

JORNADA MALAGUEÑA DE APICULTURA

asociación MALAGUEÑA de apicultores



www.mieldemalaga.com

CASA MUSEO
DE LA MIEL DE MÁLAGA

www.museodelamiel.com

Antequera, 14 de febrero de 2009



XI

TOLERANCIA A VARROOSIS

PILAR DE LA RÚA TARÍN

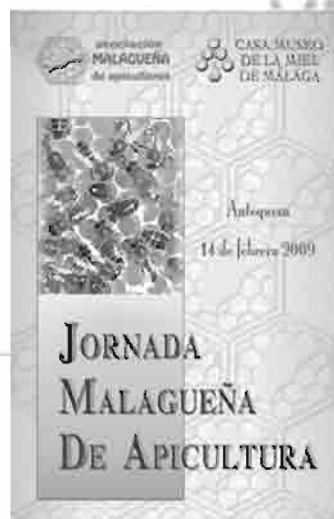
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Veterinaria

Teléfono: 968.36.49.08

E-mail: pdelarua@um.es

RESULTADOS PRELIMINARES DEL ESTUDIO MOLECULAR DE LA TOLERANCIA A LA VARROOSIS DE ABEJAS IBÉRICAS



Dra. Pilar de la Rúa Tarín

Área de Biología Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad de Murcia

PROGRAMA NACIONAL DE MEDIDAS DE AYUDA A LA APICULTURA (ORDEN APA 565/2006 DEL 16 DE FEBRERO)



- × Línea f: Colaboración con organismos especializados en la realización de programas de investigación aplicada en el sector de la apicultura y de los productos procedentes de la apicultura
- × Línea Prioritaria 3: Nuevos tratamientos contra enfermedades que reduzcan la posibilidad de residuos en miel

-
- × Presentación del proyecto
 - × Características generales de la varroosis
 - × Herramientas moleculares
 - × Perfil genético del ácaro ectoparásito *Varroa destructor* en la Península Ibérica
 - × Variación genética de las pupas de *Apis mellifera iberiensis* relacionada con la sensibilidad higiénica ante varroa
 - × Próximos análisis

CONTROL BIOLÓGICO DE *VARROA DESTRUCTOR* PARA REDUCIR LOS RIESGOS DE RESIDUOS INHERENTES A LOS TRATAMIENTOS CONTRA ESTE ÁCARO: SELECCIÓN DE POBLACIONES DE *APIS MELLIFERA IBERIENSIS* TOLERANTES AL PARÁSITO Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE DICHO PROCESO.

- × Selección de poblaciones de *Apis mellifera iberiensis* tolerantes a *Varroa destructor*



- × Caracterización molecular del proceso de selección de poblaciones de *Apis mellifera iberiensis* tolerantes a la varroosis



OBJETIVOS

- × Reducción de los residuos inherentes a los tratamientos frente al ácaro *Varroa*, utilizando la selección genética de abejas tolerantes al parásito, las cuales necesitarían menos tratamientos químicos:
 - + Estudio de diferentes características biológicas que inducen la tolerancia de las abejas melíferas *Apis mellifera iberiensis* a *Varroa destructor*.
 - + Selección de líneas de abejas con una mayor tolerancia natural al ácaro *Varroa destructor*.
 - + Mantenimiento e incremento de las poblaciones de abejas seleccionadas por su tolerancia a *Varroa*.



OBJETIVOS

- × Caracterización molecular de las poblaciones del ácaro *Varroa destructor* y de abejas domésticas *Apis mellifera iberiensis* involucradas en el proceso de selección de poblaciones de abejas ibéricas tolerantes a la varroosis
- × Búsqueda de genes con expresión diferencial relacionados con las tareas realizadas por las abejas (desoperculación y limpieza de celdilla) en relación con la tolerancia a la varroosis.
- × Puesta en marcha de un sistema de control remoto de vigilancia de las colmenas. (David Atauri Mezquida, profesor de la Universidad Europea de Madrid)

