

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 57, No 2 (2006)



Evaluation of a thymol formulation efficacy against *Varroa destructor* under Central Greek climatic conditions

N. BACANDRITSOS (N. ΜΠΑΚΑΝΔΡΙΤΣΟΣ), I. PAPANASTASIOU (I. ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ)

doi: [10.12681/jhvms.15013](https://doi.org/10.12681/jhvms.15013)

To cite this article:

BACANDRITSOS (N. ΜΠΑΚΑΝΔΡΙΤΣΟΣ) N., & PAPANASTASIOU (I. ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ) I. (2017). Evaluation of a thymol formulation efficacy against *Varroa destructor* under Central Greek climatic conditions. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 57(2), 107–115. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15013>

Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας σκευάσματος θυμόλης εναντίον του *Varroa destructor* στις κλιματολογικές συνθήκες της Κεντρικής Ελλάδος

N. Μπακανδρίτσος, I. Παπαναστασίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Το ακαρεοκτόνο σκεύασμα, που έχει ως κύρια δραστικά ουσία τη θυμόλη σε συνδυασμό με ευκαλυπτέλαιο, μενθόλη και καμφορά, αξιολογήθηκε για την αποτελεσματικότητά του για δύο συνεχόμενα έτη (2002 και 2003) την περίοδο 25 Μαΐου έως 25 Ιουνίου σε μελίσσια στην περιοχή της Λοκρίδος (Κεντρική Ελλάδα), όπου οι θερμοκρασίες το καλοκαίρι είναι συχνά υψηλές. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυσικά προσβεβλημένα μελίσσια με περίπου ισοδύναμη πληθυσμιακή πυκνότητα. Το σκεύασμα τοποθετήθηκε στο πάνω μέρος των πλαισίων με συχνότητα εφαρμογής μία δόση κάθε 15 ημέρες (δύο επαναλήψεις). Η μέση τιμή της αποτελεσματικότητας του σκευάσματος ήταν $90,5\% \pm 1,0$ και $90,6\% \pm 0,8$ για το 2002 και 2003, αντίστοιχα. Το έτος 2002, για το χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκε το πείραμα, η μέση θερμοκρασία περιβάλλοντος κυμάνθηκε από $17,0^\circ\text{C}$ έως $27,0^\circ\text{C}$, ενώ για το έτος 2003 κυμάνθηκε από $16,3^\circ\text{C}$ έως $27,5^\circ\text{C}$. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην ευρύτερη περιοχή της Κεντρικής Ελλάδος, σε μελίσσια που έγινε εφαρμογή του σκευάσματος θυμόλης στην αρχή του καλοκαιριού, η αποτελεσματικότητα ήταν $90,5\%$ με ελάχιστες ενοχλήσεις και μελισσοτοξικότητα. Επίσης, στην περίπτωση που μία ημέρα νωρίτερα τοποθετηθεί το $1/20$ της δόσης, η ενόχληση των μελισσών σχεδόν μηδενίζεται, διότι με αυτόν τον τρόπο οι μέλισσες εξοικειώνονται με τη νέα μυρωδιά που εισάγεται στην κυψέλη.

Λέξεις ευρετηρίασης: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, θυμόλη, βερμικουλίτης, καμφορά, ευκαλυπτέλαιο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το άκαρι *Varroa destructor* (Anderson και Trueman, 2000) αποτελεί ένα πολύ σοβαρό παράσιτο της *Apis mellifera* και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ζημιές στα μελίσσια σε σχέση με άλλες ασθένειες. Από τότε που πρωτοεμφανίστηκε, άρχισε η αντιμετώπισή του με

Evaluation of a thymol formulation efficacy against *Varroa destructor* under Central Greek climatic conditions

Bacandritsos N., Papanastasiou I.

ABSTRACT. The acaricidal formulation based on thymol crystals (main active ingredient) in combination with eucalyptus oil, menthol and camphor crystals was evaluated for its efficacy for two consecutive years (2002 and 2003) the period from 25th May to 25th June. The experimental apiaries are located in Locrida (Central Greece) where the temperatures during summer are usually high. Naturally infected by the mite *Varroa destructor* bee colonies with similar population were used. The formulation was placed on the upper part of the frames at a rate of one dose every 15 days for two times. The average value of the formulation efficacy was $90.5\% \pm 1.0$ and $90.6\% \pm 0.8$ for 2002 and 2003, respectively. In 2002 the temperature in the area where the experiment took place ranged from 17.0°C up to 27.0°C , while in 2003 it ranged from 16.3°C up to 27.5°C . The results showed that when the bee colonies were treated with two tablets, one every 15 days at the beginning of the summer, the efficacy of the thymol formulation was 90.5% with minimal side effects and toxicity. Additionally, at the beginning of its use, the observed bee agitation at the hive entrance can be reduced by placing $1/20$ of the dosage one day before the main treatment.

Key words: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, thymol, vermiculite, thymol, camphor, eucalyptus

INTRODUCTION

Varroasis is a disease that bees have infected by the mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman 2000), which causes very serious damages in apiaries. Since it appeared, it was dealt with various chemical acaricidal and insecticidal substances. The use of these synthetic

διάφορες συνθετικές ακαρεοκτόνες και εντομοκτόνες ουσίες. Λόγω της εφαρμογής αυτών των ακαρεοκτόνων ουσιών δημιουργήθηκαν προβλήματα υπολειμματικότητας στα προϊόντα της κυψέλης (κερί και μέλι) (Bogdanov και συν. 1998, Trasyvoulou 1998, Wallner 1999), καθώς και εμφάνιση ανθεκτικότητας του ακάρεως (Lodesani και συν. 1995, Milani 1999, Elzen και συν. 2000, Spreafico και συν. 2001).

Στην προσπάθειασιμοποίησης ακαρεοκτόνων ουσιών, οι οποίες δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον και τα προϊόντα της κυψέλης, εφαρμόστηκαν κυρίως οι φυσικές ουσίες (θυμόλη, μενθόλη, καμφορά και αιθέρια έλαια από citronella, ευκάλυπτο, ρίγανη και λεβάντα), καθώς και ορισμένα οργανικά οξέα (γαλακτικό, μυρμηκικό και οξαλικό). Οι φυσικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένες ή σε μείγματα, με μεγαλύτερη έμφαση στη θυμόλη που έχει αρκετά υψηλή αποτελεσματικότητα εναντίον της βαρροϊκής ακαριάσης στην Ευρώπη και την Αμερική (Giordani 1977, Grobov και συν. 1981, Mautz 1982, Mikityuk 1983, Pinzauti και συν. 1987, Hoppe και Ritter 1989, Colin 1990, Lodesani και συν. 1990, Frilli και συν. 1991, Rickli και συν. 1991, Liebig και συν. 1992, Var Der Steen 1992, Moosbeckhofer 1993, Mutinelli και συν. 1993, Imdorf και συν. 1994, Calderone και Spivac 1995, Imdorf και συν. 1995, Gregore και Jelenc 1996, Higes και Liorente 1997, Loglio και συν. 1997, Bacandritsos 1998, Colombo και Spreafico 1999, Mattila και Otis 1999, Lindberg και συν. 2000, Mattila και συν. 2000, Bacandritsos και Lolos 2000, Bacandritsos και συν. 2002a, Bacandritsos και συν. 2002b).

