún material vivo debe ser enviado para evitar una mayor distribución de esta plaga de las abejas. Los escarabajos adultos o larvas deben primero sacrificarse por congelación (una noche) o por inmersión del espécimen en etanol al 70-95%, y se envían en un recipiente sellado.

2.4.5. Diagnósticos moleculares.

A continuación describimos y referimos herramientas para el uso de técnicas de biología molecular modernas para diagnosticar PEC. Éstas también pueden ser usadas para adquirir conocimientos acerca de la introducción(es) de este escarabajo desde África hacia rangos actuales (Lounsberry *et al.*, 2010). Esto aclarará las poblaciones de la plaga y las vías de invasión, y contribuirá al conocimiento de cómo este parásito se expande en nuevas poblaciones (Lounsberry *et al.*, 2010). Estas herramientas también permitirán futuros estudios para comprender mejor el comportamiento de PEC, su salud y otros aspectos de su biología. Aquí cubrimos sólo las técnicas de ADN.

2.4.5.1. EXTRACCIÓN DE ADN.

Para análisis rápidos de ADN, incluyendo genotípicos con los marcadores descritos a continuación, es necesario:

1. Coloca una pata de un PEC adulto en un tubo de centrifugado de 1.7 ml.
2. Triturar con un mortero desechable.
3. Añadir 200 µl de solución de Chelex® -100 al 5 % (Bio-Rad Corp.; Walsh *et al.*, 1991).
4. Centrifugar la solución.
5. Incubar por 15 min. a 95 °C y 30 min. a 55 °C antes de enfriar.
6. Remover alícuotas de 1 µl de esta solución, el cual será suficiente para análisis genéticos.

Cuando se remuevan las alícuotas, se debe tener cuidado de evitar incluir las resinas de Chelex®, ya que esto puede inhibir las siguientes etapas.

Métodos de extracción alternativos para uso de ADN a largo plazo (por ejemplo, el método 'CTAB' y el kit comercial DNEasy de Qiagen) son también efectivos y están descritos en detalle en la revista BEEBOOK en métodos moleculares por Evans *et al.* (2013). Extracciones de la pata son preferidos ya que esto evita la alta pigmentación de los élitros, lo cual puede inhibir ensayos y procedimientos enzimáticos.

2.4.5.2. ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL

Las mitocondrias, un organelo maternalmente inherente, proveen numerosos polimorfismos genéticos que pueden ser útiles para inferir fuentes de nuevas poblaciones de PEC y para algunos estudios de poblaciones a pequeña escala. Las secuencias de

ADN mitocondrial (ADNmt) para esta especie ha sido analizada para el gen que codifica la enzima Citocromo oxidasa I, un gen frecuentemente usada para codificar el ADN en 'código de barras' (identificación a nivel de especie y a nivel de población) en insectos. Evans *et al.* (2000) describe dos primers de oligonucleotidos, AT1904S (5'-GGTGGATCTTCAGTTGATTAGC-3') y AT2953A (5'-TCAGCTGGGGGATAAAATTG-3') que amplifica una región ca. de 1,000 pares de bases de la mitocondria de PEC. Éstas pueden amplificarse y analizarse como sigue:

1. Amplificar usando un protocolo térmico cíclico de:
 - 93 °C (1 min.),
 - 54 °C (1 min.),
 - 72 °C (2 min.) para 35 ciclos,
 - Seguido por un paso de elongación de 5 min. a 72 °C.
2. Preparar un gel de agarosa al 1% en buffer 1X TAE mezclando:
 - 2.1. 10X de solución de 48.4 g de base Tris (hidroximetilaminometano),
 - 2.2. 11.4 ml de ácido acético glacial (17.4 M),
 - 2.3. 3.7 g de EDTA, sal disodio.
 - 2.4. Llevar a un volumen final de 1 L con agua desionizada
 - 2.5. Mezclar 1 g de agarosa/100 ml de gel buffer.
 - 2.6. Calentar en microondas dentro de un matraz Erlenmeyer por 1 min.
 - 2.7. Mezclar los líquidos.
 - 2.8. Calentar en microondas nuevamente por 1 min.

La solución debe alcanzar una rápida ebullición y estar completamente disuelto.

2.9. Dejar enfriar por 10 min.

2.10. Agregar 1 µL de bromuro de Etidio (10 mg/ml) por 100 ml de volumen de gel.

3. Preparar tampón de carga de sacarosa mezclando:

- 4 g sacarosa,
- 25 mg de azul de bromofenol o cianol xileno (0.25%),
- Aforar con agua destilada hasta 10 ml.

4. Mezclar 3 µl de cada muestra con 2 µl de tampón.

5. Cargar cada muestra en una placa individual.

6. Incluir una escala estándar de ADN en una placa junto a los productos (por ejemplo, la escala de 100 pares de bases de Invitrogen).

7. Electroforizar los productos a ca. 100 V/25 amperes (dependiendo del aparato del gel) en un equipo de perforación horizontal de gel.

8. Visualizar bajo luz ultravioleta.

Debe haber una sola banda fuerte a ca. 1,000 pares de bases.

9. Purificar el producto resultante (ej. Kit de Purificación de PCR, Qiagen).

10. Secuenciar para cada dirección vía secuenciación estándar de Sanger dideoxy y los primers de amplificación.

Las secuencias pueden alinearse contra numerosos haplotipos de PEC en bases públicas de secuencias (por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=aethina+tumida>) para determinar

novedad o la colocación en un haplotipo descrito.

2.4.5.3. Análisis microsatelital

Los microsatélites son regiones que contienen repeticiones en tándem de repeticiones 1-6- nucleótidos que se han generalizado en los genomas eucariotas, incluyendo aquellos de PEC (véase Evans *et al.*, 2013 para más detalles). Por ejemplo, un microsatélite CA12 tiene 12 nucleótidos contiguos 'CA' en medio del ADN no repetitivo. Estas regiones son inherentemente inestables, añadiendo y recortando unidades durante la replicación celular y la recombinación. Como resultado, los individuos a menudo difieren entre sí en sus genotipos en estos loci, y ofrecen una poderosa herramienta para la descripción de las poblaciones y el flujo de genes. Varios loci de microsatélites se han descrito para la PEC (Evans *et al.*, 2008) y estos loci han demostrado ser útiles en el mapeo de la circulación de PEC en las Américas (Lounsberry *et al.*, 2010). A continuación se muestra un protocolo para análisis genotípicos utilizando dinucleótidos (CA) microsatelitales.

1. Preparar 5 µl de mezclas de reacción para cada muestra y primer que contiene:

- 1 Unidad de polimerasa Taq
- ADN con tampón 1X apropiado (Invitrogen),
- 1 mM de mezcla de dNTP,
- 2 mM de MgCl₂ añadida ,

- 0,2 M de cada uno hacia adelante y cebador inverso ,
- 0,08 M del Cebador final de la etiqueta en el extremo 5 ' con FAM HEX o fluoróforos (ordenados de Invitrogen, u otro proveedor).

2. Llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un programa de ciclos de:

- 96 ° C durante 2 min.,
- 3 ciclos de 96 ° C durante 30 seg.,
- 60 ° C durante 30 seg. (-1 ° C / ciclo), 65 ° C durante 1 min., seguido por 35 ciclos de
- 96 ° C durante 30 seg.
- 56 ° C durante 30 seg. ,
- 65 ° C durante 1 min. , y
- una extensión final a 65 ° C durante 2 min.

3. Añadir 1 µl de cada producto de PCR (diluido 1:20) a 10 µl formamida que contiene un tamaño estándar 1X LIZ (Applied Biosystems, ABI).

4. Determine el tamaño de producto etiquetado a través de una carrera en gel capilar usando una máquina ABI 3730 DNA y software GeneMapper (por ejemplo, la versión 3.7, ABI)

5. Llevar a cabo los análisis en la población genética con los programas Genalex (Peakall y Smouse, 2006), la estructura (Falush *et al.*, 2007) u otros programas de software diseñados para evaluar los datos de múltiples alélicas, ver sección 3.3.2. en microsatélites de ADN de la revista BEEBOOK sobre los métodos para la caracterización de las

subespecies y ecotipos de *Apis mellifera* (Meixner *et al.*, 2013).

2.4.5.4. Cribado de PEC en escombros de la colmena.

Dado que los adultos de PEC muestran un comportamiento críptico, son muy difíciles de detectar en las colmenas. Por otra parte, los escarabajos son altamente migratorios (Spiewok *et al.*, 2008; Neumann *et al.*, 2012) y pueden haber salido de la colmena antes de la inspección. Por lo tanto recomendamos el siguiente método molecular para monitorear las colmenas importadas en busca de PEC (modificado después de Ward *et al.*, 2007):

1. Extraer el ADN de muestras de escombros de la colmena :
 - 1.1. Coloque ~ 10 g de muestras de desechos en recipientes de molienda del molino (Kleco, Visalia, California, EE.UU.).
 - 1.2. Añadir tampón de lisis CTAB (Sigma) (tampón de pH 12 % de fosfato de sodio 8.0, 2 % CTAB, NaCl 1.5 M), (20 ml) que contenga 1 % antiespumante B (Sigma) en cada recipiente.
2. Sellar recipiente.
3. Carguese en el molino Kleco.
4. Conecte durante 2 min. a toda velocidad.
5. Verter el lisado procedente de cada recipiente en un tubo Falcon de 50 ml.
6. Girar los tubos a 4000 g durante 5 min.
7. Retire los 2 ml del lisado aclarado.
8. Colocar en un tubo de microcentrífuga de 2 ml.

9. Haga girar durante 3 min. a 10.000 g.
10. Transferir lisato clarificado (1 ml) a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 ml.
11. Añadir 250 µl de tampón de lisis B (Promega) y 750 µl de tampón de precipitación (Promega).
12. Mezclar en Vortex.
13. Girar los tubos a 10.000 g durante 10 min.
14. Transferir el extracto claro (750 µl) a un tubo de microcentrífuga nuevo.
15. Añadir 50 µl de perlas del kit MagneSIL™ y 600 µl de isopropanol.
16. Incubar los tubos a TA durante 10 min.
17. Extraer el ADN de cada muestra utilizando el procesador robótico de partículas magnéticas (Kingfisher ml, Thermo Labsystems) en conjunto con el sistema de purificación de ADN Promega para el kit de alimentación siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.4.5.5. Trabajo genético a futuro con el Pequeño Escarabajo de la Colmena.

El escarabajo adecuado para los estudios genómicos de olfacción (encontrar colonias para explotar o encontrar otros PEC para el apareamiento), la reproducción y simbiosis con los hongos y otros microbios. Por lo tanto, los análisis de genómica y transcriptómica (secuenciación de alto rendimiento de los genes expresados) de los rasgos del PEC están seguros de seguir. Los métodos para estos análisis serán idénticos a los utilizados anteriormente para las abejas de miel y otros insectos, y estos métodos se describen

en el documento BEEBOOK en métodos moleculares (Evans et al., 2013).

3. Técnicas para investigación experimental.

El trabajo experimental con el PEC básicamente se pueden dividir en dos categorías principales: los experimentos de laboratorio y de campo. La siguiente parte de este manual incluye recomendaciones y protocolos de los métodos aplicados con anterioridad para diferentes investigaciones.

3.1. Técnicas de laboratorio

3.1.1. El mantenimiento del PEC adulto en el laboratorio y su transporte.

3.1.1.1. Dieta

Los pequeños escarabajos de la colmena se alimentan y reproducen en la miel, el polen y más rápidamente, en la cría de abejas (Lundie, 1940; Ellis et al, 2002b). Sin embargo, una dieta de cría de abejas por sí sola es impráctica, debido a que: (1) se necesitan muchas colonias de producir suficientes crías para mantener un programa de crianza de PEC, especialmente uno grande; (2) la obtención de cría de una colonia es de naturaleza destructiva (3) el uso de cría no es económico (un bastidor de cría completo puede ser fácilmente consumida por la descendencia de 10-15 parejas; Neumann et al , 2001a).

Aunque otros Nitidúlidos a menudo se crían en frutas (ver Peng y Williams, 1990b), la cría de PEC en las frutas por sí solas no es optativo debido a la baja fertilidad del escarabajo con tal dieta

(Ellis et al, 2002b; Buchholz et al, 2008). También se recomienda evitar las dietas artificiales (como el propuesto para la cría de varias especies de Nitidúlidos, Peng y Williams, 1990a), debido a los costos generalmente altos de las dietas artificiales, la dificultad que se tiene en la obtención de los ingredientes, y para mantener la dieta de PEC tan natural como sea posible. Una dieta exitosa semidefinida consiste en el polen seco granulado, miel, y un suplemento de proteína de abejas (por ejemplo, Brood Builder™, Dadant and Sons, Inc.; Hamilton, IL, EE.UU. o Booster bee Protein Feed™, Beeequipment Sudáfrica, Mike Miles) mezclados en una relación volumétrica de 1:1:2. La proporción exacta varía en función de la cantidad de humedad de la miel:

Para hacer la dieta,

1. Añadir en una batidora grande:
 - 2000 ml de polen,
 - 2000 ml de miel,
 - 4000 ml de suplemento proteico.
2. Mezclar durante unos 20 min. hasta que la mezcla tenga una consistencia firme flexible. Esta receta es suficiente para 20 dosis de 400 g de dieta.
3. Si es pegajosa, añadir suplemento de proteína a la mezcla gradualmente hasta que ya no lo sea.

La dieta no debe ser pegajosa al tacto debido que larvas alimentadas en una dieta pegajosa son capaces de trepar por superficies verticales (sus cuerpos se vuelven pegajosos) y son difíciles de recapturar.

4. Proporcionar agua *ad libitum*.

3.1.1.2. Condiciones de Transporte y Mantenimiento del PEC.

Siempre que se mantengan o transporten PEC adultos de forma individual o en masa con fines experimentales, se recomienda además de suministrar agua *ad libitum*, evitar la exposición directa al sol, mantener las temperaturas en general baja (TA) y permitir la suficiente circulación de aire, ya que las condiciones de almacenamiento inadecuadas pueden dar lugar rápidamente a la muerte (Peter Neumann, datos no publicados).

3.1.1.2.1. Mantenimiento de colonias.

1. Proporcionar contenedores de vidrio tratado al autoclave con alimentos (ver 3.1.1.1.) y agua *ad libitum* (o no en caso de que se requiere evitar alimentación).
2. Colocar los adultos de PEC en envases de vidrio.
3. Ajuste las cantidades de PEC de acuerdo a las necesidades de experimentación (individuales, parejas, grupos).
4. Almacenar los envases a temperatura ambiente en la oscuridad.

3.1.1.2.2. Mantenimiento individual.

1. Proporcionar 0,5 g de alimento (ver sección 3.1.1.1.) En tubos de reacción Eppendorf® estándar de 1.5ml.

2. Colocarlos en bandejas de laboratorio y perforar las tapas con una aguja (3-4 pequeños agujeros) para permitir la circulación del aire y la alimentación.

3. Coloque PEC individuo adulto en los tubos Eppendorf ® con pinzas y sellarlos.

4. Almacenar las placas a temperatura ambiente en la oscuridad.

5. Proporcionar a cada tubo solución de miel:agua en proporción 1:1 diariamente, pipeteando cuidadosamente a través de las perforaciones.

Notas: El escarabajo se puede mantener durante un máximo de 8 semanas en la oscuridad a temperatura ambiente. Tenga cuidado en sellar contenedores rápidamente para limitar el escape de PEC. Para habilitar la activación de ovario en hembras, utilizar alimentos ricos en proteínas (véase la sección 3.1.1.1.) En lugar de la solución miel: agua en una proporción de 1:1. Asegúrese de que el agua siempre sea proporcionada *ad libitum* para prevenir la deshidratación.

3.1.3. Técnica de cría

3.1.3.1. Procedimiento de crianza.

El procedimiento de crianza está resumido en el Cuadro 1.