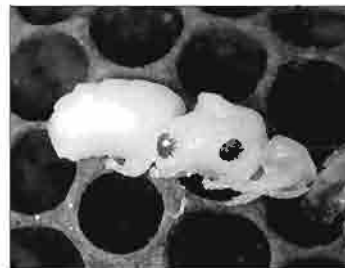
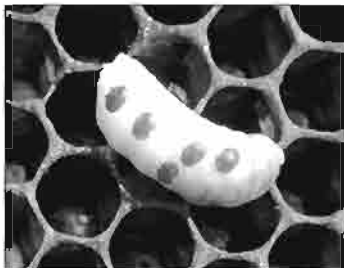


UNIVERSIDAD
DE MURCIA



PRINCIPALES DAÑOS DE LA VARROOSIS

- × Afecta a larvas, pupas y abejas adultas de obreras y zánganos.
- × Daños por alimentación: succión de hemolinfa e inyección de saliva.



Larva (a), pupa (b) y adultos (c) de abejas parasitadas por *Varroa*

PRINCIPALES DAÑOS DE LA VARROOSIS

- ✗ Malformaciones en las abejas jóvenes.
- ✗ Produce pérdida de abejas y de colmenas enteras.
- ✗ Mayor sensibilidad a plaguicidas debido a bajos niveles de hemolinfa.
- ✗ Debilitamiento de la colmena e incremento de enfermedades (virosis, bacteriosis, ascosferosis, etc.)
- ✗ Quedan residuos de las sustancias de tratamiento en los productos de la colmena: miel, polen, cera, etc.



Alas atrofiadas en abeja adulta por *Varroa*

CICLO DE VIDA DE VARROA



CICLO DE VIDA DE VARROA

FASE REPRODUCTIVA

- ⊙ La Varroa fecundada invade la celdilla y pone un primer huevo 60 horas después de la operculación del que saldrá un macho,
- ⊙ Cada 30 horas pondrá más huevos que serán hembras,
- ⊙ Las hembras descendientes que alcancen la madurez antes de que nazca la abeja son fecundadas por su hermano convirtiéndose en hembras fértiles.



CONTROL DE LA VARROOSIS

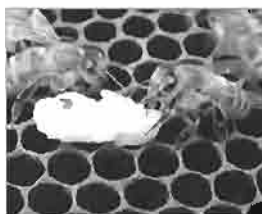
Tratamientos químicos	Tratamientos orgánicos	Manejo de la colmena	Selección genética
Fluvalinato (Apistán®) Amitraz (Apivar®) ...	Ac. Fórmico Ac. Láctico Ac. Oxálico Timol ...	Introducción de cuadros perfección para la producción de celdas de zángano.	Selección de estirpes de abejas resistentes o tolerantes.

- ⊙ Se ha generado resistencia de la Varroa a los tratamientos químicos
- ⊙ Formas de lucha alternativas a los tratamientos químicos:
 - ⊙ Tratamientos orgánicos
 - ⊙ Búsqueda de abejas tolerantes

MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A VARROA



Daños causados debido al grooming

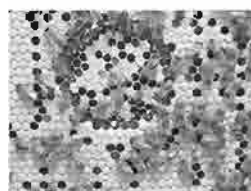


Abejas limpiando la celda y la cría

- × Grooming o despiojado: el parásito es atacado por la propia abeja.
- × Comportamiento higiénico: abejas capaces de localizar las celdillas parasitadas, limpiarlas, retirar la cría infestada y los parásitos, aunque en ocasiones sólo retiran los parásitos.
- × Bajo éxito reproductivo de Varroa: no llega a tener descendencia o sólo genera descendientes machos o bien los descendientes son inmaduros.