Πλακίδια απορροφητικού υλικού (βερμικουλίτης), εμποτισμένα με μείγμα θυμόλης, ευκαλυπτέλαιου, μενθόλης και καμφοράς, έχουν δοκιμαστεί από τους Imdorf και συν. (1994, 1995) με αρκετά ικανοποιητική αποτελεσματικότητα. Οι Liakos και Thrasyvoulou (2002), σε ερευνητική εργασία που έγινε στη Θεσσαλονίκη (Βόρεια Ελλάδα), αναφέρουν υψηλή αποτελεσματικότητα και αμελητέα μελισσοτοξικότητα του σκευάσματος θυμόλης σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Οι Bogdanov και συν. (1998) αναφέρουν ότι τα επίπεδα των υπολειμμάτων θυμόλης στο μέλι και στο κερί δεν αυξάνονται με την αύξηση του αριθμού των εφαρμογών με το σκεύασμα θυμόλης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας του ακαρεοκτόνου σκευάσματος που έχει ως δραστικές ουσίες τη θυμόλη, το ευκαλυπτέλαιο, τη μενθόλη και τη καμφορά σε μελίσσια στις κλιματολογικές - μελισσοκομικές συνθήκες της κεντρικής Ελλάδος, όπου οι θερμοκρασίες το καλοκαίρι είναι συχνά υψηλές.

acaricidal lead to accumulation of these substances in bee products (Bogdanov et al. 1998, Thrasyvoulou 1998, Wallner 1999). Also, another serious problem was that in many areas the mite populations became resistant to chemicals (Lodesani et al. 1995, Milani 1999, Elzen et al. 2000, Spreafico et al. 2001).

For the above reasons natural substances, such as thymol, menthol, essential oil from citronella, eucalyptus, oregano and lavender, were used either solitarily or in mixtures. Greater emphasis was given to thymol against Varroasis in Europe and America (Giordani 1977, Grobov et al. 1981, Mautz 1982, Mikityuk 1983, Pinzauti et al. 1987, Hoppe and Ritter 1989, Colin 1990, Lodesani et al. 1990, Frilli et al. 1991, Rickli et al. 1991, Liebig et al. 1992, Var Der Steen 1992, Moosbeckhofer 1993, Mutinelli et al. 1993, Imdorf et al. 1994, Calderone and Spivac 1995, Imdorf et al. 1995, Gregore and Jelenc 1996, Higes and Liorente 1997, Loglio et al. 1997, Bacandritsos 1998, Colombo and Spreafico 1999, Mattila and Otis 1999, Bacandritsos and Lolos 2000, Lindberg et al. 2000, Mattila et al. 2000, Bacandritsos et al. 2002a, Bacandritsos et al. 2002b).

The efficacy of vermiculite tablets impregnated with thymol, menthol, camphor and essential oil of eucalyptus was found to be high (Imdorf και συν. 1994, Imdorf και συν. 1995). Liakos and Thrasyvoulou (2002) referred that the winter application of the thymol formulation in apiaries located in Thessaloniki (North Greece) were very high with unimportant toxicity. Also, it is worth noting that the residue level of thymol in the hive's products (wax and honey) did not increase using the thymol formulation (Bogdanov et al. 1998).

The purpose of the present study was to investigate the efficacy of the acaricidal formulation with thymol crystals in combination with eucalyptus oil, menthol and camphor crystals to honey bees under climatic-apiary conditions of Central Greece, where temperatures during summer are usually high.

MATERIALS AND METHODS

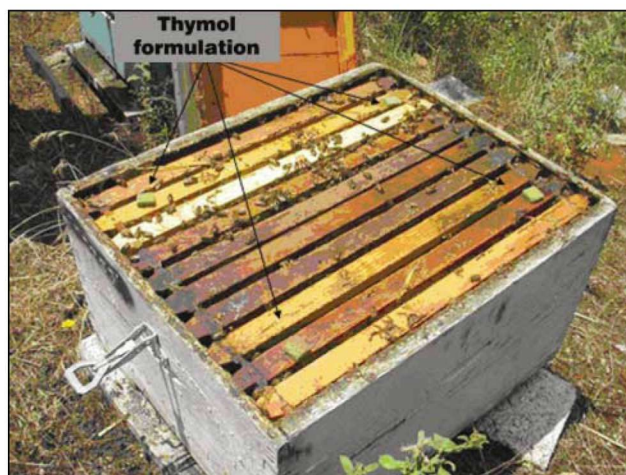
The experiment took place in the region of district Lokrida (Central Greece) from 25th May to 1st July in 2002 and 2003. Each year, two experimental groups and one control group were used. The distance between the experimental groups was 1.000 m, while the distance between each experimental group and the control group was 500 m. That position aimed at avoiding a possible bee gathering in terminal colonies (drift effect). The experimental groups were treated with the thymol formulation [vermiculite tablets (75 mm X 45 mm X 5 mm) with 74.08% thymol crystals, 16% eucalyptus essential oil, 3.7% menthol crystals and 3.7% camphor

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή της Επαρχίας Λοκρίδος (Κεντρική Ελλάδα) από την 25η Μαΐου έως την 1η Ιουλίου τα έτη 2002 και 2003 σε μελίσσια προσβεβλημένα από το *V. destructor*. Για κάθε έτος χρησιμοποιήθηκαν δυο πειραματικές ομάδες μελισσιών, οι οποίες απείχαν μεταξύ τους 1.000 m και μία ομάδα μάρτυρας, η οποία απείχε 500 m από κάθε πειραματική ομάδα. Σκοπός της υπάρχουσας απόστασης ήταν η αποφυγή του φαινομένου της υπερ-συγκέντρωσης μελισσών στα ακριανά μελίσσια (παράπλυνση). Στις πειραματικές ομάδες έγινε εφαρμογή με το σκεύασμα θυμόλης [πλακίδια απορροφητικού υλικού-vermiculite (διαστάσεων 75 mm X 45 mm X 5 mm), εμποτισμένα με μείγμα κρυσταλλικής θυμόλης 74,08%, ευκαλυπτέλαιου 16%, κρυσταλλικής μενθόλης 3,7% και κρυσταλλικής καμφοράς 3,7%, αεροστεγώς κλεισμένα σε φακέλους αλουμινόχαρτου]. Το έτος 2002 η κάθε ομάδα αποτελείτο από 6 μελίσσια και το έτος 2003 από 8 μελίσσια της φυλής *Apis mellifera macedonica*. Τα μελίσσια ήταν εγκατεστημένα σε κυψέλες τύπου Langstroth των 10 πλαισιών. Ο πληθυσμός των ενήλικων μελισσών κάλυπτε και τα 10 πλαίσια.