1. Llevar a cabo todas las manipulaciones de laboratorio bajo una jaula entomológica para evitar el escape de adultos.
2. Coloque 25 parejas de adultos sexualmente maduros (véase la sección 3.1.4.) En un recipiente de plástico de 3 l con ~ 400 g de dieta para PEC. Ningún otro sustrato, incluidas celdas de cera o agua debe ser colocada en el contenedor de apareamiento, debido a que la inclusión de materiales adicionales dificulta la futura colección de larvas. Cada contenedor debe ser cubierto con una tapa perforada.
3. Los contenedores de apareamiento deben ser mantenidos a 25 °C, >80% de humedad relativa, sin luz, en incubadora por 14 días para promover el apareamiento y ovoposición.

Una alta humedad relativa es necesaria ya que el rango de eclosión de los huevos de PEC está positivamente correlacionado con la humedad (Jeff Pettis, información no publicada citada en Somerville, 2003).

Cuadro 1. Sumario de procedimientos para cría masiva de PEC.

Número	Descripción	Mantener a	Duración
1	50 adultos con 400 g en un contenedor plástico (3 lts de volumen)	25 °C, oscuridad, >80% humedad.	2 semanas.
2	Remover adultos del contenedor; dejar huevos, larvas y alimento remanente.	25 °C, oscuridad, >80% humedad.	2 semanas.
3	Larvas maduras + alimento colocado en una bandeja acanalada.	25 °C, oscuridad, humedad suficiente para evitar la disecación de las larvas.	>99% de la larvas abandonarán la comida <5 días y pueden ser colectadas.
4	Añadir 80 ml larvas encima de ~1.75 lts suelo arenoso en un recipiente de plástico (25,5 cm de altura, 15 cm de diámetro, 3,7 l de capacidad); añadir otro ~1.75 l arena para enterrar las larvas.	25 °C, luz constante por una semana, después sin luz.	20 días.
5	Coloque la trampa de embudo en el recipiente de pupación.	25 °C, >80% humedad, luz completa.	En 2-5 días, >80% de adultos estarán en el contenedor superior.
6	Remover la trampa de embudo y guardas los escarabajos adultos en el contenedor superior.	25 °C, >80% humedad, luz opcional.	Los adultos sobrevivirán >8 semanas. La mortalidad de los adultos incrementará con el tiempo.

4. Después del periodo de 2 semanas de ovoposición, remover los adultos de la vieja dieta con un aspirador, dejando los huevos y larvas.
5. Transferir los adultos a nuevos contenedores de apareamiento con

400 g de dieta para continuar con el programa de cría.

La dieta de PEC no debe ser reusada dado que el sustrato viejo promueve el crecimiento de moho y hongos y pueden promover el incremento en la mortalidad de larvas y pupas de escarabajo.

6. Mover los contenedores de apareamiento, de los cuales fueron removidos los adultos (que contienen el sustrato viejo, huevo y larvas en desarrollo) a la incubadora por 2 semanas bajo condiciones similares.
9. Colocar un segundo contenedor debajo de la perforación para coleccionar las larvas que se caen.
10. Mantener los contenedores a 25 °C, 40% de humedad, y en la oscuridad por 5 días.

De este modo se les permite desarrollarse libremente en ausencia de los escarabajos adultos.

7. Tras las dos semanas de desarrollo larval, hacer una perforación (5 cm) en un extremo, alejado del alimento y las larvas, en el fondo del contenedor. Levantar crestas (2 cm) espaciadas 5-8 cm una de otra a lo ancho del contenedor.

Las larvas que se desarrollan en la dieta recomendada para escarabajos no son pegajosas y no son capaces de escalar las paredes del recipiente (=enfoco de crianza seca; Neumann and Härtel, 2004). Cualquier humedad agregada en esta parte del procedimiento permite a la larva escapar de la charola.

8. Las larvas maduras (etapa ambulatoria, Lundie, 1940) se vuelven positivamente fototácticas, alejándose de la dieta en busca de suelo y caen por la perforación en el extremo opuesto de la charola. Las crestas en la charola previenen que el alimento se disperse sobre la bandeja y se caiga por el hoyo.

Colocar las bandejas de larvas en la oscuridad promueve que la larva se aleje de la dieta cuando termina de alimentarse. Esto aprovecha las características biológicas de las larvas, las cuales normalmente dejan las colonias de abejas durante la noche. La larva permanecerá escondida en la dieta si es mantenida bajo luz constante.

11. Colectar las larvas ambulantes diariamente de la segunda charola tan pronto como se vean alejándose del alimento (usualmente a los 4 días).

Las larvas colectadas están listas para pupar en el suelo.

12. Para facilitar la pupación, llenar hasta la mitad contenedores plástico (contenedores de pupación, 25.5 cm de alto, 15 cm de diámetro, 3.7 lts de capacidad) con 1.75 lts de suelo arenoso autoclavado (ver la sección 3.1.6.2.) con una humedad $\geq 10\%$.
13. Agregar alrededor de 2000 larvas errantes (~80 ml de larvas a 25 larvas/ml) a un contenedor de pupación y enterrar las larvas con 1.75 lts de arena húmeda adicional.

Este número de individuos agregados a la cámara parece crear una densidad óptima de pupación en el volumen de arena usado (aproximadamente 1.9 ml suelo/pupa). Si demasiadas larvas son agregadas, aquellas que no pueden crear puparios, volverán a la superficie y tratarán de salir del contenedor.

14. Los contenedores de pupas deben ser mantenidos a 25 °C, >80% de humedad y luz constante por 1 semana, seguido por oscuridad constante por 13 días hasta que los adultos comiencen a emerger.

Notas para los contenedores de pupas:

- Use suelo arenoso cuando se críen PEC debido a que dicho suelo es más fácil de tamizar para recuperar los adultos. Ver Ellis *et al.* (2004c) para más detalles.
- El suelo debe ser descartado después de un uso o esterilizado ya que existe un incremento en la mortalidad de la pupa cuando se reutiliza suelo sin esterilizar.
- Nunca confiar en que las larvas se entierran ellas mismas de manera natural. Si se ponen en la superficie del suelo, algunas larvas pueden no cavar en el sustrato por más de dos semanas, disminuyendo el número de adultos emergidos. Las larvas enterradas manualmente emergen en un periodo más corto de tiempo. Las larvas permanecerán enterradas si los contenedores de pupación son expuestos a la luz constante. Las larvas

errantes pueden arrastrarse hasta la superficie del suelo si los contenedores son puestos en un cuarto oscuro desde el principio, aumentando el tiempo



Fig. 8. Cámaras de pupación para el Pequeño Escarabajo de la Colmena con una trampa de embudo para adultos ajustada en la boca. Hay un cono invertido en el medio por el que los escarabajos suben de la cámara de pupación (contenedor con suelo) para acceder a la cámara de adultos (arriba). Los adultos pueden ser alimentados con dilución de miel asperjada a través de los orificios de ventilación en el contenedor de más arriba.

Fotografía: James Ellis.

de emergencia de los adultos.

- La profundidad del contenedor parece ser más importante para el éxito de la pupa que el ancho.

15. Veinte días después de enterrar a las larvas en los recipientes de pupación, coloque un recipiente similar invertido sobre el de pupación (trampa para escarabajo adulto) con un embudo apuntando hacia arriba en la boca del recipiente superior (Fig. 8).

La trampa debe estar ventilada.

16. Cubra la boca del embudo con una pequeña tira de malla de nylon (1 x 3 cm) asegurada con cinta adhesiva. Los escarabajos adultos emergen del suelo, suben a través del embudo en el recipiente superior, de donde no son capaces de volver a bajar. La malla de nylon desalienta los adultos a que regresen al contenedor de pupación.

17. Asperjar una mezcla 1:1 (en volumen) de miel:agua con un atomizador manual a través de los orificios de ventilación en el recipiente para alimentar a los adultos. Pulverizar suficiente solución para humedecer las paredes laterales de los contenedores, pero no demasiado para promover la lixiviación de la solución en el fondo del recipiente.

18. Mantener a los adultos a 25 ° C y > 80 % de humedad bajo luz plena. La luz estimula los adultos a moverse en el recipiente superior.

19. Después de 2-5 días, más de 80 % de los adultos emergidos estarán presentes en el recipiente superior.

En este tiempo, invierta el recipiente de adultos, retire el embudo del recipiente superior y fije firmemente la tapa.

Ya que los adultos en ocasiones permanecen por debajo de la superficie del suelo sin emerger (hasta 35 días, Muerrle y Neumann, 2004), pueden ser tamizados de la arena y recogerse utilizando un aspirador. Pueden mantenerse vivos en estos contenedores por más de 8 semanas dándoles jarabe de miel con un atomizador como se describió previamente (véase el paso 17).

Nota: El adulto del PEC puede alcanzar madurez sexual antes de la emergencia, por lo que pueden aparearse antes de salir a la superficie. Por lo tanto, para cría de programas destinados a adultos sin apareamiento se debe utilizar los métodos de cría individuales que se describen a continuación.

3.1.3.2. Crianza individual

1. Rellene tubos de Eppendorf ® estándar de 1,5 ml con tierra esterilizada en autoclave hasta un tercio (ver apartado 3.1.3.1.). Coloque en bandejas de laboratorio y perforo las tapas con aguja (3-4 pequeños agujeros) para permitir circulación aire.
2. Recoger larvas ambulantes del programa de cría (véase la sección 3.1.3.1.).
3. Introducir suavemente una larva individualmente a cada tubo con pinzas.

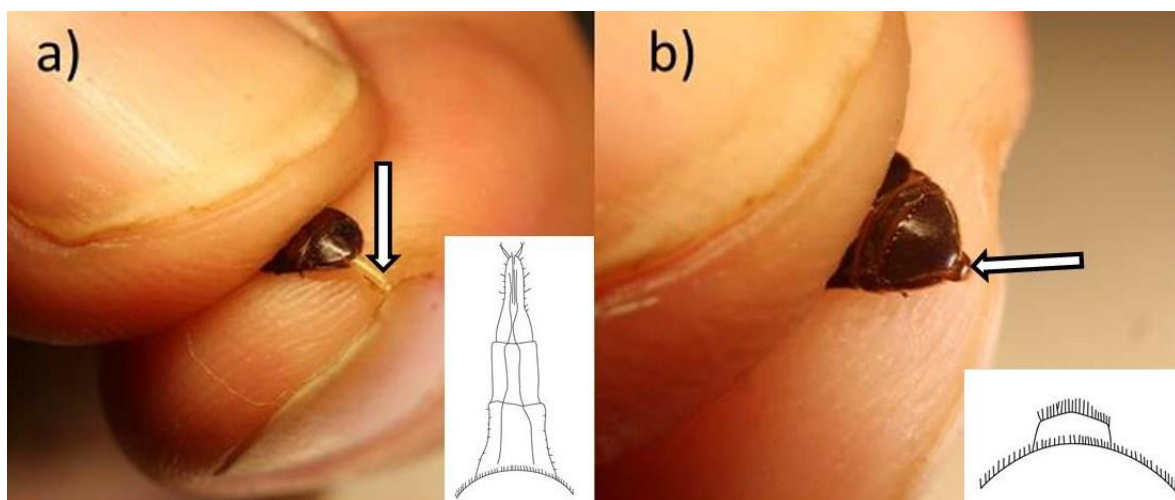


Fig. 9. Sexado del Pequeño Escarabajo de la Colmena. Presionar el abdomen causará que las hembras extiendan su ovopositor (señalado en a) y que el macho pronuncie su 8vo terguito (señalado en b). Los esquemas en ambas imágenes fueron tomados de Schmolke, 1974 y muestran el ovopositor femenino y el 8vo terguito de los macho en detalle. Esquemas: Kay Weigel (Universidad de Florida). Fotografía: Marc Schäfer.

4. Cubra las larvas con otro tercio de suelo de pupación (véase la sección 3.1.3.1.).
5. Cerrar los tubos.
Siga las instrucciones para las condiciones de almacenamiento de las bandejas en las incubadoras hasta la emergencia del adulto (véase el apartado 3.1.3.1.).
6. Transfiera los nuevos adultos (Fig. 3c) a tubos individuales frescos.
7. Proporcione solución de miel:agua (1:1, volumen) *ad libitum* con una pipeta .

El escarabajo se puede mantener durante un máximo de 8 semanas en la oscuridad a temperatura ambiente.

Notas: Si cualquier otra dieta se usa para criar o mantener PEC (por ejemplo, para poner a prueba el éxito reproductivo (Ellis et al, 2002b; Buchholz et al, 2008)), la comida debe

congelarse primero, especialmente si ha sido recolectada en el campo (por ejemplo frutas) para matar cualquier otro huevo o larva de insecto que pueden estar presentes.

3.1.4. Determinación del sexo.

A menudo es necesario determinar el sexo del individuo con fines experimentales o de supervisión. El PEC parecen tener una proporción de sexos con mayoría de hembras, tanto en el campo como en cría de laboratorio (campo: Estados Unidos: Ellis et al, 2002a, África: Schmolke, 1974; Spiewok y Neumann, 2012; Australia: Spiewok y Neumann 2012; **laboratorio:** Neumann et al., 2001a; Ellis et al, 2002b; Muerrle y Neumann, 2004).

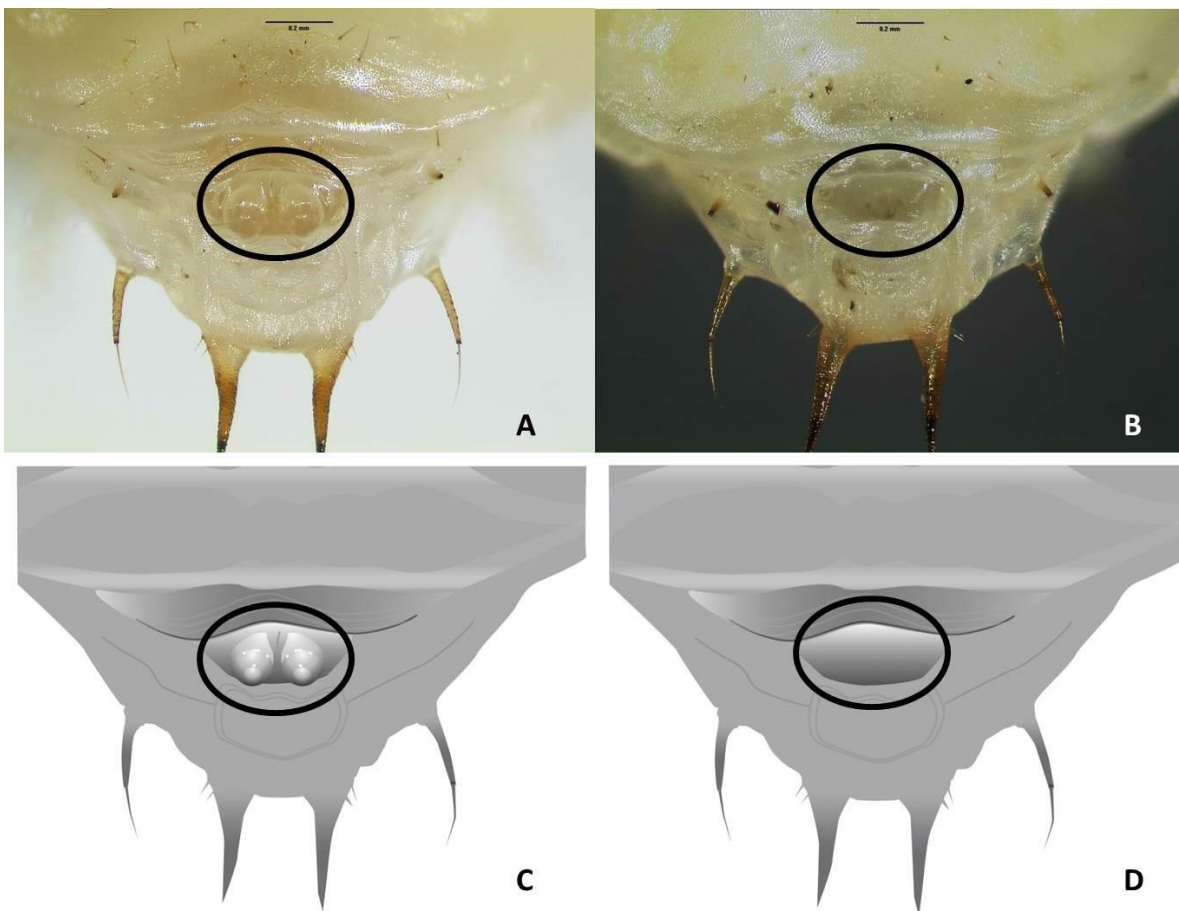
3.1.4.1. Determinación del sexo en adultos

El método más sencillo para sexar adultos ha sido desarrollado por Schmolke (1974; Fig. 9).