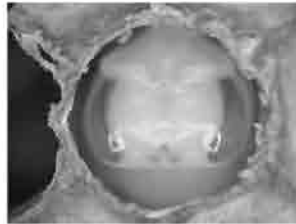
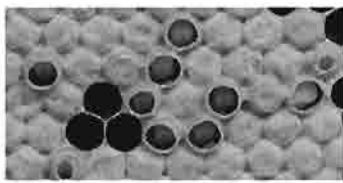
ENSAYOS DE SELECCIÓN

- × Comportamiento higiénico: útil para luchar contra todas las enfermedades, especialmente las que afectan a la cría.



ENSAYOS DE SELECCIÓN

- × **Falta de éxito reproductivo:** se toma un panal con cría de obreras operculada 7 días después de la operculación,
 - + se observa si las celdillas están parasitadas o no,
 - + se examina la descendencia en aquellas celdillas parasitadas.



¿CÓMO SE HAN SELECCIONADO LAS ABEJAS?

- × **Atendiendo al grado de parasitación:**
 - + Menor parasitación de la cría.
 - + Mayor falta de éxito reproductivo de Varroa.
 - + Menor número de parásitos descendientes viables.



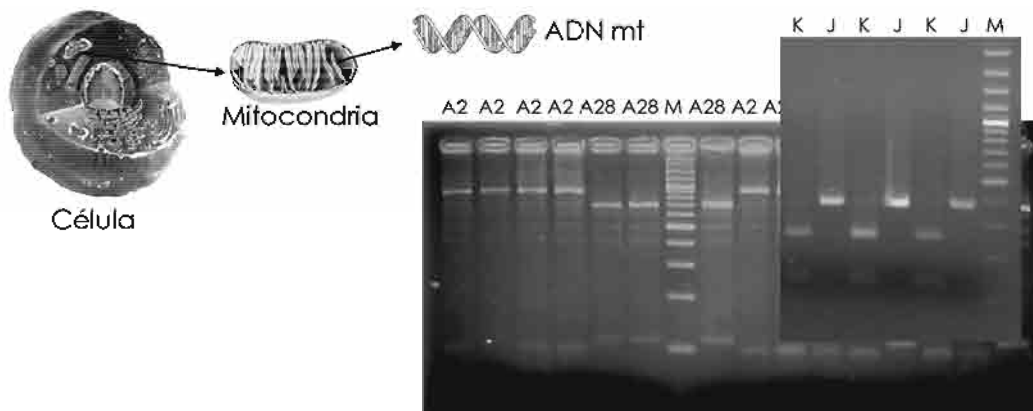
¿QUÉ HEMOS HECHO CON LAS COLMENAS SELECCIONADAS?

Caracterizar la base genética del proceso de selección y mejora



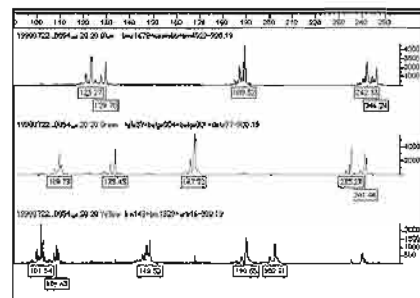
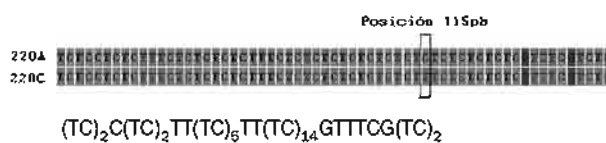
HERRAMIENTAS MOLECULARES

- × El ADN mitocondrial → útil para cuantificar la biodiversidad de las poblaciones de abejas y de Varroa:
 - Incluir las abejas en un linaje evolutivo (haplotipo),
 - Determinar el haplotipo de la población de Varroa.