Οι κυψέλες είχαν κινητή βάση με δικτυωτό πλέγμα και κατάλληλη υποδοχή για συρταρωτή λαμαρίνα. Στην άνω επιφάνεια της λαμαρίνας είχε γίνει επάλειψη με βαζελίνη. Ο αερισμός της κυψέλης γινόταν μόνο από την είσοδό της, καθώς οι οπές που φέρει το καπάκι της κυψέλης ήταν σφραγισμένες. Από τη βάση της κυψέλης ο αερισμός ήταν ελάχιστος λόγω της συρταρωτής λαμαρίνας. Πέντε ημέρες πριν από την έναρξη του πειράματος, οι βασιλίσσες τοποθετήθηκαν σε βασιλικά κλουβιά με αποτέλεσμα κατά τη διάρκεια του πειράματος να υπάρχουν καλυμμένα κελιά εργατογόνου για επτά ημέρες και κηφηνογόνου για δέκα ημέρες. Τέσσερις ημέρες πριν την τελευταία μέτρηση για το σκεύασμα θυμόλης οι βασιλίσσες αφέθησαν ελεύθερες.

Ο αλουμινένιος φάκελος αποσφραγιζόταν και ο εμποτισμένος βερμικουλίτης χωριζόταν σε τέσσερα (4) ισομεγέθη τεμάχια τα οποία τοποθετήθηκαν στις τέσσερις γωνίες της κυψέλης (Εικόνα 1). Η εφαρμογή του σκευάσματος έγινε σε κάθε μελίσσι δύο συνεχόμενες φορές, μία φορά κάθε δεκαπέντε (15) ημέρες. Στους μάρτυρες τοποθετήθηκαν στις τέσσερις γωνίες της κυψέλης ισομεγέθη τεμάχια μη εμποτισμένου βερμικουλίτη. Το βράδυ της προηγούμενης ημέρας (24η Μαΐου) από την έναρξη του πειράματος τοποθετήθηκε εντός των πειραματικών κυψελών τεμάχιο ίσο με το 1/20 του πλακιδίου του σκευάσματος. Σκοπός αυτής της ενέργειας ήταν η εξοικείωση των μελισσών στη νέα οσμή και η μείωση των ενοχλήσεων των μελισσών στο ελάχιστο (Bacandritsos 1998).



Εικόνα 1. Τρόπος τοποθέτησης του σκευάσματος θυμόλης σε προσβεβλημένο μελίσσι (αυθεντική φωτογραφία).

Figure 1. Way of placing the thymol formulation into an infected bee colony (original photo).

crystals hermetically closed in aluminum foil]. In 2002 the groups consisted of six (6) honeybee *Apis mellifera macedonica* colonies, while in 2003 consisted of eight (8) colonies. All the bee colonies were in Langstroth hives with 10 frames, which were almost covered by adult bees.

The hives were equipped with a removable bottom board. On the base's top had a wire screen and underneath was the staple for the sliding metal-plate. The iron plate was covered with vaseline in order to trap the falling mites. The ventilation of the hive was minimized and took place only from the entrance, because the holes of the hive cover were closed. The air flow from the bottom board was minimal due to the metal-plate. Five days before the experiment the queens were placed into queen cages. During the experiment there were sealed worker brood for the first seven days and sealed drone brood for the first ten days. Four days before the last mite counting of the thymol formulation the queens were released.

The vermiculite tablets were unpacked and separated in four (4) equal pieces, which were placed above the frames at the four corners of the hive (Figure 1). Colonies were treated two times-one every 15 days. In the control groups, same pieces of non steeped vermiculite were placed at the four corners of the hive. The previous night (24th May) before the day of the first treatment a piece equal to 1/20 of the tablet was placed in the experimental hives in order to accustom the bees to the scent of the tablets (Bacandritsos 1998).

In order to establish the final mites left after the treatment period, all colonies were treated with coumaphos on the 30th (24th June) day and with amitraz on the 33rd

Τα φάρμακα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι δραστικές ουσίες coumafos και amitraz, οι οποίες εφαρμόστηκαν την 30η (24 Ιουνίου) και την 33η (27 Ιουνίου) ημέρα, αντίστοιχα. Η εφαρμογή του διαλύματος coumafos έγινε με ψεκασμό, ενώ του amitraz με ταινίες συτπόχαρτου διαστάσεως 3 cm X 12 cm X 0.2 cm. Σε κάθε πειραματικό μελίσσι τοποθετήθηκαν δύο, εμποτισμένες με το amitraz, ταινίες αφού παρέμειναν για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Για τον υπολογισμό και την αξιολόγηση της δράσης του σκευάσματος θυμόλης καταμετρήθηκαν τα κατακρημνισμένα ακάρεα στον πυθμένα της κυψέλης. Αρχικά έγινε συλλογή των υπολειμμάτων από τη λαμαρίνα της κυψέλης και έπειτα διαχωρισμός των ακάρεων με διαλυτοποίηση της βαζελίνης με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη (βενζίνη) (Bacandritsos 1998). Η καταμέτρηση των ακάρεων έγινε κάθε 15 ημέρες (την 9η Ιουνίου και την 24η Ιουνίου) για την εφαρμογή του σκευάσματος και στο τέλος του πειράματος (την 1η Ιουλίου) μετά την εφαρμογή των coumafos και amitraz. Τα κατακρημνισμένα ακάρεα που μετρήθηκαν στο τέλος του πειράματος αντιπροσωπεύουν το σύνολο των βαρρόα που είχαν απομείνει στο μελίσσι μετά τη θεραπεία με το σκεύασμα θυμόλης. Η αποτελεσματικότητα των coumafos και amitraz εκτιμήθηκε βάσει δοκιμών που έγιναν σε πειραματικά κυψελίδια στο εργαστήριο με περίπου 500 μέλισσες. Μετά την εφαρμογή των δύο ουσιών οι μέλισσες θανατώθηκαν, μετρήθηκαν τα ακάρεα που είχαν απομείνει στις μέλισσες και υπολογίστηκε η αποτελεσματικότητα των coumafos και amitraz, η οποία ήταν κοντά στο 100%.