1. Sujete el escarabajo de manera que pueda ver al abdomen en vista ventral.
2. Apriete suavemente el abdomen del escarabajo.

3. Exprimir el abdomen hará que la hembra extienda su ovopositor y el macho sobresalte el octavo terguito (Fig. 9).

Las hembras extienden fácilmente su ovopositor sin mucha presión. Si se aplica mucha presión y no hay respuesta, se trata de un macho. Es más difícil de hacer que los escarabajos masculinos proyecten su octavo tergito así que se debe tener



10. Sexado de pupas del pequeño escarabajo de la colmena. A. y C. muestran el extremo posterior, en vista ventral, del abdomen de una hembra. Las dos protuberancias bulbosas están circuladas. B. y D. muestran el extremo del abdomen en vista ventral de un macho. Las protuberancias bulbosas están ausentes en el área circulada. A. y B. se muestran con el contraste aumentado para resaltar el área genital. Esquemas: Kay Weigel, Universidad de Florida; fotografías: Lyle Buss, Universidad de Florida.

cuidado para evitar dañar el escarabajo.

Si se hace con cuidado, el sexado no afectará los adultos de manera adversa.

Nota: Al determinar el sexo de muchos escarabajos adultos (Ellis *et al.*, 2002b; Spiewok y Neumann, 2012), se recomienda que aminore su velocidad, colocándolos en un frigorífico o en un vial en hielo durante al menos 5 min (hasta 10 min.).

3.1.4.2. Determinación del sexo en pupas

El sexo de las pupas PEC se puede determinar visualmente sin la necesidad de manipular el individuo (fig. 10).

1. Observe el lado ventral de la sección distal del abdomen.
2. Busque dos proyecciones bulbosas en esta ubicación.

Si está presente (Fig. 10a), es una pupa femenina. Estas proyecciones están ausentes en pupas macho (fig. 10b).

3.1.5. Técnicas de marcaje

Para fines experimentales a menudo se requiere un cohorte específico o marcaje individual de escarabajos, por ejemplo, para estudios de comportamiento (ver el artículo BEEBOOK en métodos conductuales por Scheiner *et al.*, 2013). Por lo tanto se han probado diversas técnicas de

marcaje que utilizan tintes, colorantes alimenticios, empolvado, y muescas torácicas, en larvas y adultos de PEC con diferentes niveles de persistencia y mortalidad.

3.1.5.1. Marcaje de larvas de PEC

Los alimentos con colorante son un buen método para marcar las larvas de PEC.

1. Disolver 1 g de colorante (azul de Sudán 670, Sudán M rojo, Rodamina B; S. Spiewok, datos no publicados) en 9 g de aceite de oliva para obtener una solución stock.
2. Revuelva 3 g de solución madre en 57 g de miel.
3. Mezclar la miel con 90 g de polen en polvo para obtener concentraciones de tinte de 2000 ppm.
4. Poner 10 g de la comida coloreada en pequeños contenedores con tapas perforadas de agujeros pequeños que permitan el flujo de aire pero impidan el escape de las larvas de PEC.
5. Colocar 10 larvas jóvenes (ver sección 3.1.3.1.) en cada recipiente e incubar durante 8 días a 30 °C hasta que llegue a la etapa errante.
6. Las larvas maduras alimentadas con Azul de Sudán 670 mostrarán coloración verde, Rojo M de Sudán se traduce en rojizo y Rodamina B en larvas de color violeta.

Nota: La alimentación de las larvas de PEC con colorantes alimentarios

no mostró resultados decentes en los adultos después de la metamorfosis (S. Spiewok, datos no publicados).

3.1.5.2. Marcaje de PEC adultos.

3.1.5.2.1. Marcaje de PEC adultos con alimentos pigmentados.

1. Disolver el colorante (rodamina B, colorante verde y azul; S. Spiewok, datos no publicados) en agua con azúcar (40%).
2. Permitir que adultos recientemente emergidos, sin alimentar, se alimenten por 3 días *ad libitum*.

Nota: Después de dos semanas en las colonias de campo, los PEC alimentados con colorante verde y azul eran distinguibles de otros escarabajos, pero ambos colores se volvieron turquesa (S. Spiewok, datos sin publicar). Rosa de Bengala, dado a abejas, fue exitosamente usado para identificar interacciones alimentarias entre PEC y abejas (Ellis *et al.*, 2002c) pero resultaron en alta mortalidad cuando fueron suministrados al PEC directamente (S. Spiewok, datos sin publicar).

3.1.5.2.2. Muestras Torácica en PEC adultos.

Para los estudios de captura-marca-recaptura de adultos recomendamos la muesca torácica, ya que los escarabajos con muescas (Fig. 11) sobrevivieron y fue posible una alta tasa de recuperación (de Guzmán *et al.*, 2012).

1. Sostenga el PEC entre dos dedos debajo de un microscopio estereoscópico.

2. Cuidadosamente causar una muesca en un borde lateral del pronoto (Fig. 11) utilizando la punta de una tijera (8 mm).

Nota: Con muescas dobles o diferentes ángulos de corte, el marcaje individual también puede ser posible. De Guzman *et al.* (2012) también probaron el uso de polvo de gis color azul y rojo para marcar PEC, pero esto no fue persistente y causaron alta mortalidad. Para obtener detalles específicos, consulte la publicación original.



Fig. 11. PEC adulto marcado por muesca torácica.

Dibujo: FLI.

3.1.6. Efecto de las condiciones externas sobre PEC en el laboratorio

3.1.6.1. Investigación de efectos de la dieta sobre la reproducción PEC

El pequeño escarabajo de la colmena se alimenta de miel, polen y cría de abejas en las colonias de abejas melíferas. Sin embargo, se ha demostrado poder reproducirlos con otras dietas (Ellis *et al.*, 2002b;



Fig. 12. Contenedor de plástico para el mantenimiento de los adultos del PEC (Fotografía: Elise Jeanerat) con alimento estándar *ad libitum* (ver sección 3.1.1.1. polen, miel y suplemento proteico para abejas en una proporción volumétrica 1:1:2), y agua corriente en un pequeño frasco de vidrio tapado con algodón para prevenir el escurrimiento, y dos portaobjetos como sitio de ovoposición (ver sección 3.2.4.). El alimento y el equipo pueden ser ajustados de acuerdo a las necesidades del experimento (por ejemplo frutas en lugar de alimento estándar y dos o ningún sitio de ovoposición)

Buchholz *et al.*, 2008).

A continuación se describe un método para la investigación de los efectos de la dieta sobre la reproducción PEC modificado después de Ellis *et al.* (2002b).

1. Criar en laboratorio (ver sección 3.1.3.2.) y sexar (3.1.4.) machos y hembras adultos individualmente para asegurar que ocurra el apareamiento sólo en el contenedor de comida. En estudios de reproducción, es esencial saber la relación de machos y hembras. Sólo usar adultos de >1 semana de edad para asegurar su madurez reproductiva.
2. Coloque una pareja de PEC en un recipiente de plástico (Fig. 12).

Las tapas de recipientes deben contener pequeños orificios para permitir una ventilación adecuada.

3. Prepare al menos 10 contenedores de escarabajos (10 repeticiones) por dieta probada.
4. Añadir una cantidad apropiada de alimento por contenedor para acomodar la cantidad de descendencia que será producida.

Desafortunadamente, no existe una fórmula establecida para el volumen de alimento que se debe agregar dado un número establecido de escarabajos adultos. El investigador tendrá que experimentar con esto ya que esta es una consideración importante. Por ejemplo, los adultos de PEC se

reproducen de forma explosiva en la cría de abejas, pero considerablemente menos en la fruta. Por lo tanto, las larvas pueden agotar rápidamente los recursos alimentarios en algunas circunstancias. La dieta se debe congelar primero, especialmente si es recogida del campo (por ejemplo frutas) para matar cualquier otro huevo de insectos que pueden estar presentes.

5. Mueva los escarabajos adultos de las cámaras de alimentos a otros nuevos cada 3-4 días para aliviar los problemas asociados con el crecimiento explosivo de la población sobre los recursos alimenticios limitados, si es necesario.

Limitar la cantidad de tiempo que los adultos pasan en un contenedor determinado igualmente limita el número de huevos de escarabajos que las hembras serán capaces de depositar, disminuyendo así la probabilidad de que las larvas agoten los alimentos. De esta manera, los adultos se pueden mover de un recipiente a otro a lo largo de su vida reproductiva.

6. Monitorear los contenedores diariamente para asegurar que los escarabajos tienen siempre comida disponible (sólo en el caso de los estudios *ad libitum*, de lo contrario hacer los ajustes correspondientes, por ejemplo, dejar morir de hambre).

En estudios de reproducción, las larvas debe ser capaces de alimentarse *ad libitum* si se está determinando cómo la dieta impacta el número de larvas

producidas y el tiempo que le toma a la larva alcanzar la etapa errante.

7. Una vez que la larva en el contenedor alcanza la fase errante, vacíe el sustrato y las larvas en una charola metálica para facilitar su captura (ver la sección 3.1.3.1).
8. Colocar las larvas errantes en los contenedores de suelo de pupación (ver sección 3.1.3.1.).
9. Mantener todos los contenedores de cría a 25 °C y >80% de humedad por una semana bajo luz y luego de la emergencia de los adultos, bajo condiciones de oscuridad (ver sección 3.1.3.1.).
10. Determinar el éxito reproductivo.

El éxito reproductivo es definido por Ellis *et al.* (2002b) colectivamente como el total de descendencia producida por una hembra en una dieta dada (determinado al contar el número de larvas producidas en todo el contenedor de comida asignado a una pareja de adultos) y el porcentaje de esa descendencia que pupa exitosamente (= escarabajos adultos vivos). Uno puede también observar la capacidad reproductiva de la generación F1 para evidencia más profunda del éxito reproductivo.

Notas:

- Permitir que los adultos de PEC se reproduzcan en dietas húmedas o pegajosas es de especial atención ya que los adultos pueden ahogar en el alimento si se fermenta y comienza a encharcarse en el

recipiente. En estos casos, es recomendable colocar una toalla de papel en el fondo del contenedor para absorber la humedad.

- La crianza de larvas en dietas húmedas o pegajosas causan que el ambiente del contenedor se vuelva inhabitable en muchos casos. Así, los contenedores deben estar bien ventilados (con hoyos que las larvas no puedan atravesar) para facilitar el flujo de aire y revisarlas 2-3 veces al día para identificar problemas o inconsistencias.
- Los escarabajos adultos colectados en campo no son adecuados para determinar la capacidad máxima reproductiva porque su edad y estatus reproductivo al momento de la colecta son desconocidos y pudieran haberse reproducido antes del experimento.
- Las manipulaciones con escarabajos adultos deben ser hechas bajo jaulas entomológicas para minimizar el escape de individuos (ver sección 3.1).
- Los contenedores de cría deben estar provistos de agua (algodones húmedos (Fig. 12) similares a aquellos para mantener adultos de abejas en jaulas (ver BEEBOOK respectiva de Williams *et al.*, 2003), especialmente cuando los adultos tienen que reproducirse con alimento seco (como polen).
- Congelar la dieta para matar los huevos de otros insectos potencialmente presentes

alterará su balance microbiológico. Esto puede alterar la nutrición de la dieta o lo atractivo para PEC.

3.1.6.2. Determinando los efectos del suelo en la pupación de PEC.

Ellis *et al.* (2004c) determinaron el impacto del tipo, la humedad y la densidad del suelo en el éxito de pupación de PEC (ver sección 3.1.3.1). Los métodos que ellos utilizaron son aplicables a cualquier estudio enfocándose en hábitos de pupación del PEC.

1. Esterilizar por autoclave los suelos de prueba antes de su uso para eliminar los posibles patógenos.
2. La humedad del suelo puede ser manipulada primero secando el suelo en un horno.
 - 2.1. Dispersa el suelo en una bandeja de metal plana para facilitar su secado. El horno de secado puede ser ajustado a 85 °C. El suelo es seco cuando la charola ya no pierde más peso en un periodo de 24 h (peso constante). Esto toma 6 semanas o más a 85 °C. Si la descomposición de compuestos orgánicos es de preocupación del estudio, los suelos pueden ser secados a menor temperatura por lapsos más largos de tiempo.
 - 2.2. Medir la humedad de suelo como cantidad de agua por peso de la muestra (ya sea en base seca o húmeda). Para el método gravimétrico de masa seca, la humedad del suelo=

gramos de agua/gramos de peso seco.

- 2.3. Usando esta fórmula, se pueden crear suelos de varias humedades, primero secando y luego agregando una cantidad apropiada de agua destilada.
3. Para cada tipo de suelo de interés, colocar una cantidad deseada de suelo mullido en contenedores plásticos de pupación (las cámaras de pupación son mejores si son más altas de anchas).

Ellis *et al.* (2004c) usaron contenedores cilíndricos que tenían 22 cm de altura y capacidad de 1000 ml. Los contenedores deben tener pequeñas perforaciones en el fondo para permitir el drenaje de agua.

4. Compactar el suelo dentro de la cámara de pupación si la densidad es un componente importante para el estudio.
 - 4.1. Vaciar 1 L de agua destilada en el contenedor de pupación con el suelo.

Las perforaciones en el fondo del contenedor permitirán el drenaje del agua. El agua compacta el suelo de manera natural.

- 4.2. Si una cantidad predeterminada de agua por peso es deseada en el suelo compactado, secar el suelo compactado dentro del contenedor de pupación.

El horno debe ser ajustado a una temperatura que no deshaga o distorsione el contenedor de plástico, o descomponga los compuestos del suelo/nutrientes (para los

microorganismos, no para los escarabajos mismos) si eso es de interés. El contenedor de suelo debe permanecer en el horno hasta que no pierda más peso en un periodo de 24 h.

- 4.3. Agregar la cantidad apropiada de agua destilada al suelo seco y compactado para alcanzar la humedad deseada.
5. Colocar larvas maduras producidas de acuerdo a los procedimientos de crianza estandarizados (ver sección 3.1.3.1.) en los contenedores de pupación una vez que los suelos sea acondicionados como se necesite.

3.1.7. El PEC como vector de patógenos de las abejas.

Similarmente a otras plagas, el PEC puede actuar como vector de los patógenos de las abejas melíferas (AFB: Schäfer *et al.*, 2010b; virus; Eyen *et al.* 2009a, b). Esta sección describe los métodos experimentales para investigar dichas transmisiones de patógenos por el PEC.

3.1.7.1. Investigación las interacciones potenciales entre *A. tumida* y *Paenibacillus larvae*, el organismo causante del Loque Americano.

Panales de cría con síntomas de loque Americano (en inglés *American Foulbrood*, AFB) pueden ser usados para contaminar larvas y adultos de PEC en el laboratorio (Schäfer *et al.* 2010b). Esta contaminación ha mostrado persistir en pupas y adultos recién emergidos. El escarabajo adulto contaminado puede ser usado para

exponer colonias de abejas a esporas de *P. larvae*. Los métodos correspondientes están esquematizados en seguida.

1. Tomar panales enfermos con cría operculada y sin opercular de colonias infestadas con AFB y colocarlas dentro de contenedores plásticos con una cantidad igual de celdas infectadas cada una.
2. Colectar adultos de PEC de programas de cría o de colonias de campo infestadas e introdúzcalos dentro de los contenedores (N=20).
3. Mantener los contenedores en la oscuridad a 30 °C y alta humedad relativa (>50%).
4. Después de siete días, colectar los escarabajos contaminados.
5. Tres días después, colectar las larvas errantes.