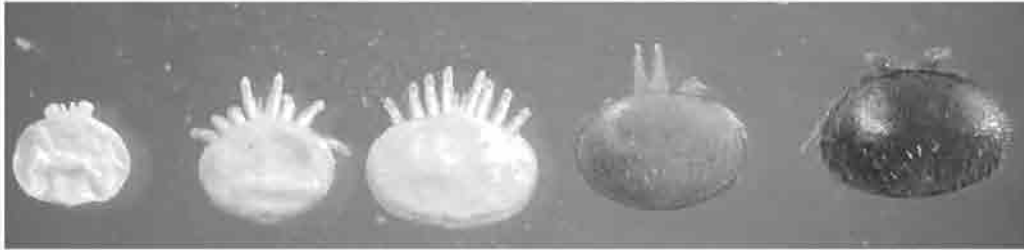
HERRAMIENTAS MOLECULARES

- × Los microsatélites son pequeños fragmentos del genoma con secuencias repetidas de 1 a 4 nucleótidos.
 - Estos marcadores son útiles para caracterizar grupos de individuos = pupas.



-
- × Presentación del proyecto
 - × Características generales de la varroosis
 - × Herramientas moleculares
 - × Perfil genético del ácaro ectoparásito *Varroa destructor* en la Península Ibérica
 - × Variación genética de las pupas de *Apis mellifera iberiensis* relacionada con la sensibilidad higiénica ante varroa
 - × Próximos análisis

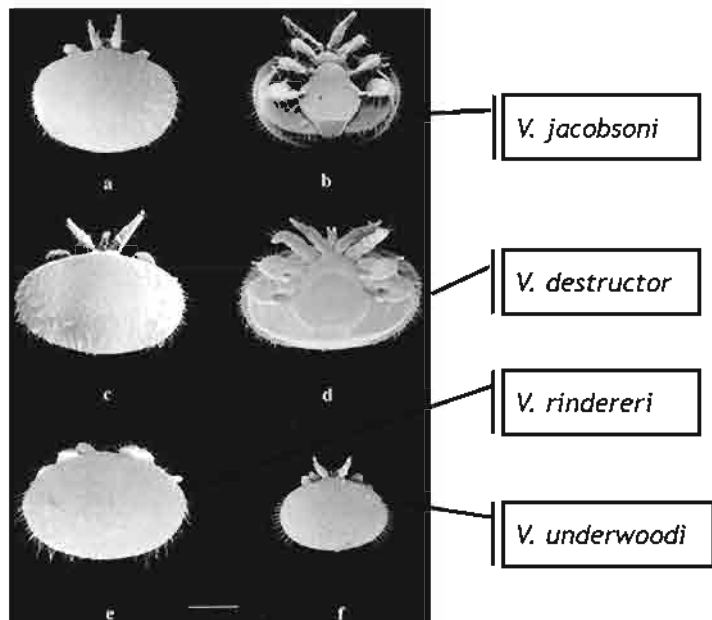
PERFIL GENÉTICO DEL ÁCARO ECTOPARÁSITO *VARROA* *DESTRUCTOR* EN LA PENÍNSULA IBÉRICA



En cooperación con el grupo del Centro Apícola Regional de Marchamalo (Encarna Garrido-Bailón, Raquel Martín-Hernández, Aránzazu Meana y Mariano Higes)

ESPECIES DE VARROA

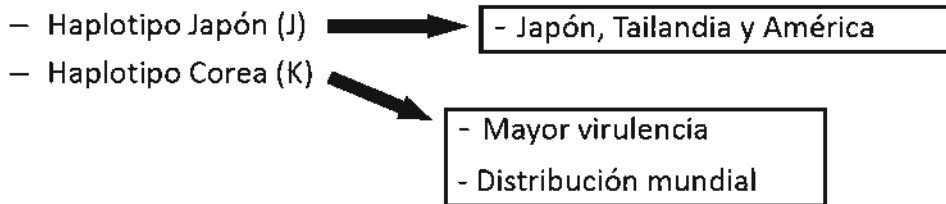
- Varias especies de *Varroa* están implicadas en la enfermedad y muestran diferencias en relación al hospedador y su distribución geográfica.
- Se han detectado diferencias interespecíficas en función de la secuencia del ADN mitocondrial.