Για τη διαπίστωση της συμπεριφοράς του μελισσιού γινόταν μακροσκοπικός έλεγχος του μελισσιού τις πρώτες ώρες αμέσως μετά την τοποθέτηση του σκευάσματος θυμόλης, καθώς και τρεις φορές ημερησίως τις τρεις πρώτες ημέρες από την εφαρμογή του.

Η αποτελεσματικότητα του σκευάσματος θυμόλης υπολογίστηκε βάσει του παρακάτω τύπου:

$$E\% = (V_T \times 100) / (V_T + V_C)$$

E%: Αποτελεσματικότητα

V_T: Παγιδευμένα ακάρεα μετά από χρήση του σκευάσματος θυμόλης

V_C: Παγιδευμένα ακάρεα μετά από χρήση των φαρμάκων για τον έλεγχο (coumafos και amitraz)

Για τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων που αφορούν στην ποσοστιαία (%) αποτελεσματικότητα του σκευάσματος θυμόλης στην καταπολέμηση του *V. destructor*, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία ανάλυσης των διακυμάνσεων ως προς έναν παράγοντα (ONE-WAY ANOVA). Για λόγους επίτευξης κανονικότητας των πειραματικών δεδομένων έγινε γωνιακός μετασχηματισμός σύμφωνα με τη σχέση

(27th June) day. Coumafos solution was administrated by spraying and amitraz solution with steeped paper strips (dimension 3 cm X 12 cm X 0.2 cm). The strips, before using, remained outside the solution for 4 hours in room temperature. In each colony two strips were placed.

For the calculation and evaluation of the efficacy of the thymol formulation a counting of the falling mites, which were trapped in the sliding metal plate at the hive bottom covered with vaseline, took place. The counting of the trapped mites was done after the collection of the debris and the dissolution of the vaseline with gasoline (Bacandritsos 1998). The collection of the trapped mites was done just before the next application of the formulation (9th and 24th June). The mite counting of the control colonies took place at the end of the experiment (1st July). The evaluation of the control drugs' (coumafos and amitraz) efficacy based on tests that took place in the lab using experimental nuclei with approximately 500 infected bees. After the treatment the bees were killed. The number of mites not killed by coumafos and amitraz were counted and the efficacy found to be very close to 100%.

In order to check any side effect on the behavior of the bees, the colonies were macroscopically observed at the first hour right after the formulation placing and three times daily the first three days after applications.

The efficacy was calculated for all experimental groups based on the type below:

$$E\% = (V_T \times 100) / (V_T + V_C)$$

E%: Efficacy

V_T: Trapped mites after the use of the thymol formulation

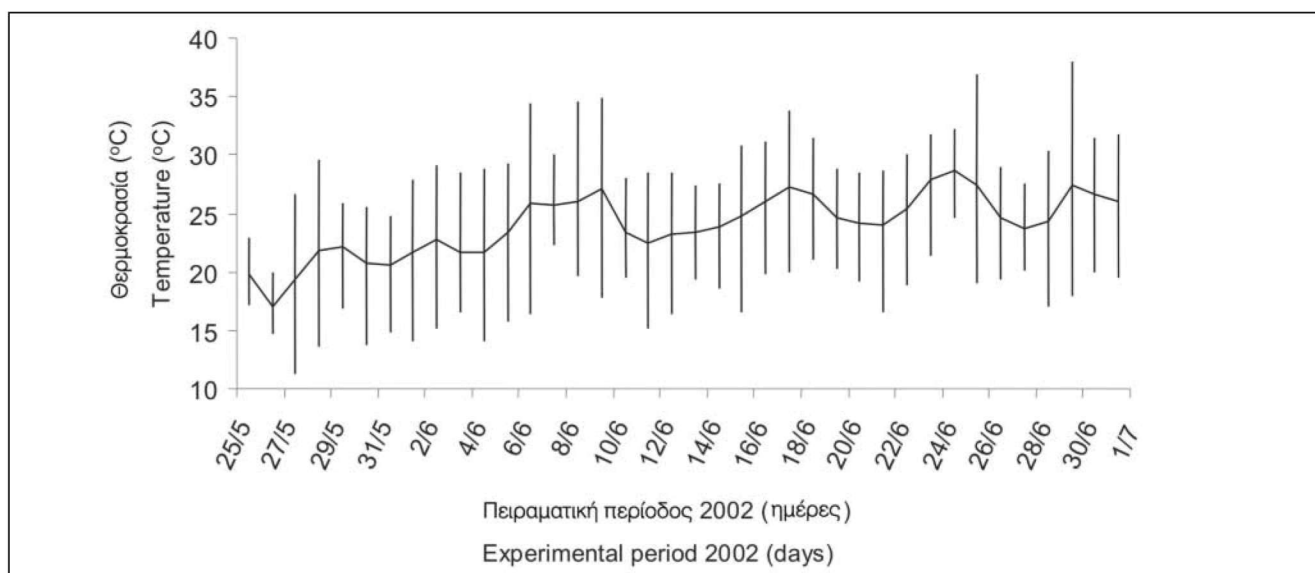
V_C: Trapped mites after the use of controlling medicine (coumafos and amitraz)

Analysis of variance test (ONE-WAY ANOVA) was applied to the experimental data (efficacy percentages of thymol formulation against *V. destructor*) with the program MS – STATGRAPHICS Plus Ver. 2.1. Before analysis, efficacy percentages were angular transformed according to the algorithm $x_1 = \arcsen(x)^{0.5}$. The level of significance was $\alpha = 5\%$.

During the experiment the rates of the outside temperature were recorded with HOB0 H8 data logger (Figures 2 and 3).