Ambos, adultos y larvas pueden ser usados dependiendo de los requerimientos del experimento. Si es necesario, las larvas se pueden mover a contenedores de arena colocados en la oscuridad en una incubadora para permitir que continúen su desarrollo (ver sección 3.1.3.)

6. Inmediatamente congelar los ejemplares de PEC después de su colección para cuantificar el número de esporas de *P. larvae* por espécimen (ver el respectivo artículo de la revista BEEBOOK por Graaf *et al.*, 2013).
7. Para exponer colonias de abejas en campo a adultos de PEC contaminados, introduce los escarabajos colectados dentro de las colonias experimentales, las

cuales deben estar libres de esporas de *P. larvae*.

Nota: ¡Por favor considere lo riesgos de bioseguridad cuando se manipula *P. larvae* para investigación! (ver el artículo en BEEBOOK acerca de AFB por Graaf *et al.*, 2013). Este método puede ser también practicable para loque Europeo (EFB) y otras enfermedades.

3.1.7.2. Investigación del potencial de PEC como vector de virus de abejas.

Para investigar el potencial de PEC como vector de virus, los escarabajos pueden ser alimentados con abejas obreras infectadas con virus o con cría contaminada con polen o cera. Eyer *et al.* (2209a, b) no encontraron infecciones por virus a través de alimentar al escarabajo con polen contaminado, pero el si se infectó al través de alimentarlos con obreras o cría y cera:

1. Mantener un programa de crianza de escarabajos en laboratorio (ver sección 3.1.1. y Fig. 8 y 12) y proveer alimentos u otro material contaminado con virus.
2. Colectar a los adultos de PEC después de 6 días y guardarlos adecuadamente hasta los análisis de virosis (ver el respectivo artículo en BEEBOOK por Miranda *et al.*, 2013).

3.1.8. Investigaciones de patógenos y parásitos del PEC.

El conocimiento acerca de patógenos y parásitos del PEC puede ofrecer ventajas alternativas para el control de

la plaga y puede en general contribuir al entendimiento de esta plaga.

3.1.8.1. Inoculando larvas de PEC con hongos entomopatógenos.

Cadáveres infectados con hongos (Ellis *et al.*, 2004e) o suspensiones conidiales (Muerrle *et al.* 2006) pueden ser usada para infectar al PEC. Ellis *et al.*, (2004e) alcanzaron cerca del 30% de mortalidad en pupas de escarabajos expuestas, cuando fueron larvas errantes, a cadáveres de donde se aislaron *Aspergillus flavus* y *A. niger* (ver el artículo de BEEBOOK por Jensen *et al.*, 2013). El procedimiento es:

1. Colectar larvas sanas de PEC producidas usando suelo esterilizado en autoclave y la técnica de crianza estándar (ver sección 3.1.3.).
2. Colocar la suma de larvas errantes deseada en un contenedor plástico (11x11x9 cm) que tenga cadáveres de larvas de PEC que muestren signos de estar infectados con patógenos fúngicos (Ellis *et al.*, 2004e). Es importante confirmar que los cadáveres sean portadores del patógeno de interés usando técnicas microbiológicas adecuadas (Mürle *et al.*, 2006 y el respectivo artículo en BEEBOOK (Jensen *et al.*, 2013)).
3. Permitir que las larvas saludables deabulen en el contenedor entre los cadáveres por 24h.
4. Después de 24 horas de exposición, colocar las larvas errantes en cámaras para pupación con suelo y permitir su metamorfosis (ver la sección 3.1.3.).

3.1.8.2. Infestando PEC con nemátodos

Este método fue desarrollado por Ellis *et al.* (2010). Permite probar una variedad de especies de nemátodos apuntando hacia el control alternativo del PEC.

3.1.8.2.1. Infestación in Vitro de larvas errantes con una suspensión acuosa de nemátodos.

Los nemátodos juveniles infestantes (Infestant Juveniles (IJs)) frecuentemente son suspendidos en agua por la compañía proveedora de nemátodos. Es en tal suspensión que la siguiente técnica está basada para infestar larvas de PEC.

1. Coloca una pieza de papel filtro en el fondo de una caja Petri. El filtro debe cubrir enteramente el fondo del disco.
2. Determinar la densidad de IJs suspendidos en la solución acuosa.
3. Agregar el número deseado de IJs al papel filtro usando una pipeta.

Uno debe invertir cuidadosamente el contenedor de IJs para asegurarse una correcta dispersión de los nemátodos en todo el líquido. El volumen total de agua agregada al filtro, incluyendo la suspensión de IJs, debe ser igual a 1.5 ml.

Por ejemplo, suponga que está tratando de infectar larvas errantes con 200 IJs por larva. Si planea agregar 10 larvas de escarabajo a la caja Petri, necesita agregar 2000 IJs al disco. Si determina que hay 2000 IJs por 0.5 ml de agua, pipetear 0.5 ml de suspensión de nemátodos y 1 ml de agua destilada

al papel para un total de 1.5 ml de solución agregada al papel.

4. Agregar el número deseado de larvas errantes de PEC a la caja Petri.
5. Coloque la tapa de la caja Petri y asegure la tapa a la superficie usando cinta adhesiva. Las larvas de PEC pueden empujar la tapa de una caja Petri y escapar, así que es necesaria la cinta adhesiva.
6. Coloque los discos en una incubadora a 25 °C en oscuridad.
7. Medir la mortalidad de las larvas en cualquier periodo de tiempo, aunque la resolución es mayor mientras más frecuentemente se revisen las cajas.
8. Los controles experimentales incluyen: 1) no agregar nada a la caja Petri (sin papel, ni agua ni nemátodos), 2) agregar sólo el papel filtro, 3) agregar sólo 1.5 ml de agua destilada, y/o 4) agregar papel filtro y 1.5 ml de agua destilada.

3.1.8.2.2. Infestación In Vitro de larvas en suelo usando bioensayos de arena.

El método es similar al presentado antes.

1. En lugar de usar papel filtro en la caja Petri, use 30 g de arena seca esterilizada en autoclave.
2. Transfiera con una pipeta la solución acuosa de nemátodos directamente sobre la arena, la cual será después humedecida al 10% de su peso seco.
3. Agregar larvas errantes de PEC a la caja Petri.

4. Coloque y asegure la tapa.
5. Coloque las cajas Petri en una incubadora a 25 °C en la oscuridad.
6. Medir la mortalidad de las larvas en cualquier periodo de tiempo, aunque la resolución será mayor mientras más frecuentemente se revisen las cajas.
7. Las cajas Petri de control incluyen: 1) no agregar nada a la caja (ni arena, agua o nemátodos), 2) agregar sólo arena, 3) agregar sólo 1.5 ml de agua destilada, 4) 1.5 ml de agua destilada y arena.

3.1.8.2.3. Infestación in Vitro de pupas en suelo con una suspensión acuosa de nemátodos.

1. Esterilizar suelo en la autoclave.
2. Humedecer suelo hasta 10% de agua por peso.
3. Colocar suelo esterilizado en pequeños vasos plásticos.

Ellis *et al.*, (2010) usaron vasos de 118 ml. Una medida similar es apropiada.

4. Colocar cinco larvas errantes de PEC en los vasos con suelo y permitirles que se entierren ellas mismos y comiencen el proceso de pupación.
5. Dos días después de agregar las larvas, pipetear la cantidad deseada de suspensión de IJs en solución acuosa dentro del vaso.
6. Agregar 5 ml de agua a los suelos del vaso cada 3-4 días, según sea necesario, para mantener una humedad adecuada en el suelo.
7. Coloque las tapas de los vasos para encerrar los PEC.

Se puede esperar que los PEC comiencen a emerger de los vasos control (sin nemátodos) alrededor del día 17 después de poner las larvas en el suelo.

3.1.8.2.4. Infestación in Vitro de pupas en suelo con un cadáveres infectados con nemátodos.

Se sigue el método perfilado en la sección 3.1.8.2.3. con una modificación en el paso 5.

5. En lugar de aplicar nemátodos vía suspensión acuosa, agregar un cadáver de PEC infectado con el nemátodo estudiado al vaso. Enterrar el cadáver aproximadamente 0.5 cm debajo de la superficie del suelo. El cadáver puede ser producido de acuerdo con la técnica esbozada en la sección 3.1.8.1.

Notas:

- Las técnicas esbozadas pueden ser escaladas y modificadas para uso en campo.
- Ellis *et al.* (2010) hizo esto enterrando los vasos con suelo en campo. Los vasos tenían tapas enmalladas y fondos perforados para permitir el drenaje de la lluvia a través del vaso. Por lo demás, los nemátodos y las larvas de PEC fueron agregadas a los vasos como en los ensayos *in vitro*. Los métodos pueden ser también usados para determinar la persistencia generacional de los nemátodos. Esto es logrado

al agregar 5 larvas adicionales de PEC a los vasos con suelo semanalmente. Si los nemátodos se están reproduciendo y se mueven hacia las larvas recién agregadas, el rango de emergencia de adultos será continuamente menor.

3.2 Técnicas de campo.

Las técnicas de campo descritas involucran un amplio rango de diferentes protocolos de investigación incluyendo las interacciones entre las abejas melíferas y el PEC, estudios etológicos, cuantificación de PEC en colonias y más técnicas generales como la introducción de PEC en colonia de abejas.

3.2.1 Investigando interacciones intra-coloniales entre abejas adultas y PEC adultos.

PEC adultos y abejas obreras adultas interactúan regularmente entre sí dentro de una colonia (ver Elzen *et al.* 2001; Neumann *et al.* 2001c; Ellis, 2005; Ellis y Hepburn, 2006; Ellis *et al.*, 2003c, d; 2004 a, b; Pirk y Neumann, 2013). La mayoría de los estudios de comportamiento en la interacción entre el escarabajo y las abejas han sido conducidos usando colonias de abejas alojadas en colmenas de observación (ver el artículo en BEEBOOK acerca de métodos etológicos, de Scheiner *et al.* 2013). Para ese fin, discutimos el establecimiento inicial y después varios métodos que pueden ser usados para investigar una serie de interacciones escarabajo/abeja. Esta secuencia de procedimientos esbozados enseguida

son modificables para su uso por quienes investigan las interacciones entre las abejas adultas y larvas de PEC.

3.2.1.1. Establecimiento general de los experimentos

1. Establecer las colonias de observación estandarizadas a 3 bastidores (ver el respectivo artículo BEEBOOK por Delaplane *et al.* 2013) de acuerdo a los parámetros establecido por el estudio (un bastidor de cría y dos de miel, con reina o sin reina, etc., ver el artículo BEEBOOK en métodos etológicos por Scheiner *et al.*, 2013 para detalles del establecimiento y mantenimiento de colonias de observación) y remover cualquier escarabajo de la colonia usando aspiradores (ver la figura 6).
2. Las colonias de observación deben ser mantenidas en un cuarto oscuro, sin luz natural o artificial sobre la colmena.
3. De acuerdo con las necesidades del experimento, coleccionar adultos de PEC para programas de cría (ver la sección 3.1.3.) o de colonias infestadas en campo. Estos escarabajos pueden ser todos machos, todas hembras, de una cohorte de edad específica, etc. según los requerimientos del experimento. Los escarabajos adultos deben ser sexados si se requiere (ver sección 3.1.4.) e introducidos dentro de las colonias de observación después del crepúsculo, el lapso de tiempo preferido para los vuelos de PEC (Neumann *et al.*, 2012).
4. Las colonias deben ser monitoreadas al menos dos veces al día (Neumann *et al.*, 2001c; Ellis *et al.*, 2003c, d, 2004a, b) en el lapso de tiempo adecuado para las necesidades experimentales (mañana y tarde, o sólo después del atardecer para comportamiento nocturno). Todas las observaciones nocturnas de las colonias deben ser hechas usando luz roja para minimizar el disturbio en el comportamiento de las colonias. Puede ser necesario usar una pequeña linterna para encontrar los escarabajos confinados en áreas particularmente difíciles de alcanzar con la vista. El orden de observación de las colonias debe ser alternado diariamente, en cada lapso.
5. Durante el estudio de comportamiento, es esencial definir con precisión los patrones/categorías de comportamiento. Tienen que estar claramente definidos y distinguidos; bajo ninguna circunstancia el observador debe caer en la situación que un cierto patrón de comportamiento observado puede ser tanto el comportamiento 'a' como el comportamiento 'b'. Como un ejemplo hipotético asumamos que dos categorías son llamadas "caminar" y "correr". Estas categorías son ejemplos de comportamientos pobremente definidos ya que éstas no dan una definición clara y objetiva. Las categorías "caminar, una velocidad menor a 5 mm/segundo" y "correr, velocidad superior o igual 5 mm/segundo" pueden estar

claramente definidas y son distintas. Como otro ejemplo hipotético, las categorías “alimentarse” e “interacciones trofalacticas” pueden no ser de ayuda como categorías ya que ellas se sobreponen.

6. En la mayoría de estudios de comportamiento, es importante saber dónde sucede la interacción, especialmente en colonias de insectos sociales como las abejas melíferas y sobre todo en el caso de interacciones PEC/abejas melíferas. Por lo tanto, es útil sobreponer una cuadrícula transparente de cuadrados sobre ambos lados de la ventana de una colmena de observación para saber la locación de la interacción. Naturalmente, el tamaño del cuadro determina la resolución espacial. El consenso general es usar cuadrados de 5 x 5 cm (Moritz *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2001b, 2003; Ellis *et al.*, 2003d), los cuales pueden ser entonces divididos en cuadrados internos de 1 x 1 cm (Ellis *et al.*, 2003d). Uno tiene que evitar sobrecargar las ventanas laterales con marcas para asegurarse que se puede observar efectivamente el comportamiento. El señalamiento de las filas y columnas debe estar incluido en el borde de la cuadrícula. Para evitar confusiones, las filas pueden ser señaladas con números y las columnas con letras (o viceversa). Es altamente recomendable cuando se realicen observaciones en ambos lados de un bastidor, señalar continuamente las columnas en ambos lados. Por ejemplo con una cuadrícula de 6 X 9 en cada lado, las filas son señaladas de 1-9 y las

columnas de la A-F en un lado y G-L en el lado opuesto.

7. En cada periodo de observación, el observador debe monitorear la colonia en patrón de izquierda a derecha, siguiendo el cuadrado definido más alto de 5 x 5 cm. Este patrón debe seguirse con la segunda fila de 5 x 5 cm cuadrados, continuando hacia el fondo de la cuadrícula. Este patrón de observación minimiza la probabilidad de que la misma área sea revisada más de una vez y que el comportamiento sea doblemente registrado. Ambas caras de la colmena de observación deberán ser monitoreadas de ésta manera.

3.2.1.2. Categorías de comportamiento.

Las siguientes categorías de comportamiento son una síntesis de numerosos estudios (Elzen *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2001c; Solbrig, 2001; Ellis, 2005; Ellis *et al.* 2002c; 2003c; 2004a,b; Pirk and Neumann, 2013) y puede ser usado para investigar interacciones. Se definieron las siguientes categorías:

En el PEC:

En descanso/Ignorado: (A menos de 5 mm de distancia de una abeja) –no hace ningún movimiento, ninguna de las otras categorías pueden ser observadas.

Caminando: En movimiento (<5mm/segundo sin ser perseguido por ningún otro escarabajo o abeja).

Correr: Desplazamiento rápido (>5-10 mm/segundo), sin ser perseguido por ningún escarabajo o abeja.

Huir: Desplazamiento rápido (>5-10 mm/segundo), mientras es perseguido por un escarabajo, un grupo de escarabajos, una o más de una abeja.

Apareándose: El macho monta la hembra.

NOTA: en esta definición, 'montar' es usado como una aproximación de apareándose.