Anderson & Trueman, 2000

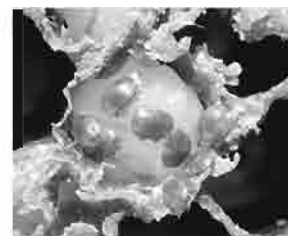
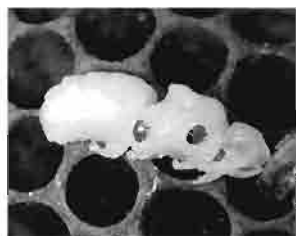
TIPOS DE *VARROA DESTRUCTOR*

- Se han descrito 2 haplotipos de *Varroa destructor* que se reproducen sobre *A. mellifera*:



OBJETIVOS

- Caracterización molecular de las poblaciones de *Varroa* en España, para describir el mecanismo de tolerancia de la abeja ibérica al ácaro *Varroa*.
- El objetivo específico de este estudio es realizar un análisis detallado de las poblaciones de *Varroa* que parasitan *A. m. iberiensis* mediante el análisis del ADN mitocondrial usando la técnica de los polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP).



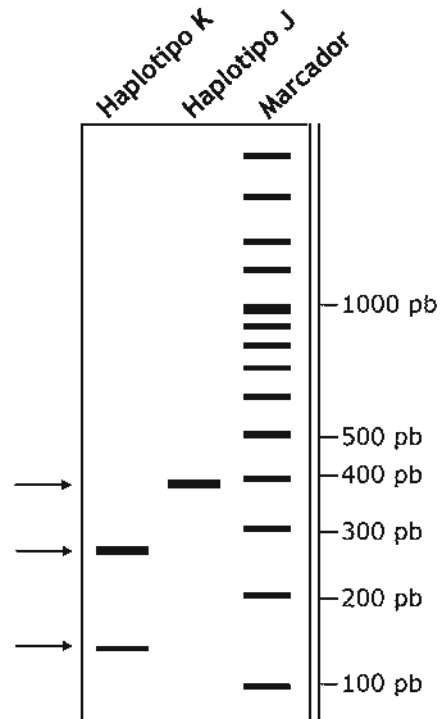
METODOLOGÍA

- Test molecular de Anderson y Fuchs (1998):

- Amplificación de un fragmento de 454 pares de bases en la región del gen mitocondrial *cox1*
- Restricción (RFLP) con la enzima *XhoI*

• Fragmento sin digerir: haplotipo J

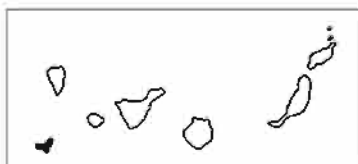
• Fragmento digerido: haplotipo K



RESULTADOS

574 muestras de *Varroa* pertenecen al haplotipo Corea (K)

Sólo se ha encontrado 1 muestra de *Varroa* (Guadalajara) del haplotipo Japón (J).

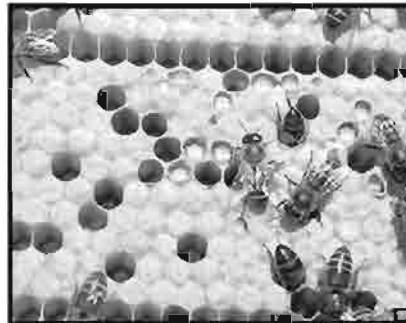


- haplotipo Corea (K)
- haplotipo Japón (J)