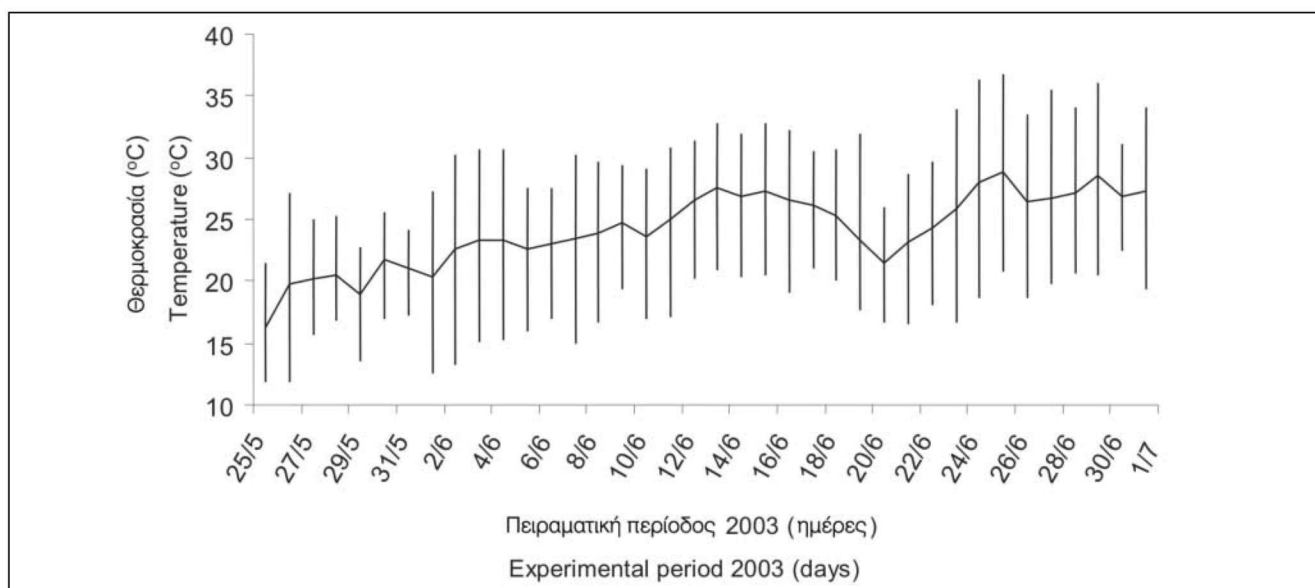
RESULTS

Analytical data (efficacy (%)) of the thymol formulation for the experimental bee-colonies and the group mean value (\pm s.e.) in 2002 and 2003 are presented in Table 1.



Εικόνα 2. Ημερήσιες θερμοκρασίες (μέση τιμή) τη χρονική περίοδο 25/5/2002 έως 1/7/2002 στην ευρύτερη περιοχή της Επαρχίας Λοκρίδος (Κεντρική Ελλάδα). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τις μέγιστες και ελάχιστες τιμές.

Figure 2. Daily temperatures (mean value) during the period from 25/5/2002 to 1/7/2002 in the region of district Lokrida (Central Greece). The vertical bars indicate the maximum and the minimum temperature values.



Εικόνα 3. Ημερήσιες θερμοκρασίες (μέση τιμή) τη χρονική περίοδο 25/5/2003 έως 1/7/2003 στην ευρύτερη περιοχή της Επαρχίας Λοκρίδος (Κεντρική Ελλάδα). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τις μέγιστες και ελάχιστες τιμές.

Figure 3. Daily temperatures (mean value) during the period from 25/5/2003 to 1/7/2003 in the region of district Lokrida (Central Greece). The vertical bars indicate the maximum and the minimum temperature values.

$X_I = \text{τοξ}/[\eta\mu(\text{αποτελεσματικότητα})^{0.5}]$. Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATGRAPHICS Plus Ver. 2.1 και οι έλεγχοι υπόθεσης έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα έτη 2002 και 2003 έγινε καταγραφή των ημερήσιων τιμών της εξωτερικής θερμοκρασίας με τη χρήση ψηφιακού καταγραφικού HOBO H8 (Εικόνες 2 και 3).

In 2002 the efficacy of the first group ranged from 87.1% to 94.3% with a mean value $90.3\% \pm 1.4$. The second group's efficacy ranged from 85.0% to 94.6% with a mean value $90.7\% \pm 1.4$. The next year, the first group's efficacy ranged from 85.8% to 94.1% with a mean value $90.5\% \pm 1.5$, while the second from 85.2% to 94.8% with a mean value $91.7\% \pm 1.5$.

The natural mite drop-down of the control honeybee

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η αποτελεσματικότητα του σκευάσματος θυμόλης για κάθε πειραματικό μελίσσι, καθώς και η μέση τιμή κάθε πειραματικής ομάδας (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) για τα έτη 2002 και 2003 φαίνονται στον Πίνακα 1.

Το έτος 2002 στην πρώτη ομάδα η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου κυμάνθηκε από 87,1% μέχρι 94,3% με μέσο όρο $90,3\% \pm 1,4$, ενώ η δεύτερη ομάδα έδωσε αποτελεσματικότητα από 85,0% μέχρι 94,6% με μέσο όρο $90,7\% \pm 1,5$. Το επόμενο έτος η πρώτη ομάδα έδωσε αποτελεσματικότητα από 85,8% μέχρι 94,1% με μέσο όρο $90,5\% \pm 1,5$ και η δεύτερη ομάδα από 85,2% μέχρι 94,8% με μέσο όρο $91,7\% \pm 1,5$.

Η φυσική θνησιμότητα στους μάρτυρες το έτος 2002 κυμάνθηκε από 9,2% μέχρι 11,7% με μέσο όρο $10,6 \pm 0,4\%$, ενώ το έτος 2003 ήταν παρόμοια με τιμές από 5,6% μέχρι 14,2% και μέσο όρο $8,5 \pm 1,2\%$.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (ANOVA, Tukey-HSD intervals test) έδειξε ότι η αποτελεσματικότητα των δύο πειραματικών ομάδων που βρίσκονταν σε απόσταση 1.000 m για τα έτη 2002 ($p=0,8129$) και 2003 ($p=0,4493$) δεν διέφερε μεταξύ τους. Επίσης, η αποτελεσματικότητα μεταξύ των δύο ετών πειραματισμού ($p=0,9737$) για κάθε μία από τις δύο ομάδες δεν διέφερε σημαντικά. Σημαντική όμως είναι η διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων και της ομάδας των μαρτύρων ($p<0,001$) και στα δύο έτη πειραματισμού.

Στη διάρκεια εφαρμογής του σκευάσματος η μέγιστη ημερήσια θερμοκρασία που σημειώθηκε για το έτος 2002 ήταν $34,8^{\circ}\text{C}$ (τη 16η ημέρα του πειράματος) και η ελάχιστη $11,2^{\circ}\text{C}$ (την 3η ημέρα του πειράματος) (Εικόνα 2). Στο έτος 2003 σημειώθηκε μέγιστο $33,9^{\circ}\text{C}$ (την τελευταία ημέρα του πειράματος) και ελάχιστο $11,8^{\circ}\text{C}$ (την 1η ημέρα του πειράματος) (Εικόνα 3). Οι μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες κυμάνθηκαν για το 2002 από $17,8^{\circ}\text{C}$ έως $27,8^{\circ}\text{C}$, ενώ για το 2003 από $16,3^{\circ}\text{C}$ έως $27,5^{\circ}\text{C}$.