Alimentándose de: a) Polen almacenado, b) Néctar almacenado, c) Larvas, d) una obrera muerta, e) un escarabajo muerto, f) una obrera viva.

Contacto antenal con otro PEC: contacto con uno o varios escarabajos.

Contacto antenal con una abeja obrera: Contacto con cualquier abeja, por ejemplo una guardiana (a la entrada de la colmena (Rösch, 1925) o en un sitio de confinamiento/prisión (Neumann *et al.*, 2001c; Ellis, 2005)).

Contacto trofaláctico con una obrera: Obtener una gota de una abeja que presenta alimento entre sus mandíbulas.

Interfiriendo otro PEC en un contacto trofaláctico con una obrera: Obtener alimento mientras otro escarabajo es alimentado.

Posición de tortuga (defensa): Se queda quieto y mete su cabeza debajo del pronoto con las patas y antenas pegadas al cuerpo.

Monta una abeja: Subir al abdomen de una obrera y cortar con las mandíbulas a través de los tejidos entre los terguitos.

Abejas:

Hay más de 50 categorías de comportamiento descritas para abejas (ver por ejemplo Kolmes, 1985; Neumann *et al.* 2001b; Pirk, 2002). A continuación se mencionan sólo las básicas relacionadas con el PEC:

En descanso/ignorada (5mm alrededor de un escarabajo) –sin movimiento alguno, ninguna otra categoría puede ser observada.

Caminando: Desplazándose a <1 cm/segundo.

Corriendo: Desplazándose a >1 cm/segundo.

Persiguiendo: Corriendo y siguiendo un intruso (PEC).

Mordiendo: Las mandíbulas están abiertas y la abeja trata de morder y atrapar al PEC.

Picando: Encorva el abdomen para poner el agijón en posición y/o el estilete sale y entra de la ponzoña.

Relación trofaláctica con/ alimentando: a) otra obrera, b) la reina, c) PEC encarcelado, d) PEC en libertad –La obrera regurgita una gota del saco de miel, la cual puede ser observada entre las mandíbulas y de donde se van a alimentar los comensales (abejas o escarabajos).

Guardiana: Una obrera previene que un PEC se mueva libremente manteniéndolo a raya en una fisura o prisión/confinamiento. Este tipo de patrón es frecuentemente seguido por alimentación y/o mordeduras.

Construyendo prisión (confinamiento): Triturando o moldeando la mezcla de cera-propóleo para construir la barrera de la prisión.

Nota final: Todas las categorías pueden ser subdivididas o combinadas dependiendo de las necesidades del experimento.

3.2.1.3. Investigando interacciones de comportamiento de abejas adultas y adultos de PEC en la entrada de la colonia –dos opciones alternativas.

Opción 1 –A la entrada:

Dos métodos han sido desarrollado para investigar las interacciones entre abejas y PEC a la entrada de la colmena (Halcroft *et al.*, 2011; Atkinson y Ellis, 2011a):

1. Construir un cajón de observación modificado para facilitar la observación a la entrada de la colmena.

El corredor de entrada a la colmena debe contener una arena de prueba (Atkinson y Ellis, 2011a, usaron una arena de prueba de 10 x 20 cm, L x A), con un piso marcado con una cuadrícula de 1 cm².

2. Construir una división clausurable en ambos extremos de la arena de control usando acrílico u otro

material. Perfore el acrílico para mantener un flujo de aire normal hacia adentro y hacia afuera de la colmena.

3. Hacer una entrada secundaria a la arena de prueba a través de la cual los escarabajos puedan ser introducidos (Fig. 13 y 14).
4. Realizar las pruebas bajo luz roja para tomar nota de actividad voladora usual del PEC después del atardecer (Neumann *et al.*, 2012).
5. Cerrar ambas puertas a la arena de prueba para “atrapar” las guardianas en su lugar en la entrada. Las puertas deben ser cerradas lentamente y con el mínimo disturbio para no excitar a las abejas guardianas.
6. Introducir, para cada prueba, un PEC adulto a través de la entrada secundaria a la arena.
7. Inserta así mismo una esfera de cristal dentro de la arena como control.

La esfera debe ser aproximadamente de la misma talla y color que el invasor. Atkinson y Ellis (2011a) ataron una esfera negra de 60 mg a un cáñamo de pescar de un filamento, así puede ser sacada de la arena de prueba después del periodo de observación.

8. Una vez introducido, registrar la respuesta de las abejas guardianas hacia el escarabajo o la esfera para cualquier periodo de tiempo, si bien Atkinson y Ellis (2011a) obtuvieron respuestas después de 60 segundos.
9. Tres respuestas potenciales de las abejas guardianas pueden ser reconocidas (quizás más pueden ser descubiertas usando el método):

- Ignorar (una cabeza de abeja se acerca hasta 5 mm del sujeto pero sin hacer contacto),
- Contacto/interacción (la abeja físicamente contacta al sujeto en una manera no defensiva, la cual involucra lamer el escarabajo y contacto antenal), y
- Defender (la abeja intenta picar y/o remover el objetivo de la colmena, Elzen *et al.* 2001, ver sección 3.2.1.2.).

En el caso que la arena de prueba no esté bien cerrada para prevenir el escape de los escarabajos, sólo se deben tomar en cuenta aquellos ensayos en los cuales los escarabajos permanezcan en la arena por ≥ 30 segundos.

10. Después del periodo de observación, abrir las puertas de acrílico en cualquier lado de las arenas por > 10 segundos para permitir el movimiento de las abejas dentro y fuera del centro del área de la colmena y reducir la agitación de las abejas guardianas.
11. Dar tiempo entre ensayos para que los escarabajos salgan naturalmente de la arena o para retirar la cuenta de cristal. En Atkinson y Ellis (2011a), el promedio de tiempo entre ensayos fue > 1 min.
12. Usar los escarabajos experimentales y las cuentas una sola vez.
13. Es común atrapar diferente número de guardianas en la arena en cada ensayo cuando se sigue esta técnica. Consecuentemente, se

debe convertir estadísticamente las respuestas a los escarabajos o a las cuentas a datos proporcionales para facilitar la comparación justa entre ensayos. Atkinson and Ellis (2011a) establecen que lo importante no es la proporción de abejas desarrollando una respuesta dada sino la proporción de todas las respuestas: ignorados, contactos y defensas. De esta forma, una abeja solitaria puede demostrar estas respuestas múltiples alguna vez a lo largo del periodo de observación y las observaciones serán válidas.

14. Analizar los datos como se esquematizó en las directrices de BEEBOOK (Pirk *et al.*, 2013).

Nota: Los ensayos deben ser conducidos usando múltiples colmenas de observación simultáneamente si los recursos lo permiten. Esto permite minimizar el período de observación y los impactos del clima sobre el comportamiento en la entrada de la colmena.

Opción 2: Arenas con entradas en forma de T en colonias de observación.

Esta opción fue desarrollada en el Grupo de Investigación en Insectos Sociales de la Universidad de Pretoria (Strauss, 2009). La ventaja es que no interviene con la actividad pecoreadora en curso de la colonia y utiliza la observación de que cualquier colonia en la naturaleza frecuentemente tiene más de una entrada. Esto posteriormente permite la manipulación del intruso, en este caso el PEC, sin tener el riesgo de liberar las abejas guardianas. Las trampas-T (Fig. 13) ofrecen dos cámaras para introducir

intrusos por más de una posición y previene cualquier línea de visión entre las guardianas y el intruso antes de que empiece el experimento.

1. Asir el dispositivo T a la colmena.
2. Dar al menos tres días para que las guardianas reconozcan la entrada adicional.
3. Cubrir la arena con una tapa de vidrio para permitir la observación y para evitar que los escarabajos o las abejas se escapen.
4. Sobreponer una tapa en el vidrio si la información tiene que ser grabada (ver sección 3.2.1.1.).
5. Inserta una pieza de malla metálica ($\pm 9.5 \times 4.9$ cm) en la cajas de madera como barreras para separar los intrusos/PEC de las abejas. En lugar de madera también puede ser usado policarbonato (Köbler *et al.* 2013). Los hoyos en la malla debe ser solo lo suficientemente grandes para que el PEC pase a través, pero evitar que las abejas entren a la parte del contenedor donde los PEC son liberados. En este diseño, los escarabajos tienen acceso a ambos, la colmena y el contenedor, mientras que las abejas sólo tienen acceso a la colmena y la parte del contenedor más cercana a la entrada de la colmena.
6. Para optimizar las observaciones y reducir la influencia del observador, registrar las interacciones usando un sistema de circuito cerrado a control remoto.

La grabación puede ser analizada usando software diseñado para estudios de comportamiento.

La ventaja de la opción 2 es que el montaje no interfiere con el intercambio gaseoso de la colonia, la actividad normal no se ve afectada, y por lo tanto las observaciones durante el día son posibles. Además, está disponible un amplio espacio para el observador o equipo adicional, por lo que uno no tiene que deslizarse entre el orificio de salida y la colmena de observación.

Nota: Dependiendo de las preguntas de investigación, ambas opciones tienen sus ventajas o desventajas. Si uno necesita un flujo constante de abejas entrando en contacto con los escarabajos a la entrada, la opción 1 puede ser mejor. Si el experimento no debe interferir con las actividades normales de la colonia, la opción 3 puede ser más adecuada.

3.2.2. Investigando el comportamiento de ovoposición del PEC y las respuestas higiénicas de las abejas a los huevos y larvas jóvenes del PEC

Las hembras adultas de PEC ovopositarán en grietas (Fig. 1, Lundie, 1949; Neumann y Härtel, 2004). Ocasionalmente, las hembras perforan los opérculos y/o paredes laterales de las células de cría, insertan su ovopositor en el orificio, y ovopositan sobre la abeja en desarrollo dentro de la celda (Ellis *et al.*, 2003a; 2003c, 2004d; Ellis y Delaplane, 2008). En respuesta, las obreras adultas pueden detectar huevos y larvas jóvenes de PEC en celdas operculadas, destapan la celda y remueven la cría y/o los huevos y larvas de PEC (el

comportamiento higiénico). Un número de métodos se han desarrollado para facilitar el estudio del comportamiento de ovoposición del pequeño escarabajo de la colmena y el resultante

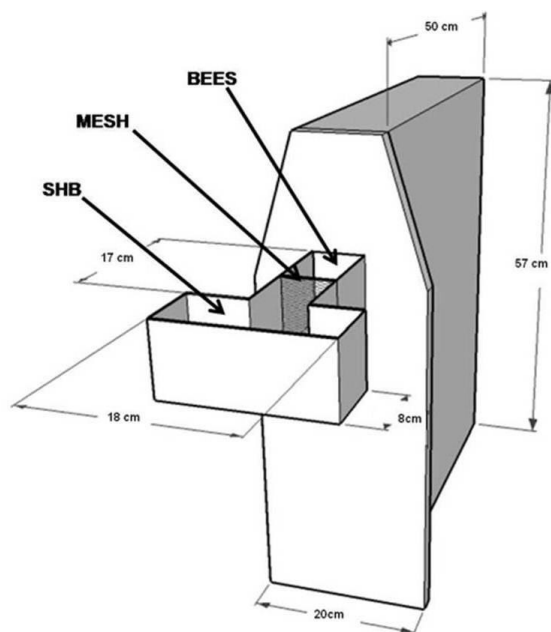


Fig. 13. Colmena de observación con un contenedor T enganchado a ésta, como área de prueba. Dibujado con permiso de su autor. Dibujo: Ursula Strauss.

comportamiento higiénico de la abeja.

3.2.2.1. Promover el comportamiento de ovoposición del PEC en celdas de crías cubiertas.

La idea de este método es que los adultos PEC se atrapan y se dejan reproducir en una sección de cría.

1. Los escarabajos usados en el estudio deben ser criados en el laboratorio, colectados en campo, todos machos, todas hembras, de una cohorte específica de edad, etc. según las necesidades del

experimento. Deben tener al menos 1 semana de edad para asegurarse que han alcanzado la madurez sexual.

2. Remover un bastidor de cría operculada (~60-90% operculada) de una colonia.

El bastidor de cría no debe contener ninguna larva desoperculada ya que los escarabajos las macerarán en este procedimiento. Cualquier larva sin opérculo en el bastidor deberá ser removida con pinzas. Es mejor usar una sección de cría que no contenga ningún depósito de miel. Por otra parte, la cría seleccionada debe tener > 6 días desde la operculación (determinado por destapar y examinar las celdas de cría seleccionadas en la zona de prueba, vea la sección sobre la obtención de obreras y crías de edad conocida en el BEEBOOK de métodos diversos, Human *et al.*, 2013) por lo que no habrá emergencia de abejas durante el periodo de prueba.

3. Preparar una jaula de lámina (10 x 10 x 2.5 cm, L x W x H).

La cara de la jaula debe estar cubierta con malla para permitir la ventilación. La malla debe ser lo suficientemente chica para evitar que los PEC o las abejas lo atraviesen.

4. Atrapar el número requerido de PEC en pequeños frascos.
5. Colocar los frascos en hielo por 4-5 min.
6. Una vez anestesiados, verter los escarabajos en la sección de cría. Atrapar los escarabajos en la sección presionando la jaula sobre

ésta y dentro de la cera en el centro del bastidor.

7. Devolver el bastidor que contiene los escarabajos enjaulados en una sección de la cría a la colonia de la cual fue removida la cría.
8. Permitir que los escarabajo se apareen y que las hembras ovopositen en un periodo de 24 h.

Debido a que el periodo de tiempo en esto puede variar, los escarabajos pueden no ovopositar en las celdas de cría lo suficiente si se les da menos tiempo. En contraste, pueden fraccionar la sección de cría después del uso si se les permite el acceso más de 24 horas. Esto sucede especialmente si se agregan más de 20 adultos a la sección de panal.

9. Remover los panales de la colonia después de que el periodo de ovoposición concluye.
10. Colectar las jaulas y escarabajos.

Nota: Es importante saber que algunos adultos de PEC pueden escapar de la jaula durante el periodo de ovoposición a menos que la jaula se presione firmemente dentro de la cera del panal. Así mismo, Los escarabajos que ya estaban presentes en la colmena al momento del estudio pueden migrar a la jaula. Esta situación usualmente sólo presenta un problema si se está tratando de investigar el comportamiento de ovoposición de un número exacto de escarabajos.

3.2.2.2. Identificación y marcaje de las celdas de cría en las cuales PEC ha ovopositado.

1. Las celdas en cuales el PEC ha ovopositado naturalmente o por el método descrito en la sección 3.2.2.1. contienen opérculos o paredes laterales perforados. Lo primero es fácil de notar aunque lo segundo requiere un ojo agudo y el uso de una lámpara.
2. Marcar las celdas operculadas expuestas al escarabajo y que contengan perforaciones en el opérculo o las paredes laterales usando una lámina transparente de plástico (acetato)
3. Cortar el acetato a más o menos el tamaño de la cara del batidor.
4. Marcar la hoja con un marcador permanente en una de las esquinas del bastidor para identificar si está correctamente colocado en observaciones subsecuentes.
5. Etiquetar el acetato de acuerdo al bastidor y colonia que le corresponde si se están usando repeticiones.
6. Una vez que el acetato es fijado en el bastidor, usar un marcador permanente para poner un pequeño punto encima de todas las celdas que estén perforadas.
7. Una vez marcada y etiquetada, remover el acetato del bastidor y guardarlo hasta que se necesite.

3.2.2.3. Determinar respuestas higiénicas de las abejas hacia los huevos y las larvas jóvenes de PEC.

1. Siguiendo el método esbozado en la sección 3.2.2.1. y 3.2.2.2., exponer bastidores de cría a adultos reproductivos de PEC. Éstos se aparearán y las hembras pueden ovopositar en celdas operculadas.

2. Marcar las celdas (ver sección 3.2.2.2.)
3. Usar un alfiler para horadar pequeños agujeros en los opérculos de las celdas de cría como un tratamiento control positivo (Ellis *et al.*, 2004d).

Cuando se pincha con el alfiler, los agujeros deben estar alrededor del perímetro del opérculo para evitar dañar la cría de abeja dentro de la celda.