CONCLUSIONES

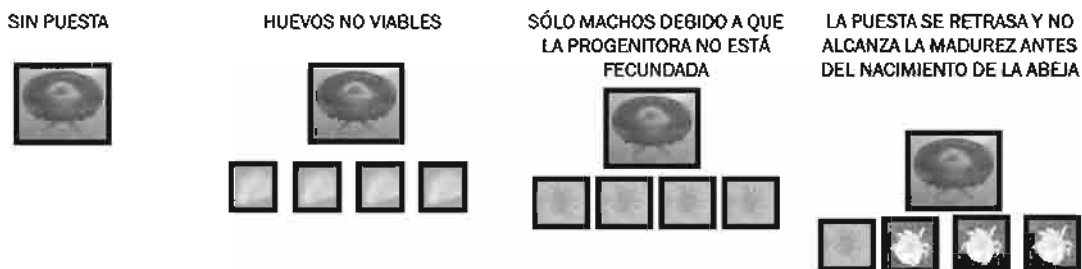
- Estos resultados confirman la expansión del haplotipo más virulento de *V. destructor* (haplotipo K) por todo el territorio español.
- La presencia del haplotipo J sugiere alguna introducción aislada de abejas desde países donde este haplotipo es el dominante.
- Es necesario realizar controles adecuados en los movimientos e importaciones de abejas para evitar la introducción de parásitos y enfermedades.
- La identificación del haplotipo K es un punto de partida importante para estudios orientados al control de este parásito.

VARIACIÓN GENÉTICA DE LAS PUPAS DE *APIS MELLIFERA* *IBERIENSIS* RELACIONADA CON LA SENSIBILIDAD HIGIÉNICA ANTE *VARROA*



ÉXITO REPRODUCTIVO DE VARROA

- ✘ El éxito reproductivo de *Varroa destructor* se considera un carácter significativo para determinar la tolerancia de la abeja a *Varroa*.
- ✘ La falta de éxito reproductivo del ácaro consiste: en ausencia de descendencia o puesta no viable, en otros casos sólo se generan descendientes machos o los descendientes son demasiado tardíos como para alcanzar la madurez antes del nacimiento de la abeja.



FACTORES DE LA FALTA DE ÉXITO REPRODUCTIVO DE VARROA

- ✘ Factores:
 - + Ambientales: flujo de néctar, población de la colmena, etc.
 - + Comportamiento higiénico, mediante el cual las abejas son capaces de localizar las celdillas parasitadas, desopercularlas y limpiarlas, retirando la cría infestada y los parásitos, aunque en ocasiones sólo retiran los parásitos, reoperculando las celdillas con la cría dentro que sigue su desarrollo.
 - + Genética de las abejas tolerantes.

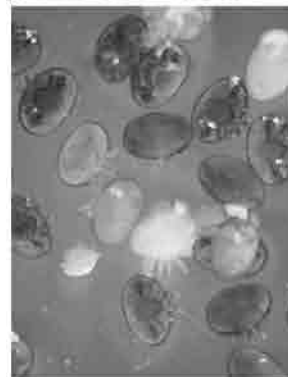
OBJETIVOS

- × Estudiar si existen o no diferencias genéticas entre las pupas de abejas no parasitadas y las parasitadas con *Varroa* infértil o *Varroa* fértil,
- × Determinar si existe relación entre el genotipo de las pupas de las poblaciones de abejas ibéricas y la respuesta ante *Varroa* (comportamiento VSH - *Varroa* sensitive higienic).

DISEÑO DEL EXPERIMENTO

- × Las muestras fueron divididas en tres tipos diferentes:

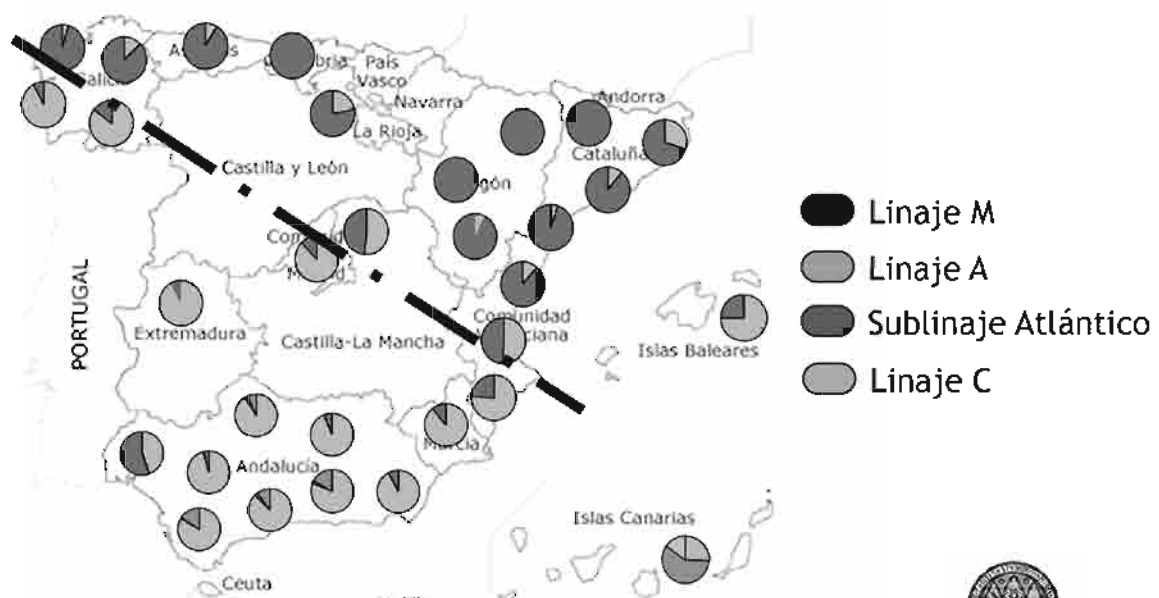
- > pupas no parasitadas (NP): tras abrir el opérculo no se encontró varroa.
- > pupas parasitadas con varroa infértil (IM): la varroa encontrada presentaba estadios de desarrollo que indicaban su infertilidad, bien por ser inmaduros o por faltar el macho fecundador.
- > pupas parasitadas con varroa fértil: tras abrir el opérculo se comprobó que había presencia de varroa y además en estadios de desarrollo que demostraba su capacidad de reproducirse dentro de las celdas operculadas.



METODOLOGÍA

- Se han analizado muestras de los tres tipos de pupas de obreras en 23 colmenas seleccionadas.
- Estudio de la variabilidad genética mediante marcadores moleculares:
 - Haplotipo de las colmenas seleccionadas.
 - 5 loci microsátélites: A007, A113, Ap043, Ap055 y B124.
- Análisis de la variabilidad genética mediante programas informáticos:
 - GenAlex 6 (para realizar un análisis de coordenadas principales o PCA basado en la matriz de distancia genética)
 - STRUCTURE v 2.2 (estudia la estructura de la población y permite asignar los individuos a poblaciones o grupos).

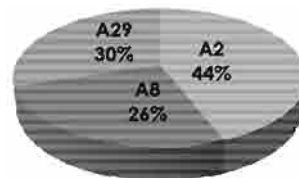
DISTRIBUCIÓN DE LINAJES EVOLUTIVOS



RESULTADOS

- × Todas las colmenas pertenecen al linaje evolutivo africano, tal y como corresponde a las poblaciones de abejas de esta zona.

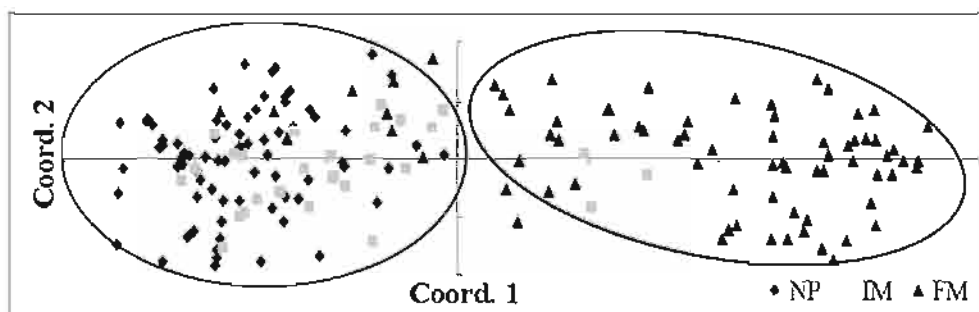
Proporción de haplotipos



- × El esquema de selección de abejas tolerantes a la varroosis se está realizando sobre abejas adaptadas a las peculiares condiciones ambientales del sur peninsular, con veranos calurosos y sin lluvia e inviernos suaves con pluviosidad reducida.