Πριν το πείραμα και κατά τη διάρκεια αυτού δεν εκδηλώθηκαν φαινόμενα σηπουρογίας. Από τη μακροσκοπική παρατήρηση για χρονικό διάστημα μίας έως μιάμισης ώρας από την τοποθέτηση του σκευάσματος, τα μελίσσια έδειχναν ελαφρώς ενοχλημένα και οι πτήσεις των μελισσών μπροστά από την κυψέλη ήταν περισσότερες από αυτές που παρατηρήθηκε στους μάρτυρες. Ο αριθμός των νεκρών μελισσών από τη χρήση του σκευάσματος ήταν πολύ μικρός.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η δράση του σκευάσματος θυμόλης, σε συνδυασμό με το ευκαλυπτέλαιο, τη μενθόλη και τη καμφορά εναντίον του πολύ σημαντικού εκτοπαράσιτου *V. destructor* των μελισσιών στις πειραματικές ομάδες για δύο συνε-

Πίνακας 1. Αποτελεσματικότητα (%) του σκευάσματος θυμόλης για κάθε πειραματικό μελίσσι τα έτη 2002 και 2003.

Table 1. Efficacy (%) of the thymol formulation for each bee-colony the years 2002 and 2003.

Έτος Year	Μελίσσι Bee colony	Ομάδες - Groups		
		1	2	Μάρτυρας Control
2002	1	94,3	94,4	11,6
	2	94,0	94,6	9,6
	3	87,1	91,8	10,9
	4	91,2	89,2	10,5
	5	87,7	89,3	11,7
	6	87,3	85,0	9,2
	mean \pm s.e.	90,3 \pm 1,4	90,7 \pm 1,5	10,6 \pm 0,4
2003	1	85,8	88,6	14,2
	2	90,4	91,5	12,6
	3	94,1	85,2	11,7
	4	93,5	94,4	11,9
	5	94,1	90,3	5,6
	6	87,3	93,8	6,6
	7	87,6	94,8	6,0
	8	86,6	91,4	9,2
	mean \pm s.e.	90,5 \pm 1,5	91,7 \pm 1,5	8,5 \pm 1,2

colonies for the year 2002 ranged from 9.2% to 11.7% with a mean value $10.6\% \pm 0.4$, while in 2003 ranged from 5.6% to 11.9% with a mean value $8.5\% \pm 1.2\%$.

The statistical analysis of the data (ANOVA, Tukey-HSD intervals test) showed that the efficacy for the two groups, which were 1.000 m in distance for 2002 ($p=0.8129$) and for 2003 ($p=0.4493$), were not significant different. Also, no statistically significant difference was found in the efficacy between the two experiment years of experimenting ($p=0.9737$), which didn't differ significantly at a significance level of $\alpha=0.05$. A statistically significant difference was observed between treatment groups and the control group ($p<0.001$) in both years of the experiment.

During the treatments, the maximum daily temperature noted for 2002 was 34.8°C (the 16th day of the experiment) and the minimum was 11.2°C (the 3rd day of the experiment) (Figure 2). In 2003 the maximum temperature was 33.9°C (the last day of the experiment) and the minimum was 11.8°C (the 1st day of the experiment) (Figure 3). The average daily temperatures ranged for 2002 from 17.8°C to 27.8°C , while for 2003 it was from 16.3°C up to 27.5°C .

Before and during the experiment no swarming effects were observed. The microscopical observation revealed that during the first hours of the treatments the bees appeared slightly annoyed and the flights in front

χόμενα έτη (2002 και 2003), μπορεί να χαρακτηριστεί αρκετά ικανοποιητική (90,6%). Παρατηρήθηκε, όμως, μία διακύμανση της αποτελεσματικότητας από μελίσι σε μελίσι από 7 έως 10% περίπου. Αυτή η διαφορά στην αποτελεσματικότητα μπορεί να οφείλεται στη διαφοροποίηση του ρυθμού εξάτμισης της θυμόλης (Imdorf και συν. 1995, Liakos και Thrasyvoulou 2002), η οποία δεν ήταν πολύ έντονη πιθανόν λόγω των μικρών διαφορών της θερμοκρασίας εκτός και εντός της κυψέλης (Εικόνες 2 και 3). Στη Βόρεια Ελλάδα κατά τη χειμερινή περίοδο (Νοέμβριος) οι Liakos και Thrasyvoulou (2002) αναφέρουν αρκετά πιο έντονη διακύμανση στην αποτελεσματικότητα όμοιας σύνθεσης σκευάσματος θυμόλης (72,6% έως 98,8% με μέσο όρο 91,15%). Υψηλή διακύμανση στην αποτελεσματικότητα διαπίστωσαν στην Ιταλία οι Mutinelli και συν. (1996) με τιμές από 51,5% έως 68,7% και οι Marinelli και συν. (2002) τα έτη 1999, 2000 και 2001 από 74,0% έως 98,0%. Στην Αμερική, στην περιοχή της Γεωργίας, σε συγκριτική μελέτη των Ellis και συν. (2001) το ίδιο σκεύασμα θυμόλης έδωσε αποτελεσματικότητα από 65,2% έως 97,1%.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, τις ημέρες που επικράτησαν θερμοκρασίες άνω των 30°C (Εικόνες 2 και 3) παρατηρήθηκε ότι αρκετές μέλισσες (σχεδόν διπλάσιες από αυτές του μάρτυρα) βρίσκονταν στη σάβδα πτήσης και αέριζαν την κυψέλη. Αυτή η αντίδραση των μελισσών πιθανόν να οφείλεται στις υψηλές εξωτερικές θερμοκρασίες που συνέβαλαν σε εντονότερη εξάτμιση της θυμόλης. Η θνησιμότητα των μελισσών λόγω της εφαρμογής του σκευάσματος ήταν μικρή και χωρίς σημασία για την υγεία του μελισσιού.

Σύμφωνα με τους Imdorf και συν. (1994), Bacandritsos (1998) και Bacandritsos και Lolos (2000), οι καλύτερες θερμοκρασίες για την εφαρμογή των φυσικών ουσιών είναι μεταξύ 15°C και 24°C. Αναφορικά με τις νυκτερινές θερμοκρασίες έχει διαπιστωθεί ότι όταν αυτές είναι κάτω από 12°C μειώνεται αισθητά η αποτελεσματικότητα (Imdorf και συν. 1994). Επίσης, οι Marinelli και συν. (2002), σε μελέτη σχετικά με την εφαρμογή σκευασμάτων θυμόλης για τον έλεγχο της βαρροϊκής ακαρίωσης, αναφέρουν ότι οι θερμοκρασίες εφαρμογής θα πρέπει να κυμαίνονται από 15°C έως 35°C. Όταν οι θερμοκρασίες είναι μικρότερες από 15°C ή μεγαλύτερες από 35°C, η εξάχνωση της δραστικής ουσίας μπορεί αντίστοιχα να μειωθεί ή να αυξηθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να επιδράσει αρνητικά στο μελίσι και στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Οι Liakos και Thrasyvoulou (2002) αναφέρουν αποτελεσματικότητα 95,2% με θερμοκρασία (μέση τιμή) στους 18°C.