4. Marcar celdas de cría operculadas sin perforar como tratamiento control negativo (Ellis y Delaplane, 2008).
5. Devolver el bastidor que contiene las celdas perforadas al centro de la cámara de cría.

Consecuentemente, la sección de cría devuelta a la colonia en el paso 3 será atendida por obreras. Las abejas obreras que poseen marcadas respuestas higiénicas pueden detectar huevos/larvas jóvenes de PEC presentes en las celdas de cría operculadas, destapando la celda y removiendo la cría o los huevos/larvas de PEC (Ellis *et al.* 2003^a, c; 2004d; Ellis y Delaplane, 2008).

6. Dejar el bastidor que contiene la sección de prueba en la cámara de cría por un periodo de tiempo predeterminado.

Ellis *et al.* (2003c) dejaron la cría en las colonias después de exponerlas al PEC por 48 horas. Sin embargo, la respuesta higiénicas de las obreras a las crías operculadas se acercó al 100% en todas las colonias de prueba

así que Ellis y Delaplane (2008) redujeron el tiempo de la cría en la colonia a 24 h en pruebas subsecuentes para observar diferencias entre colonias con respecto a las respuestas higiénicas.

7. Después del periodo de 24 h, retirar el bastidor de la colonia.
8. Colocar el acetato marcado (ver sección 3.2.2.2.) en el bastidor correspondiente y alinearlos a la sección de cría.
9. Considerar como removida todas las crías de las celdas marcadas que hayan sido perforadas en la tapa o en las paredes laterales un día antes y que ya no contengan abejas en desarrollo.
10. Calcular el nivel de comportamiento higiénico (o proporción de cría removida) como:

No. de celdas marcadas que ya no contienen abeja después de 24 h de exposición a escarabajos adultos

Número total de celdas marcadas que habían sido perforadas en las paredes o en el opérculo

Mientras más alta la proporción, más higiénica es la colonia.

3.2.2.4. Determinar la proporción de celdas de cría operculadas y perforada que contienen huevos de PEC (rango de ovoposición).

1. Usar el método descrito en la sección 3.2.2.3. para determinar el rango de ovoposición de las hembras de PEC en celdas operculadas.

2. Una hembra de PEC no ovopositará en todas las celdas en las cuales perfore el opérculo o las paredes laterales. Consecuentemente, calcular el “rango de ovoposición” como sigue:

$$\frac{\text{No. de celdas de cría operculadas que contienen huevos de PEC}}{\text{Número de celdas marcada que tienen opérculos o paredes perforadas.}}$$

3. Abrir las celdas marcadas de acuerdo con la sección 3.2.2.3. con pinzas.
4. Determinar el número y presencia de huevos de PEC.
5. Remover las pupas/prepupas de abejas en desarrollo para facilitar la cuantificación de los huevos.

Usos potenciales:

Los procedimientos demostrados en las secciones 3.2.2.1.-3.2.2.4. pueden ser usadas para:

- Investigar los efectos de la densidad de escarabajos en la ovoposición (simplemente variando el número de PEC en las jaulas durante el periodo de ovoposición),
- Monitorear y posiblemente seleccionar el nivel de expresión higiénico de abejas (dentro y entre subespecies) hacia los huevos y/o larvas de PEC,
- Determinar los impactos del tiempo, ambiente, subespecie de abejas, etc. en el comportamiento de ovoposición del PEC,

- Determinar el impacto de la fortaleza de la colonia en el comportamiento higiénico (Ellis y Delaplane, 2008), e
- Investigar otras áreas similares.

3.2.3. Determinar el número y distribución de PEC adultos dentro de una colonia en campo, racimos invernales y colonias jóvenes sin PEC.

Para estimar la carga de infestación de las colonias o lugares preferidos por el pequeño escarabajo de la colmena, es esencial cuantificar y localizar los escarabajos adecuadamente. Algunos experimentos también requieren colonias libres de PEC. A continuación se hace una revisión de los métodos respectivos.

3.2.3.1. Monitorear visualmente el número de escarabajos en colonias vivas y/o remover los escarabajos para formar colonias libres de escarabajo.

Estos métodos están modificados de Ellis *et al.*, 2002a,; Ellis y Delaplane, 2006; Spiewok *et al.*, 2007; 2008; Neumann y Hoffmann, 2008. El procedimiento se lleva a cabo mejor con dos personas, una que manipule la colonia y la segunda que colecte los escarabajos.

1. Coloque una lámina de plástico opaco (~2 x 2 m, preferiblemente blanco o de color claro) o triplay en frente de la colonia de que se quiere contar el número de escarabajos.
2. Humear ligeramente la colonia.
3. Remover la tapa de la colonia.

4. Dejar caer la tapa en el triplay. Esto desaloja a todas las abejas y escarabajos adheridos a la tapa.
5. Un segundo individuo (el colector de escarabajos) busca los escarabajos entre las abejas a mano con un palo pequeño y colecta todos los escarabajos visibles con un aspirador. Todas las abejas sobre la madera deben ser inspeccionadas ya que los escarabajos se pueden esconder fácilmente debajo de racimos de abejas.
6. Remover el bastidor de un extremo del alza.
7. Sacudir las abejas del bastidor en el triplay.
8. El colector de escarabajos repite el paso 5.
9. Una vez que las abejas han sido sacudidas del bastidor, girar el batidor hacia la cara opuesta.
10. Dejar caer el bastidor contra el triplay para desalojar los escarabajos adultos del panal.

Este paso debe ser repetido de dos a tres veces por ambos lados del bastidor.

11. El colector de escarabajos repite el paso 5.
12. Después que todos los bastidores en una caja han sido examinados, el individuo que manipula la colonia, sacude la caja vacía contra el triplay para remover los PEC restantes. Este paso debe ser repetido para todas las alzas, todos los bastidores y pisos de la colmena.
13. Las abejas acumuladas en el triplay pueden ser sacudidas de la tabla en frente de la colonia re ensamblada, Las abejas regresarán a la colmena.

Notas: Una cierta proporción de PEC adultos pueden permanecer sin ser detectados durante las inspecciones visuales (Neumann y Hoffmann, 2008). Este procedimiento puede ser repetido 2 o 3 veces en un periodo de 24 horas para crear colonias libres de escarabajos para los experimentos.

3.2.3.2. Contando el número y distribución de los escarabajo en colonias recientemente sacrificadas.

Una aproximación más precisa para contar el número de escarabajos en una colonia es examinarlos en colonias recientemente sacrificadas (modificado de Ellis *et al.*, 2003a; Neumann y 2008; Schäfer *et al.*, 2011). Uno puede, presumiblemente, encontrar el 100% de los escarabajos que habitan en la colmena si todos los escarabajos y abejas están muertos. De cualquier forma, estos métodos son fatales para la colonia y son útiles sólo bajo ciertas circunstancias. Uno de los siguientes métodos puede ser usado para realizar conteos absolutos de PEC en colonias dependiendo en qué datos son requeridos y qué facilidades están dadas.

3.2.3.2.1. Sacrificar con nitrógeno líquido.

Es posible sacrificar colonias enteras sumergiéndolas en nitrógeno líquido. Las colmenas tienen que ser manipuladas para permitir el rápido movimiento de aire mientras que se mantienen todas las abejas y escarabajos dentro. Esto puede lograrse con una tapa de malla (1 mm de ancho de malla). Ya que sacrificar con nitrógeno líquido es rápido, la

distribución espacial de las abejas y los escarabajos dentro o sobre el panal permanecerá estable.

1. Colocar un contenedor adecuado, lleno con nitrógeno líquido, junto a la colonia.
2. Instalar la tapa de malla.
3. Sumergir la colonia dentro del nitrógeno.
4. Guardar las colonias en un cuarto frío hasta que sean cuidadosamente disecadas.

Nota: Es muy importante seguir las regulaciones de seguridad para manejar nitrógeno líquido.

3.2.3.2.2. Sacrificar con gasolina

Las colonias también pueden ser sacrificadas con combustible. Este método no requiere la manipulación de la colmena, pero se tiene que estar seguro de que no se lixivie gasolina fuera de la colmena por razones de protección ambiental.

1. Sellar la colmena completa con cinta masking, excepto la tapa.
2. Rápidamente abrir la tapa superior.
3. Colocar 500 ml de gasolina estándar dentro de la colonia.
4. Cerrar la colonia.
5. Guardar en un cuarto frío hasta su disección.

Nota: ¡La gasolina es tóxica para los humanos. Las inspecciones deben ser hechas al aire libre y es altamente recomendado usar máscaras antigás o protecciones similares. Adicionalmente es muy importante estar alerta ya que la gasolina y sus gases son altamente inflamables!

3.2.3.2.3. Sacrificio por congelamiento.

Si están disponibles congeladores de gran volumen, las colonias pueden ser sacrificadas por congelamiento, pero la colocación de la colonia en un cuarto frío o congelador cambiará la distribución de los PEC, debido al resultante enracimado de las abejas.

1. Cerrar todas las entradas de la colonia con cinta, pasto u otro material similar.
2. Colocar las colonias en un congelador (<-20 °C) por 2 semanas para asegurar que todas las abejas en la colonia están muertas. Es muy importante notar que las abejas tienen la capacidad de termoregularse, así que colonias fuertes con reservas (el combustible para la termorregulación) puede morir lentamente. Siempre que sea posible, las colonias deben localizarse en congeladores muy fríos y dejarlas por lo menos dos semanas. Las colonias mantenidas a >-20 °C pueden morir muy lentamente.

Sin importar el método de sacrificio, los PEC en las colonias almacenadas se contabilizan como sigue:

1. Descongelar la colonia a TA por 24h antes de la inspección.
2. Una vez descongelada, remover la tapa de la colonia.
3. Cuidadosamente buscar los escarabajos. Las abejas deben ser removidas para facilitar la visualización de los escarabajos y

el examen cuidadoso de grietas/rendijas.

4. Remover todos los bastidores de la colonia.
5. Inspeccionar cada bastidor en busca de escarabajos.

Esto incluye remover las abejas de los panales, golpeando los bastidores en sus lados para desalojar los escarabajos escondidos en las celdas de cera y capar celdillas de miel para detectar larvas minadoras (Neumann y Hoffmann, 2008). Es importante notar que los escarabajos se unen bajo racimos de abejas en temperaturas frías metiendo la cabeza en celdas vacías(Ellis *et al.* 2003a) así que todos los racimos de abejas deben ser removidas de todas las celdas (esto puede ser hecho usando pinzas) para encontrar cada escarabajo presente en la colmena.

6. Inspeccionar todas las alzas y el fondo buscando escarabajos escondidos.

3.2.3.3. Contar el número de escarabajos y definir su distribución espacial en racimos invernales sacrificados por sumersión en nitrógeno líquido.

Este método fue modificado de Schäfer *et al.* (2011). Es un método preciso para contar el número y determinar la distribución espacial de adultos de SHB dentro de racimos invernales de abejas. Se puede, presumiblemente, encontrar el 100% de los escarabajos hospederos de la colmena. Empero, el método es fatal para la colonia y es útil sólo bajo ciertas circunstancias. Además, requiere la manipulación de

las colmenas y la disponibilidad del nitrógeno líquido y cuarto frío que pueda acomodar las colonias.

1. Colocar las colonias en colmenas sin entradas y con un fondo y tapa enmallados (malla 1 mm de ancho).
2. Transferir las colonias dentro de un cuarto frío a -5 °C y oscuridad constante, para permitir la formación de racimos.
3. Sacrificar las colonias sumergiéndola por completo dentro de nitrógeno líquido (ver sección 3.2.3.2.1.), inmediatamente después sacarlos del cuarto frío.

Esto fijará la distribución espacial de los adultos de *A. tumida* dentro del racimo y mantendrá la estructura del racimo.

4. Dejar las colonias dentro del nitrógeno líquido lo suficiente para matar todas las abejas y escarabajos (1 min por racimo de ~4,000 abejas).
5. Guardar las colonias en un cuarto frío hasta que sean cuidadosamente disecadas.
6. Registrar la posición de los racimos (por ejemplo tomando fotografías) y de cada PEC (todas las abejas deben ser removidas para investigar el fondo de las celdas).

La posición de los PEC puede ser reconocida como sigue: núcleo (=área central del racimo), periferia (=dentro del racimo excepto el área del núcleo) y exterior, cualquier otro lugar dentro de la colonia.

Nota: Es muy importante seguir las regulaciones de seguridad para manejar nitrógeno líquido.

3.2.4. Colectar huevos de PEC.

Este método ha sido diseñado por Ellis y Delaplane (2007).

1. Poner un portaobjetos en una superficie plana.
2. Colocar la mitad de un cubreobjetos en ambos lados del portaobjetos.
3. Colocar otro portaobjeto encima de las mitades de cubreobjetos.

En efecto, se separan dos portaobjetos con un cubreobjetos.

4. Encintar ambos lados de los portaobjetos para que permanezcan juntos.
5. Coloca las láminas en una caja Petri que contenga una pequeña cantidad (5 g) de alimento para PEC (ver sección 3.1.1.1. para la receta)
6. Agregar hembras fecundadas o escarabajos adultos (ver sección 3.1.3.) a la caja Petri y volver a colocar la tapa.
7. Asegure la tapa y la base de la caja Petri uno a otro con cinta adhesiva.

Las hembras del PEC ovopositarán en el espacio entre las dos portaobjetos creado por el cubreobjetos (ver la figura 12).

8. Manipular los huevos con un pincel fino.

Este procedimiento puede ser modificado usando una pieza pequeña de papel encerado (10 cm x 10 cm aprox.) doblado 10 veces (haciendo

carpetas de un 1 cm). Las carpetas deben estar apretadas y los extremos del papel deben ser pegados con una cinta de papel para evitar que se desdoble. Las hembras de PEC ovopositarán entre los dobleces del papel.

3.2.5. Introducir PEC adultos a la colmena.

Ellis *et al.* (2003b) investigaron los impactos de los adultos del PEC en colmenas y la actividad voladora de subespecies Europeas y Africanas de abejas melíferas. Ellos hicieron esto introduciendo individuos de PEC a las colonias. Desarrollaron el método que se describe a continuación para introducir escarabajos adultos a las colonias diariamente.

1. Criar adultos del PEC de acuerdo con el método esbozado en la sección 3.1.3.
2. Estandarizar las colonias antes de los experimentos de acuerdo a los métodos descritos en la revista BEEBOOK en estimación de la fortaleza de la colonia (Delaplane *et al.*, 2013).
3. Colectar adultos de PEC del programa de cría con un aspirador (ver Fig. 6).
4. Coloque el número exacto y sexo (si es necesario observar Fig. 9) de adultos de PEC planeado para cada experimento dentro de pequeños frascos antes de su liberación en la colonia. Los adultos del PEC son mucho más fácil de liberar de un frasco a la colona que por otro método.
5. Las colonias pueden infestarse artificialmente con PEC en

cualquier momento programado (diariamente, semanalmente, etc.) procurando que las infestaciones sean hechas después del atardecer. Los adultos del PEC preferencialmente invaden las colonias durante la tarde-noche (Neumann *et al.* 2012) así que los adultos deben ser introducidos durante estas horas de acuerdo con la región, de 1 a 2 horas antes y después de la puesta del sol. Ellis *et al.* (2003b) introdujeron PEC entre las 17:00 y las 21:00 h.

Para introducir PEC dentro de la colonia, se golpea ligeramente del frasco que contiene los escarabajos para provocar que éstos se vayan al fondo del frasco. Los PEC se mueven rápidamente y pueden escapar fácilmente del frasco una vez que la tapa es removida si no son enviados primero al fondo del vial.

6. Abrir la tapa de la colonia apenas lo suficiente para dejar lugar para agregar los escarabajos.
7. Agregar los adultos al alza más alta de la colmena y cerrar la periferia para evitar reacciones exageradas por parte de las abejas hospedantes ("shock de las abejas": las abejas que son expuestas al PEC, anómala e inmediatamente remueven los escarabajos de las colmenas). Si los escarabajos son soltados en el centro del racimo de abejas, las abejas atacarán a los escarabajos inmediatamente y muchos de ellos pueden dejar la colmena a pocos minutos de la introducción. Los escarabajos no deben ser anestesiados antes de la

introducción a la colmena porque los adultos anestesiados son fácilmente removidos por las abejas adultas.