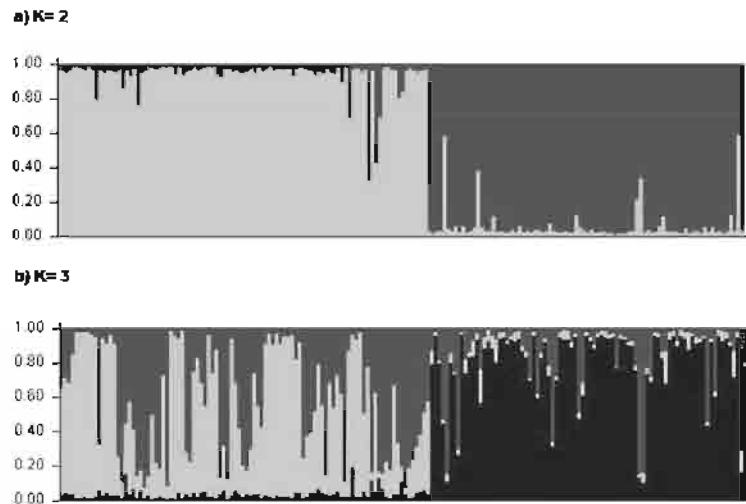
RESULTADOS

- × El análisis de PCA reveló que los tres tipos pupas se agrupan en dos grupos, uno formado por las pupas no parasitadas y las parasitadas con varroa infértil, y el otro constituido por las pupas parasitadas con varroa fértil.



RESULTADOS

- ✘ Test de asignación de los individuos a los grupos de pupas fue realizado asumiendo dos ($K=2$) y tres grupos ($K=3$).

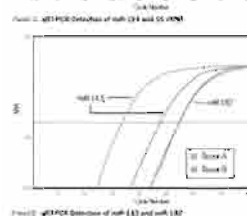
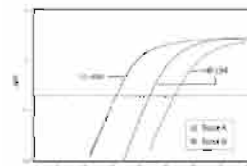


CONCLUSIONES

- ✘ Estos resultados podrían indicar que el genotipo de las pupas de abejas obreras está relacionado con la respuesta higiénica de las obreras encargadas de la detección de ácaros en el interior de las celdas,
- ✘ Las obreras limpiadoras desarrollarían dos comportamientos diferentes en función de si se trata de pupas no parasitadas (NP) o con ácaros infértiles (IM), o si las pupas están parasitadas con ácaros fértiles (FM).
- ✘ Estos dos grupos de pupas podrían expresar genes asociados a la producción de sustancias químicas (= olores) que promuevan el comportamiento higiénico.

PRÓXIMOS ANÁLISIS

- Confirmar los resultados anteriores en las colmenas descendientes de las seleccionadas.
- Búsqueda de genes con expresión diferencial asociados a la tolerancia a la varroosis en aquellas colmenas que hayan sobrevivido al proceso de selección y presenten caracteres fenotípicos extremos (alto y bajo comportamiento higiénico), mediante microarrays.
- Caracterizar los genes seleccionados e interpretar su papel fisiológico, comparando la actividad de dichos genes con los caracteres fenotípicos de interés.



AGRADECIMIENTOS

- Este trabajo ha sido realizado por Irene Muñoz Gabaldón
- Financiado por los proyectos:
 - > RTA2005-00152
 - > JCCM 05-280/PA-47
 - > API 06-009
 - > API 06-010-COORD-2: "Caracterización molecular del proceso de selección de poblaciones de *Apis mellifera iberiensis* tolerantes a la varroosis"



- Encarna Garrido Bailón (Centro Apícola Regional de Marchamalo)
- F. Padilla y J.M. Flores (Universidad de Córdoba)