Η συνδυασμένη χρησιμοποίηση των συγκεκριμένων φυσικών ουσιών (θυμόλη, ευκαλυπτέλαιο, μενθό-

of the beehive, comparing with those of the control, were more than usual. The number of the dead bees due to thymol formulation treatment was unimportant.

DISCUSSIONS - CONCLUSIONS

The application of the thymol formulation, in combination with eucalyptus oil, menthol and camphor crystals on infected bee colonies by the ectoparasite *V. destructor* located in Central Greece for two continuous years (2002 and 2003) in summer period, found to be quite effective (90.6%). The data revealed differences in efficiency among the colonies with a range of 8-10% approximately. These differences may have happened due to the fluctuations of the thymol evaporation (Imdorf et al. 1995, Liakos and Thrasyvoulou 2002), which was mediocre probably due to the slight differences on the inside and outside of the hive temperature. In North Greece (November) Liakos and Thrasyvoulou referred stronger differences in efficacy (between 72.6% and 98.8% with mean value 91.15%). In Italy, Mutinelli et al. (1996) achieved efficacy between 51.5% and 68.7%, while Marinelli et al. (2002) the years 1999, 2000 and 2001 between 74.0% and 98.0%. A comparative study of Ellis et al. (2001) conducted in Georgia (USA) reported between 65.2% and 97.1%.

During the experimental period, when the temperature was above 30°C (Figures 2 and 3), there were many adults bees (almost double individuals comparing with the control hives) in the front entrance trying to ventilate the hive. This action probably happened because of the strong thymol evaporation caused by the high temperatures. The bee mortality during the experiment was unimportant.

According to Imdorf et al. (1994), Bacandritsos (1998) and Bacandritsos and Lolos (2000), the best temperatures for the application of natural substances were between 15°C and 24°C. Referring to the night temperatures it is observed that when the temperature is under 12°C, the efficacy is strongly reduced (Imdorf 1994). Furthermore, Marinelli et al. (2002) in their study, relevant to the application of thymol formulation against varroa, referred that the appropriate temperatures should be from 15°C up to 35°C. When the temperature is over 35°C, the evaporation of the active ingredient is faster with unfavorable consequences to the bees. On the other hand, if it is lower than 15°C, the evaporation is reduced causing a decrease in the efficacy of the formulation. In North Greece, Liakos and Thrasyvoulou (2002) referred that the thymol formulation efficacy was 95.2%, when the average temperature was higher than 18°C, if two tablets were used every 12 days.

λη και καμφορά) ενισχύουν τη δυνατότητα που έχουν οι μελισσοκόμοι να αποφεύγουν ή τουλάχιστον να μειώσουν μέχρι και να υποκαταστήσουν τη χρησιμοποίηση χημικών εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων και παράλληλα να απολαμβάνουν τις ευεργετικές επιδράσεις των παραπάνω φυσικών ουσιών επί άλλων ασθενειών των μελισσών (τραχειακή ακαρίαση) (Ellis και Baxendale 1997, Mattila και Otis 1999). Επίσης, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ενεργού μορίου (της θυμόλης) είναι τέτοια ώστε λαμβάνοντας υπόψιν τα χρονικά όρια υπολειμματικότητας δεν δημιουργούνται προβλήματα υπολειμμάτων στα προϊόντα της κυψέλης, καθώς και προβλήματα ανθεκτικότητας των στελεχών του βαρρόα, όπως συμβαίνει με τις συνθετικές ακαρεοκτόνες ουσίες (Chattière και συν. 1998). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν σε προσβεβλημένα μελίσσια η εφαρμογή του σκευάσματος θυμόλης γίνει στην αρχή του καλοκαιριού στη συνιστώμενη δόση, η αποτελεσματικότητα είναι της τάξεως του 90,5%, δηλαδή αρκετά ικανοποιητική. Επιπρόσθετα, οι ενοχλήσεις που παρατηρήθηκαν στην αρχή της εφαρμογής μπορεί να μειωθούν στο ελάχιστο εάν μία ημέρα πριν τη θεραπεία τοποθετηθεί στην κυψέλη το 1/20 της συνιστώμενης δόσης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε μερικώς από το πρόγραμμα "Αντιμετώπιση της βαρρόϊκής ακαρίασης με τη χρήση φυσικών ουσιών" του Υπουργείου Αγρ. Ανάπτυξης & Τροφίμων (Καν. 1221/97). □

Consequently, treatment with this formula, based on the combination of specific natural substances, is an alternative and easy way that beekeepers have in order to control varroasis. The importance using it against *V. destructor* is great, because beekeepers have the capability to avoid or at least to reduce the use of chemical insecticides and acaricides. At the same time the beekeeper takes advantage of the beneficial affects of the natural substances against other diseases (tracheal mites) (Ellis and Baxendale 1997, Mattila and Otis 1999). Also, it is very important the fact that, because of the characteristics of the active thymol molecule, there are no resistance bee problems and residues in honey and wax (Chattière et al. 1998). The results showed that, when the bee colonies treated with two tablets every 15 days at the beginning of the summer, the efficacy was 90.5% with minimal side effects. Additionally, at the beginning of its use, the observed bee agitation at the hive entrance can be reduced by placing 1/20 of the dosage one day before the main treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by the research program entitled "Control of varroosis with the use of natural substances" of the Greek Ministry of rural development and food (Reg 1221/97). □