8. Volver a colocar la tapa inmediatamente después de la introducción del escarabajo.

Modificaciones, usos adicionales, o investigación en mejoras futuras:

- El mismo método puede ser usado para agregar adultos de PEC a colonias completas, núcleos o colmenas de observación. Pueden hacerse modificaciones en las colmenas de observación ya que las éstas comúnmente no se les puede remover la tapa (dependiendo del diseño) (Fig. 14).
- Ellis *et al.* (2003b) agregaron 100 escarabajos/noche por 15 noches (totalizando 1,500 escarabajos).

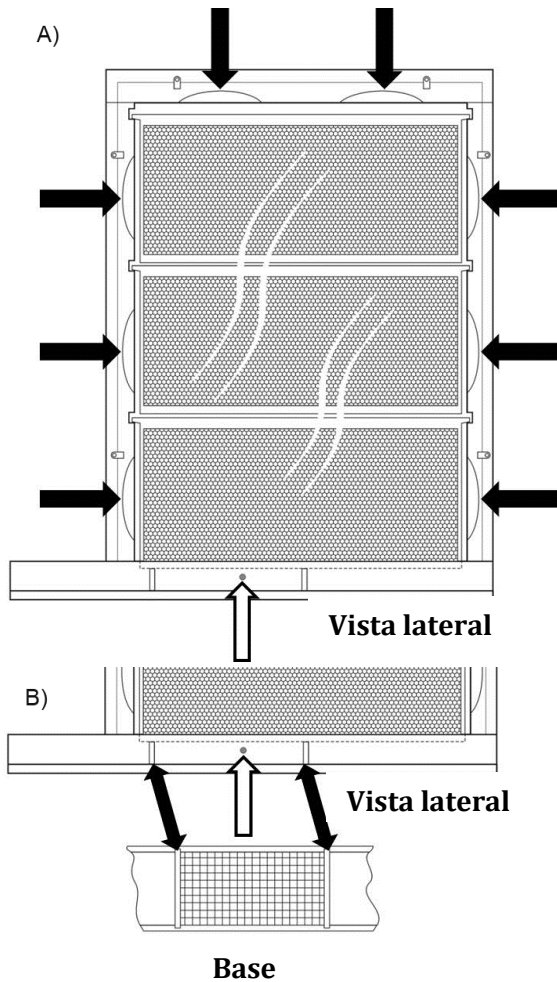


Fig. 14. Diagrama de la colmena de observación modificado usado por Atkinson y Ellis (2011a, b). A. muestra una vista lateral de la colmena de observación. La flecha blanca indica la ubicación en la que los escarabajos se introducen en la colmena de observación, mientras que las flechas negras indican la ubicación de las ocho ranuras (sitios de confinamiento) situados en la periferia de la colmena de observación. Los sitios de confinamiento están presentes en ambos lados, por un total de 16 sitios. Escarabajos invasores son más propensos a ser confinado en estos sitios (facilitando su observación) que en otros lugares en la colmena. B. muestra la placa inferior de la colmena de observación (imagen superior) y una vista superior de la base cuadriculada (zona de ensayo) de la colmena de observación. La flecha blanca indica la ubicación donde los escarabajos o esferas de control pueden ser introducidos en la zona de ensayo. Las flechas negras indican la ubicación de las puertas de cristal acrílico que, cuando se desliza en su lugar, captura a las abejas guardianas en la arena de pruebas.

- Delaplane *et al.*, (2010) agregaron 75-1,200 PEC por introducción cada dos meses para un estudio de umbral de escarabajos. Consecuentemente, el método es usado para simular invasiones crónicas a pequeña escala o invasiones largas y agudas dentro de la colmena.
- Para posibles mejoras futuras, se debe investigar cómo puede liberarse controladamente el PEC en el panal en un largo período de tiempo. El método señalado arriba involucra la adición repentina a la colmena, aumentando la posibilidad de “shock” en las abejas. Las introducciones controladas deben ser un punto de futuras investigaciones.
- Este procedimiento puede ser usado para investigar los impactos del PEC en el comportamiento de la colonia, almacenamiento de miel o polen, cantidad de abejas/cría en el panal, promedio de actividad de vuelo, ganancia de peso de la colonia, reproducción del PEC, migraciones de PEC entre

colonias, etc. Los escarabajos pueden ser criados en el laboratorio, colectados en campo, todos machos, todos hembras, de una cohorte de edad específica, etc. de acuerdo con las necesidades del experimento.

- Neumann y Härtel (2004) investigaron la remoción de larvas de PEC por las colonias de abejas. Introdujeron larvas usando cajas Petri. Dado que las larvas no son ni buenos caminadoras ni tienen la capacidad de adoptar la posición defensiva de “tortuga” de los adultos (Neumann *et al.*, 2001c), las obreras rápidamente las removieron (Neumann y Härtel, 2004).

El Pequeño Escarabajo de la Colmena ya ha establecido poblaciones en Norteamérica y Australia (Neumann y Ellis, 2008) y parecen diseminarse a más áreas (Asia, Sudamérica, Europa) con un potencial efecto devastador en abejas domésticas y posiblemente otras abejas bajo condiciones climáticas favorables. Esto llama a concentrar esfuerzos de la comunidad para el mejor control de esta especie invasiva. Sin embargo, a pesar de este artículo BEEBOOK aún hay brechas importantes en la metodología del Pequeño Escarabajo de la Colmena, así limitando su futuro estudio y control. Esto exige mayor investigación en este campo, por demás pequeño. El desarrollo de tratamientos alternativos con enemigos naturales o un óptimo trampeo de adultos y larvas de PEC en el campo puede constituir futuras y

prometedoras investigaciones. Por otro lado, este escarabajo tiene una biología verdaderamente fascinante y hay un potencial considerable para esparcir luz en numerosas preguntas fundamentales de su ecología y evolución. Nosotros por lo tanto esperamos que este set de métodos estándar atraigan más investigadores a unirse al campo de estudio del PEC, así estimulando la excitante investigación futura en esta especie.

4. Agradecimientos

Dirigimos nuestro aprecio a Geoff Williams y a una referencia anónima por sus comentario constructivos en un borrador primario del manuscrito, así como a Sebastian Spiewok por compartir sus datos sin publicar. La red COLOSS (Prevención de las Pérdidas de Colonias de abejas, por sus siglas en inglés) ayuda a explicar y prevenir pérdidas masivas de colonias de abejas. Fue fundada a través del COST Action FA0803. COST (Cooperación Europea en Ciencias y Tecnología) es un fondo único para los investigadores europeos para desarrollar conjuntamente sus propias ideas y nuevas iniciativas en todas las disciplinas científicas a través de la red trans-europea de actividades de investigación financiadas por cada nación. Basado en una estructura intergubernamental paneuropea para la cooperación en ciencia y tecnología, COST ha contribuido desde su creación, hace más de 40 años, a cerrar la brecha entre ciencia, políticos y sociedad por toda Europa y más allá. COST está respaldada por el Programa de la Séptima Estructura de Estados Unidos para la investigación,

desarrollo tecnológico y actividades de demostración (Diario Oficial (EUA) L412, 30 de diciembre del 2006). La Fundación Europea de la Ciencias como un agente de implementación de COST provee la Oficina de COST a través de un EC Grant Agreement. El Consejo de la Unión Europea provee el Secretariado de COST. La red COLOSS es ahora respaldada por la Fundación Ricola – Nature & Culture.

5. Referencias

- ANDERSON, D L; ROBERTS, J M K (2013) Standard methods for Tropilaelaps mites research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research. Journal of Apicultural Research 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.2> 1
- ARBOGAST, R T; TORTO, B; VAN ENGELSDORP, D; TEAL, P E A (2007) An effective trap and bait combination for monitoring the small hive beetle, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). Florida Entomologist 90(2): 404-406.
- ARBOGAST, R T; TORTO, B; WILLMS, S; FOMBONG, A T; DUEHL, A; TEAL, P E A (2012) Estimating reproductive success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in honey bee colonies by trapping emigrating larvae. Environmental Entomology 41(1): 152-158. <http://dx.doi.org/10.1603/EN11186>
- ATKINSON, E; ELLIS, J D (2011a) Adaptive behaviour of honey bees (*Apis mellifera*) toward beetle invaders exhibiting various levels of colony integration. Physiological Entomology 36: 282-289. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3032.2010.00774.x>
- ATKINSON, E; ELLIS, J D (2011b) Honey bee, *Apis mellifera* L., confinement behaviour toward beetle invaders. Insectes Sociaux 58: 495-503. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-011-0169-7>
- BENDA, N D; BOUCIAS, D; TORTO, B; TEAL P (2008) Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *Aethina tumida* infesting honey bee hives. Journal of Apicultural Research 47(3): 194-201. <http://dx.doi.org/10.3827/IBRA.1.47.3.07>
- BUCHHOLZ, S; SCHÄFER, M O; SPIEWOK, S; PETTIS J S, DUNCAN M, RITTER W, SPOONER-HART R, NEUMANN P (2008) Alternative food sources of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). Journal of Apicultural Research 47(3): 201-208. <http://dx.doi.org/10.3827/IBRA.1.47.3.08>
- DE GRAAF, D C; ALIPPI, A M; ANTÚNEZ, K; ARONSTEIN, K A; BUDGE, G; DE KOKER, D; DE SMET, L; DINGMAN, D W; EVANS, J D; FOSTER, L J; FÜNFHAUS, A; GARCIA-GONZALEZ, E; GREGORC, A; HUMAN, H; MURRAY, K D; NGUYEN, B K; POPPINGA, L; SPIVAK, M; VANENGELSDORP, D; WILKINS, S; GENERSCH, E (2013) Standard methods for American foulbrood research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research. Journal of Apicultural Research 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.11> 1
- DE GUZMAN, L I; PRUDENTE, J A; RINDERER, T E; FRAKE, A M; TUBBS, H (2009) Population of small

- hive beetles (*Aethina tumida* Murray) in two apiaries having different soil textures in Mississippi. *Science of Bee Culture*, 1: 4-8.
- DE GUZMAN, L I; FRAKE, A M; RINDERER, T E; ARBOGAST R T (2011) Effect of height and colour on the efficiency of pole traps for *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Economic Entomology* 104(1): 26-31. <http://dx.doi.org/10.1603/EC10300>
- DE GUZMAN, L I; FRAKE, A M; RINDERER, T E (2012) Marking small hive beetles with thoracic notching: effects on longevity, flight ability and fecundity. *Apidologie* 43: 425-431. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-011-0107-8>
- DELAPLANE, K S; VAN DER STEEN, J; GUZMAN, E (2013) Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>
- DE MIRANDA, J R; BAILEY, L; BALL, B V; BLANCHARD, P; BUDGE, G; CHEJANOVSKY, N; CHEN, Y-P; GAUTHIER, L; GENERSCH, E; DE GRAAF, D; RIBIÈRE, M; RYABOV, E; DE SMET, L VAN DER STEEN, J J M (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>
- DELAPLANE, K S; ELLIS, J D; HOOD, W M (2010) A test for interactions between *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* 103(5): 711-715. <http://dx.doi.org/10.1603/AN09169>
- DIETEMANN, V; NAZZI, F; MARTIN, S J; ANDERSON, D; LOCKE, B; DELAPLANE, K S; WAUQUIEZ, Q; TANNAHILL, C; FREY, E; ZIEGELMANN, B; ROSENKRANZ, P; ELLIS, J D (2013) Standard methods for varroa research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>
- ELLIS, J D (2005) Reviewing the confinement of small hive beetles (*Aethina tumida*) by western honey bees (*Apis mellifera*). *Bee World* 86(3): 56-62.
- ELLIS, J D; DELAPLANE, K S (2006) The effects of habitat type, ApilifeVAR™, and screened bottom boards on small hive beetle (*Aethina tumida*) entry into honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *American Bee Journal* 146(5): 537-539.

- ELLIS, J D; DELAPLANE, K S (2007) The effects of three acaricides on the developmental biology of small hive beetles (*Aethina tumida*). *Journal of Apicultural Research* 46(4): 256-259. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.46.4.08>
- ELLIS, J D; DELAPLANE, K S (2008) Small hive beetle (*Aethina tumida*) oviposition behaviour in sealed brood cells with notes on the removal of the cell contents by European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 47(3): 210-215. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.47.3.09>
- ELLIS, J D; DELAPLANE, K S; HEPBURN, H R; ELZEN, P J (2002a) Controlling small hive beetles (*Aethina tumida* Murray) in honey bee (*Apis mellifera*) colonies using a modified hive entrance. *American Bee Journal* 142(4): 288-290.
- ELLIS J D; DELAPLANE K S, HOOD W M (2002b) Small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) weight, gross biometry, and sex proportion at three locations in the southeastern United States. *American Bee Journal* 142(7):520–522.
- ELLIS, J D; HEPBURN, H R (2006) An ecological digest of the small hive beetle (*Aethina tumida*), a symbiont in honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux* 53: 8-19. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-005-0851-8>
- ELLIS, J D; MUNN, P A (2005) The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86(4): 88–101.
- ELLIS, J D; HEPBURN, H R; DELAPLANE, K S; ELZEN, P J (2003a) A scientific note on small hive beetle (*Aethina tumida*) oviposition and behaviour during European (*Apis mellifera*) honey bee clustering and absconding events. *Journal of Apicultural Research* 42(3): 47-48.
- ELLIS, J D; HEPBURN, H R; DELAPLANE, K S; NEUMANN, P; ELZEN, P J (2003b) The effects of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), on nests and flight activity of Cape and European honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 34: 399-408. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2003038>
- ELLIS, J D; HEPBURN, H R; ELLIS, A M; ELZEN, P J (2003c) Prison construction and guarding behaviour by European honey bees is dependent on inmate small hive beetle density. *Naturwissenschaften* 90: 382-384. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-003-0447-y>
- ELLIS, J D; HEPBURN, H R; ELLIS, A M; ELZEN, P J (2003d) Social encapsulation of the small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) by European honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* 50: 286-291. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-003-0671-7>
- ELLIS, J D; HOLLAND, A J; HEPBURN, H R; NEUMANN, P; ELZEN, P J (2003e) Cape (*Apis mellifera capensis*) and European (*Apis mellifera*) honey bee guard age and duration of guarding small hive beetles (*Aethina tumida*). *Journal of Apicultural Research* 42(3): 32-34.