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Anderson DL & Trueman JWH (2000). *Varroa jacobsoni* (acari: Varroidae) is more than one species. Experimental and Applied Acarology 24:165-189.
- Bacandritsos N (1998). Control of mite diseases of honey bees without use of pesticides. PhD thesis; Agricultural University of Athens, Greece:134 pp.
- Bacandritsos N & Lolos P (2000). Preliminary tests in controlling varroasis by using natural substances under real conditions. Agricultural Research 23(1): 25-30.
- Bacandritsos N, Papanastasiou I & Papadopoulos G (2002a). The use of essential oils as treatment against the mite *Varroa destructor*. In: Proceedings of the 1st Hellenic Scientific Conference in Apiculture-Sericulture, Athens, Greece, 2002: 451-458.
- Bacandritsos N, Papanastasiou I & Papadopoulos G (2002b). The use of essential oils as treatment against the mite *Varroa destructor*. In: Abstracts book of the 9th Hellenic Veterinary Congress, Hellenic Veterinary Medical Society, Thessaloniki, Greece, 2002:305.
- Bogdanov S, Kilchenmann V, Imdorf A & Fluri P (1998). Acaricide residues in some bee products. J. Apic. Res. 37:57-67
- Calderone NW & Spivak M (1995). Plant extracts for control of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), in colonies of the western honeybee (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 88: 1211-1215.
- Chattière JD, Imdorf A, Kilchenmann V, Bachofen B & Bogdanov S (1998). Comment faire face à la recrudescence des *Varroa* résistants? Communications de la section apiculture No 28. Station Federal de Recherches Laitières (FAM) Section Apiculture, Liebefeld – Berne (CH).
- Colin ME (1990). Olii essenziali di labiati per il controllo della Varroasi nelle api domestiche. Apitalia. Translated from the English J. Appl. Ent. 110: 19-25.
- Colombo M & Spreafico M (1999). Esperienze di lotta a *Varroa jacobsoni* Oud. con un nuovo formulato a base di timolo. La Selezione Veterinaria 7: 473-478.
- Ellis MD & Baxendale FP (1997). Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when allpied as fumigants. J. Econ. Intimal 90(5): 1087-1091.
- Ellis JD, Delaphane KS & Hood WM (2001). Efficacy of a bottom screen device, Apistan and Apilife VAR, in controlling *Varroa destructor*. Am Bee J. 141:813-816.
- Elzen PJ, Baxter JR, Spivak M & Eilson WT (2000). Control of *Varroa jacobsoni* Oud. Resistant to fluvalinate and amitraz using cumaphos. Apidologie 31: 437-441.
- Frilli F, Milani N, Barbattini R, Greatti M, Chiesa F, Iob M & D'Arango M. (1991). Prove di lotta contro *Varroa jacobsoni* con diversi prodotti ad effetto acaricida : efficacia e tollerabilità da

- parte delle api. Atti Conv.Naz. "Stato attuale e sviluppo della ricerca in apicoltura", Sassari, 25-26 ottobre: 79-85.
- Giordani G (1977). Varroatosi o Varroasi – Quaderni di documentazione a cura della F.A.I. Apimondia, Bucharest 12 pp.
- Gregorc A & Jelenc J (1996). Control of *Varroa jacobsoni* Oud. In honey bee colonies using Apilife var. Zbornik Veterinarske Fakultete Univerza Ljubljana. 33:2, 231-235.
- Grobov OF, Mikityuk VV, Gousseva LN (1981). Le thymol, substance à spectre large d'activité. *Apiacta* 16: 64-65.
- Higes M & Llorente J (1997). Thymol. Tests of efficacy in the control of Varroasis in honey production colonies. *Vida-Apicola* 81:14-17.
- Hoppe H & Ritter W (1989). Comparative examinations for the control of Varroasis by means of etherial oils. *Apidologie* 20: 522-523.
- Imdorf A, Kichenman V, Maquelin C & Bogdanov S (1994). Optimierung der Anwendung von 'Apilife VAR' zur Bekämpfung von *Varroa jacobsoni* Oud in Bienenvölkern. *Apidologie* 25: 49-60.
- Imdorf A, Bogdanov S, Kichenman V & Maquelin C (1995). Apilife VAR: a new Varroacide with thymol as the main ingredient. *Bee World* 76: 77-83.
- Liakos V & Thrasyvoulou A (2002). Investigation onto the effectiveness and toxicity of Apilife-var formulation. In: Proceedings of the 1st Hellenic Scientific Conference in Apiculture-Sericulture, Athens, Greece, 2002:398-405.
- Liebig GP, Herter G & Herter H (1992). Raporto dell'istituto regionale per la scienza delle api in Honenheim per l'anno 1991. Sperimentazione. "Apilife VAR" Cura delle api 3: 80-81.
- Lindberg CM, Melathopoulos AM & Winstin ML (2000). Laboratory evaluation of mite miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *J. Econ. Entomol.* 93: 189-198.
- Lodesani M, Bergomi S, Pellicani A, Carpana E & Rabitti T (1990). A comparative on the efficacy of some products for controlling Varroa and determinations of their residues. *Apicoltura* 6: 105-130.
- Lodesani M, Colombo M & Spreafico M (1995). Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud. In several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* 26: 67-72.
- Loglio G, Tallarini A & Mazza G (1997). Lotta alla varroa con Apilife-VAR e Perizzin: tre anni di esperienze. *Apicoltore Moderno* 88(1): 17-26.
- Marinelli E, de Pace FM, Richi L & Persano Oddo L (2002). Tre anni di utilizzo di Apilife VAR contro la varroa nel Lazio. *Apitalia* 2-3: 25-29.
- Mattila HR & Otis GW (1999). Trials of Apiguard, a thymol based miticide. Part 1. Efficacy for control of parasitic mites and residues in honey. *American Bee Journal*, 139: 947-952.
- Mattila HR, Otis GW, Daley J & Schulz T (2000). Trials of Apiguard, a thymol based miticide. Part 2. Non-target effects on honey bees. *American Bee Journal* 140: 68-70.
- Mautz D (1982). Untersuchungen zur Bienengefährlichkeit von Thymol. *Apidologie* 13: 103-104.
- Mikityuk VV (1983). Efficacy of thymol against Varroa disease. *Veterinaria* 1: 43-44.
- Milani N (1999). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to acaricides. *Apidologie* 30: 229-234.
- Moosbeckhofer R (1993). Versuche mit 'Api-life-VAR' zur Bekämpfung der Varroamilbe. *Bienenwelt*, 35(7):161-166.
- Mutinelli F, Irsara A, Cremasco S & Piro R (1993). Utilizzo di Apilife VAR sul vassoio di fondo per il controllo della Varroasi. *Apicoltore Moderno* 84: 111-117.
- Mutinelli F, Cremasco S, Irsara A, Baggio A, Nanetti A & Massi S (1996). Acidi organici and Apilife VAR nel controllo della Varroasi in Italia. *Apicoltore Moderno* 87(3): 99-104.
- Pinzauti M, Frediani D & Biondi C (1987). Controllo dell'infestazione determinata da *Varroa jacobsoni*. *Agricoltura Meditanea* 4:70-79.
- Rickli M, Imdorf A & Kilchenmann V (1991). Varroa-Bekämpfung mit Komponenten von ätherischen Ölen. *Apidologie* 22: 417-421.
- Trasyvoulou A (1998). Resistance of the mite *Varroa jacobsoni* to fluvalinate. In: Abstracts Book, Beekeeping meeting, Greece, 1998.
- Van der Steen J (1992). Der Effekt einer Mischung ätherischer Öle auf die Varroainfektion in Bienenvölkern. *Apidologie* 23: 383-385.
- Spreafico M, Eördegh FR, Bernardinelli I & Colombo M (2001). First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie* 32:49-56.
- Wallner K (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30: 235-248.