- ELLIS, J D; HEPBURN, H R; ELZEN, P J (2004a) Confinement behaviour of cape honey bees (*Apis mellifera capensis* Esch.) in relation to population densities of small hive beetles (*Aethina tumida* Murray). *Journal of Insect Behaviour* 17(6): 835-842. <http://dx.doi.org/10.1023/B:JOIR.0000048992.26016.7f>
- ELLIS, J D; HEPBURN, H R; ELZEN P J (2004b) Confinement of small hive beetles (*Aethina tumida*) by Cape honey bees (*Apis mellifera capensis*). *Apidologie* 35(4): 389-396. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004030>
- ELLIS, J D; HEPBURN, H R, LUCKMANN, B; ELZEN, P J (2004c) The effects of soil type, moisture, and density on pupation success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Environmental Entomology* 33(4): 794-798. <http://dx.doi.org/10.1603/0046-225X-33.4.794>.
- ELLIS, J D; DELAPLANE, K S; HOOD, W M (2002a) Small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) weight, gross biometry, and sex proportion at three locations in the south-eastern United States. *American Bee Journal* 142: 520–522.
- ELLIS, J D; NEUMANN, P, HEPBURN, H R; ELZEN, P J (2002b) Longevity and reproductive success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) fed different natural diets. *Journal of Economic Entomology* 95(5): 902-907. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493-95.5.902>
- ELLIS, J D; PIRK, C W W; HEPBURN, H R; KASTBERGER, G; ELZEN, P J (2002c) Small hive beetles survive in honey bee prisons by behavioural mimicry. *Naturwissenschaften* 89: 326-328. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-002-0326-y>
- ELLIS, J D; RICHARDS, C S; HEPBURN, H R; ELZEN, P J (2003f) Oviposition by small hive beetles elicits hygienic responses from Cape honey bees. *Naturwissenschaften* 90(11): 532-535. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-003-0476-6>
- ELLIS, J D; RICHARDS, C S; HEPBURN, H R; ELZEN, P J (2004d) Hygienic behaviour of Cape and European *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) toward *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) eggs oviposited in sealed bee brood. *Annals of the Entomological Society of America* 97(4): 860-864. [http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[0860:HBOCAE\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[0860:HBOCAE]2.0.CO;2)
- ELLIS, J D; RONG, I H; HILL, M P; HEPBURN, H R; ELZEN, P J (2004e) The susceptibility of small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) pupae to fungal pathogens. *American Bee Journal* 144(6): 486-488.
- ELLIS, J D; SPIEWOK, S; DELAPLANE, K S; BUCHHOLZ, S; NEUMANN, P; TEDDERS, L (2010) Susceptibility of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) larvae and pupae to entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology* 103(1): 1-9. <http://dx.doi.org/10.1603/EC08384>

- ELZEN, P J; BAXTER, J R; WESTERVELT, D; RANDALL, C; DELAPLANE, K S; CUTTS, L; WILSON, W T (1999) Field control and biology studies of a new pest species, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae), attacking European honey bees in the Western Hemisphere. *Apidologie* 30: 361-366. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19990501>
- ELZEN, P J; BAXTER, J R; NEUMANN, P; SOLBRIG, A J; PIRK, C W W; HEPBURN, H R; WESTERVELT, D; RANDALL, C (2001) Behaviour of African and European subspecies of *Apis mellifera* toward the small hive beetle, *Aethina tumida*. *Journal of Apicultural Research* 40: 40-41.
- EYER, M ; CHEN, Y P ; SCHÄFER, M O; PETTIS, J; NEUMANN, P (2009a) Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honey bee viruses. *Apidologie* 40: 419-428. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2008051>
- EYER, M ; CHEN, Y P ; SCHÄFER, M O; PETTIS, J; NEUMANN, P (2009b) Honey bee sacbrood virus infects adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Apicultural Research* 48(4): 296-297. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.48.4.11>
- EVANS, J D; PETTIS, J S; SHIMANUKI, H (2000). Mitochondrial DNA relationships in an emergent pest of honey bees: *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) from the United States and Africa. *Annals of the Entomological Society of America* 93: 415-420. [http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746\(2000\)093\[0415:MDRIAE\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[0415:MDRIAE]2.0.CO;2)
- EVANS, J D; PETTIS, J S; HOOD, H; SHIMANUKI, H (2003). Tracking an invasive honey bee pest: Mitochondrial DNA variation in North American small hive beetles. *Apidologie*. 34: 103-109. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2003004>
- EVANS, J D; SPIEWOK, S; TEIXEIRA, E W; Neumann, P (2008) Microsatellite loci for the small hive beetle, *Aethina tumida*, a nest parasite of honey bees. *Molecular Ecology Resources* 8: 698–700. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.02052.x>
- EVANS, J D; SCHWARZ, R S; CHEN, Y P; BUDGE, G; CORNMANN, R S; DE LA RUA, P; DE MIRANDA, J R; FORET, S; FOSTER, L; GAUTHIER, L; GENERSCH, E; GISDER, S; JAROSCH, A; KUCHARSKI, R; LOPEZ, D; LUN, C M; MORITZ, R F A; MALESZKA, R; MUÑOZ, I; PINTO, M A (2013) Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11>
- FALUSH, D; STEPHENS, M; PRITCHARD, J K (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7 (4): 574-

578.<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>

FREUDE, H; HARDE, K W; LOHSE, G A (1967) Die Käfer Mitteleuropas, Goecke und Evers, Krefeld, 72 pp.

GRECO, M K; HOFFMANN, D; DOLLIN, A; DUNCAN, M; SPOONER-HART, R; NEUMANN, P (2010) The alternative Pharaoh approach: stingless bees mummify beetle parasites alive. *Naturwissenschaften* 97: 319-323. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-009-0631-9>

HALCROFT, M; SPOONER-HART, R; NEUMANN, P (2011) Behavioral defense strategies of the stingless bee, *Austroplebeia australis*, against the small hive beetle, *Aethina tumida*. *Insectes Sociaux* 58: 245-253. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-010-0142-x>

HEPBURN, H R; RADLOFF, S E (1998) Honey bees of Africa. Springer Verlag; Berlin, Germany.

HOFFMANN, D; PETTIS, J S; NEUMANN, P (2008) Potential host shift of the small hive beetle (*Aethina tumida*) to bumble bee colonies (*Bombus impatiens*). *Insectes Sociaux* 55: 153–162. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-008-0982-9>

HOOD, W M (2004) The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review. *Bee World* 85: 51–59.

HUMAN, H; BRODSCHNEIDER, R; DIETEMANN, V; DIVELEY, G; ELLIS, J; FORSGREN, E; FRIES, I; HATJINA, F; HU, F-L; JAFFÉ, R; JENSEN, A B;

KÖHLER, A; MAGYAR, J; ÖZIKRIM, A; PIRK, C W W; ROSE, R; STRAUSS, U; TANNER, G; TARPY, D R; VAN DER STEEN, J J M; VAUDO, A; VEJSNÆS, F; WILDE, J; WILLIAMS, G R; ZHENG, H-Q (2013) Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>

JENSEN, A B; ARONSTEIN, K; FLORES, J M; VOJVODIC, S; PALACIO, M A; SPIVAK, M (2013) Standard methods for fungal brood disease research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.13>

KÖHLER, A; NICOLSON, S W; PIRK, C W W (2013) A new design for honey bee hoarding cages for laboratory experiments. *Journal of Apicultural Research* 52(2): 12-14. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.03>

KOLMES, S A (1985) An information-theory analysis of task specialization among worker honey bees performing hive duties. *Animal Behaviour* 33: 181-187.

LOUNSBERRY, Z; SPIEWOK, S; PERNAL, S F; SONSTEGARD, T S; HOOD, W M; PETTIS, J S; NEUMANN,

- P; EVANS, J D (2010) Worldwide diaspora of the small hive beetle, *Aethina tumida*, a nest parasite of honey bees, *Apis mellifera*. *Annals of the Entomological Society of America* 103: 671-677. <http://dx.doi.org/10.1603/AN10027>
- LUNDIE, A E (1940) The small hive beetle *Aethina tumida*. *Science Bulletin* 220: Department of Agriculture and Forestry, Government Printer; Pretoria, South Africa. 30 pp.
- MEIXNER, M D; PINTO, M A; BOUGA, M; KRYGER, P; IVANOVA, E; FUCHS, S (2013) Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.05>
- MORITZ, R F A; CREWE, R M; HEPBURN, H R (2001) Attraction and repellence of workers by the honey bee queen (*Apis mellifera* L.). *Ethology* 107: 465-477. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0310.2001.00681.x>
- MURILHAS, A M (2005) *Aethina tumida* arrives in Portugal. Will it be eradicated? *EurBee Newsletter* 2: 7-9.
- MURRAY, A (1867) List of Coleoptera received from Old Calabar, on the west coast of Africa. *The Annals and Magazine of Natural History* 19: 167.
- MUERRLE, T M; NEUMANN, P (2004) Mass production of small hive beetles (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Apicultural Research* 43(3): 144-145.
- MUERRLE, T M; NEUMANN, P; DAMES, J F; HEPBURN, H R; HILL, M P (2006) Susceptibility of adult small hive beetle to entomopathogenic fungi. *Journal of Economic Entomology* 99: 1-6. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493\(2006\)099\[0001:SOAATC\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493(2006)099[0001:SOAATC]2.0.CO;2)
- NEUMANN, P; HÄRTEL, S (2004) Removal of small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) eggs and larvae by African honey bee colonies (*Apis mellifera* *scutellata* Lepeletier). *Apidologie* 35: 31-36. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2003058>
- NEUMANN, P; ELLIS, J D (2008) The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae): distribution, biology and control of an invasive species. *Journal of Apicultural Research* 47(3): 180-183. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.47.3.01>
- NEUMANN, P; ELZEN, P J (2004) The biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, Coleoptera: Nitidulidae): Gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie* 35: 229-247. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004010>
- NEUMANN, P; RITTER, W (2004) A scientific note on the association of *Cychramus luteus* (Coleoptera: Nitidulidae) with honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 35: 665-666. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004051>

- NEUMANN, P; HOFFMANN, D (2008) Small hive beetle diagnosis and control in naturally infested honey bee colonies using bottom board traps and CheckMite+ strips. *Journal of Pest Science* 81: 43–48. <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-007-0183-8>
- NEUMANN, P; PIRK, C W W; HEPBURN, H R; EELZEN, P J; BAXTER, J R (2001a) Laboratory rearing of small hive beetle, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Apicultural Research* 40: 111-112.
- NEUMANN, P; PIRK, C W W; HEPBURN, H R; RADLOFF, S E (2001b) A scientific note on the natural merger of two honey bee colonies (*Apis mellifera capensis*). *Apidologie* 32: 113-114. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2001116>
- NEUMANN, P; PIRK, C W W; HEPBURN, H R; SOLBRIG, A J; RATNIEKS, F L W; ELZEN, P J; BAXTER, J R (2001c) Social encapsulation of beetle parasites by Cape honey bee colonies (*Apis mellifera capensis* Esch.). *Naturwissenschaften* 88: 214–216. <http://dx.doi.org/10.1007/s001140100224>
- NEUMANN, P; RADLOFF, S E; PIRK, C W W; HEPBURN, H R (2003) The behaviour of drifted Cape honey bee workers (*Apis mellifera capensis*): predisposition for social parasitism? *Apidologie* 34: 585-590. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2003048>
- NEUMANN, P; HOFFMANN, D; DUNCAN, M; SPOONER-HART, R; PETTIS, J S (2012) Long-range dispersal of small hive beetles. *Journal of Apicultural Research* 51(2): 214-215. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.2.11>
- PEAKALL, R; SMOUSE, P E (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6 (1): 288-295. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- PENG, C; WILLIAMS, R N (1990a) Multiple-species rearing diet for sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae). *Annals of the Entomological Society of America* 83(6): 1155-1157.
- PENG, C; WILLIAMS, R N (1990b) Pre-oviposition period, egg production and mortality of six species of hibernating sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Entomological Science* 25(3): 453-457.
- PETTIS, J S; SHIMANUKI, H (2000) Observations on the small hive beetle, *Aethina tumida*, Murray, in the United States, *American Bee Journal* 140, 152-155.
- PIRK, C W W (2002) Reproductive conflicts in honey bee colonies. PhD thesis, Department of Zoology & Entomology, Rhodes University, South Africa.
- PIRK, C W W; NEUMANN, P (2013) Small hive beetles are facultative predators of adult honey bees. *Journal of Insect Behaviour* 26:

<http://dx.doi.org/10.1007/s10905-013-9392-6>

PIRK, C W W; DE MIRANDA, J R; FRIES, I; KRAMER, M; PAXTON, R; MURRAY, T; NAZZI, F; SHUTLER, D; VAN DER STEEN, J J M; VAN DOOREMALEN, C (2013) Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.1> 3

RÖSCH, G A (1925) Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. 1. Teil: Die Tätigkeiten im normalen Bienenstaate und ihre Beziehungen zum Alter der Arbeitsbienen. Zeitschrift für vergleichende Physiologie 2: 571-631.

SCHÄFER, M O; PETTIS, J S; RITTER, W; NEUMANN, P (2008) A scientific note on quantitative diagnosis of small hive beetles, *Aethina tumida*, in the field. Apidologie 39: 564-565. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2008038>

SCHÄFER, M O; PETTIS, J S; RITTER, W; NEUMANN, P (2010a) Simple small hive beetle diagnosis. American Bee Journal 150: 371-372.

SCHÄFER, M O; RITTER, W; PETTIS, J S; NEUMANN, P (2010b) Small hive beetles, *Aethina tumida*, are vectors of *Paenibacillus* larvae. Apidologie 41: 14-20. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2009037>

SCHÄFER, M O; RITTER, W; PETTIS, J S; NEUMANN, P (2011) Concurrent

parasitism alters thermoregulation in honey bee (Hymenoptera: Apidae) winter clusters. Annals of the Entomological Society of America 104(3): 476-482 <http://dx.doi.org/10.1603/AN10142>

SCHEINER, R; ABRAMSON, C I; BRODSCHNEIDER, R; CRAILSHEIM, K; FARINA, W; FUCHS, S; GRÜNEWALD, B; HAHSHOLD, S; KARRER, M; KOENIGER, G; KOENIGER, N; MENZEL, R; MUJAGIC, S; RADSPIELER, G; SCHMICKLI, T; SCHNEIDER, C; SIEGEL, A J; SZOPEK, M; THENIUS, R (2013) Standard methods for behavioural studies of *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.0> 4

SCHMOLKE, M D (1974) A study of *Aethina tumida*: the small hive beetle. University of Rhodesia Certificate in Field Ecology Project Report, 178 pp.

SOLBRIG, A J (2001) Interaction between the South African honey bee, *Apis mellifera capensis* Esch., and the small hive beetle, *Aethina tumida* Murray. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, Institut für Zoologie, Berlin, Germany.

SOMERVILLE, D (2003) Study of the small hive beetle in the USA. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, Australian Capital Territory. 57 pp.

- SPIEWOK, S; NEUMANN, P (2006a) Infestation of commercial bumble bee (*Bombus impatiens*) field colonies by small hive beetles (*Aethina tumida*). *Ecological Entomology* 31: 623-628. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2311.2006.00827.x>
- SPIEWOK, S; NEUMANN, P (2006b) Cryptic low-level reproduction of small hive beetles in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* 45(1): 47-48 <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.45.1.1>
- SPIEWOK S; NEUMANN, P (2012) Sex ratio and dispersal of small hive beetles. *Journal of Apicultural Research* 51(2): 216-217. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.2.1>
- SPIEWOK, S; PETTIS, J, DUNCAN, M; SPOONER-HART, R; WESTERVELT, D; NEUMANN, P (2007) Small hive beetle, *Aethina tumida*, populations I: Infestation levels of honey bee colonies, apiaries and regions. *Apidologie* 38: 595–605. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2007042>
- SPIEWOK, S; DUNCAN, M, SPOONER-HART, R; PETTIS, J S; NEUMANN P (2008) Small hive beetle, *Aethina tumida*, populations II: dispersal of small hive beetles. *Apidologie* 39: 683–693. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2008054>
- STEDMAN, M (2006) Small hive beetle (PEC): *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae). Government of South Australia. Primary Industries and Resources for South Australia. Factsheet 03/06: 13 pp.
- STRAUSS, U (2009) Small hive beetle (*Aethina tumida*) behaviour in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Honours thesis, Social Insect Research Group, Department of Zoology and Entomology, University of Pretoria, South Africa.
- WALSH, P S; METZGER, D A; HIGUCHI, R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10(4): 506-513.
- WARD, L; BROWN, M; NEUMANN, P; WILKINS, S; PETTIS, J S; BOONHAM, N (2007) A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetles (*Aethina tumida*). *Apidologie* 38: 289-295. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2007004>
- WILLIAMS, G R; ALAUX, C; COSTA, C; CSÁKI, T; DOUBLET, V; EISENHARDT, D; FRIES, I; KUHN, R; MCMAHON, D P; MEDRZYCKI, P; MURRAY, T E; NATSOPOULOU, M E; NEUMANN, P; OLIVER, R; PAXTON, R J; PERNAL, S F; SHUTLER, D; TANNER, G; VAN DER STEEN, J J M; BRODSCHNEIDER, R (2013) Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research*. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.0>