

**Programa Nacional de Medidas de Ayuda a la Apicultura (Proyecto API06-010)
(Orden PRE/4097/2005)**

Título del proyecto: 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.

Objetivos del proyecto.

- Reducción de los residuos inherentes a los tratamientos frente al ácaro varroa, utilizando la selección genética de abejas tolerantes al parásito.
- 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.
- 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 enfermedades.
- Puesta en marcha de un sistema de control remoto de vigilancia de las colmenas.

Memoria científico-técnica.

(1) Universidad de Córdoba (UCO).

Durante varios años hemos estudiado las relaciones entre varroa y nuestras abejas, sondando diferentes caracteres como, por ejemplo, la infertilidad de varroa, la capacidad de eliminar los ácaros en la fase forética sobre las abejas adultas o "grooming", el comportamiento higiénico o limpieza de las celdillas con cría de abejas parasitadas por el ácaro en su fase reproductiva, etc. Todos ellos son a priori útiles para plantear una lucha eficaz alternativa a los tratamientos químicos de síntesis, que tantos problemas estaban acarreado.

Los resultados previos que avalan el presente proyecto han de ser encuadrados en dos apartados. Uno está relacionado con el estudio de los diferentes caracteres que inducen la tolerancia de las abejas melíferas al parásito *Varroa destructor*. El segundo apartado se refiere a la existencia de poblaciones de estas abejas capaces de moderar el crecimiento demográfico de los parásitos en las colmenas.

Las abejas del género *Apis* que se encuentran en Asia muestran un equilibrio con los parásitos del género *Varroa*, posiblemente porque se trata de una interacción antigua. Dicho equilibrio permite el desarrollo normal de la colmena, ya que los niveles de infestación por el parásito son bajos. Si se analizan los caracteres genéticos que permiten este equilibrio y los que se manifiestan en las colmenas de *Apis mellifera* europeas que muestran una mayor tolerancia a estos parásitos, se encuentra que dichos caracteres son muy similares. Tales caracteres también están presentes en las abejas ibéricas.

Actualmente, la falta de éxito reproductivo de varroa es considerada uno de los caracteres más interesantes en la selección de abejas tolerantes al parásito. Los ejemplos más ilustrativos son las líneas SMR y ARS Russian Bees. En nuestro caso, hemos podido comprobar que hay colonias de abejas ibéricas en las que el éxito reproductivo de varroa es realmente bajo y que estos resultados no son efímeros sino que se mantienen en el tiempo. En ensayos preliminares realizados en otoño e invierno de 2005, sobre un reducido número de colonias, encontramos que la falta de éxito reproductivo de varroa puede ser el origen del menor grado de parasitación registrado en algunas colonias.

Otro factor que reduce la infestación de varroa es el comportamiento higiénico. En investigaciones previas pudimos comprobar que algunas de las colonias presentaban un

comportamiento higiénico notable frente a celdillas artificialmente parasitadas por varroa. Este comportamiento no presentaba diferencias entre colonias cuando se registraba sobre cría de abejas sacrificada. En estos mismos trabajos se apuntaba la posibilidad de que los caracteres de bajo éxito reproductivo del parásito y el alto comportamiento higiénico frente a cría parasitada puedan estar relacionados.

De los experimentos previos hemos concluido que para seleccionar el comportamiento higiénico a fin de aumentar la tolerancia a varroa, es preferible que se valore sobre cría artificialmente infestada, técnica en la que nuestro equipo presenta experiencia suficiente.

La desparasitación entre abejas adultas (grooming) es un carácter que no ha sido considerado como interesante para la selección de abejas tolerantes al parásito, aunque hay autores que sugieren su importancia en esta cuestión. Esta desparasitación se expresa en mayor o menor grado en nuestras abejas y debería ser objeto igualmente de análisis.

El segundo apartado se refiere a nuestros trabajos más recientes, destinados a conseguir un núcleo de colonias preseleccionadas por presentar menor grado de parasitación, así como a las técnicas de mantenimiento y multiplicación de estas poblaciones de abejas. Los resultados provisionales (presentados en el 8º Congreso Iberoamericano de Apicultura) indican que la parasitación se mantuvo baja en las colonias descendientes de las seleccionadas con este objetivo.

En conjunto, los resultados confirman la disponibilidad de abejas tolerantes a varroa. Dicha tolerancia está basada en caracteres genéticos cuantificables, con los que se pretende trabajar para que sirvan de base de las medidas para programar y transferir a los apicultores abejas tolerantes a varroa.

Los estudios precedentes han sido posibles gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos: - "Eurobee: Research on varroa resistant traits in European honey bee races" (Unión Europea. Nº AIR-CT-94. 1064. 1995-1998), - "Estudio de la conducta de limpieza de la abeja de la miel y su relación con la resistencia natural a enfermedades" (FEDER. 1FD97-1061. 1999-2001). - "Investigación y desarrollo de nuevos métodos de control no quimioterápicos contra varroasis y otras enfermedades apícolas aplicables a colmenares comerciales" (INIA. Nº API 98-003. 1999-2002).

Algunos de los resultados de estas investigaciones se han incluido en dos libros publicados por nuestro grupo: "ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS. GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO EN EL COLMENAR" (I.S.B.N.: 84-607-2122-12-85352-202-4) y "ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS. PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO" (I.S.B.N.: 84-607-3323-8). También han sido publicado capítulos en los libros "ASIAN APICULTURE" (I.S.B.N.: 1-878075-03-9) e "INVESTIGACIÓN" (I.S.B.N.: 84-95609-09-6). Fruto de las investigaciones financiadas con estos proyectos también hemos publicado artículos científicos y divulgativos, en revistas internacionales y nacionales.

(2) Universidad de Murcia (UM).

Esta parte del proyecto incluye dos líneas de trabajo bien diferenciadas, una la llevada a cabo por el grupo de Murcia y otra la de la Universidad Europea de Madrid. La primera línea se refiere a la caracterización molecular de las poblaciones de abejas ibéricas que se estudian en la Universidad de Córdoba, así como la búsqueda de marcadores moleculares asociados a los procesos de selección. La segunda línea consiste en la evaluación y puesta a punto de un prototipo de recogida computerizada de datos de la colmena, desarrollado por los investigadores de la Universidad Europea. Con dicho prototipo se pretende mejorar el conocimiento de la biología de la abeja y facilitar la práctica de la apicultura. El prototipo es un sensor que recoge el sonido producido por el enjambre en su colmena, por medio de un

pequeño microcontrolador. Las señales recibidas son enviadas a una unidad central que procesa los datos y permite monitorizar el colmenar a distancia.

Actualmente disponemos de resultados sobre las características moleculares (haplotipo mitocondrial y/o microsatélites) de más de 2000 colmenas peninsulares. El haplotipo mitocondrial se obtiene mediante análisis de restricción y secuenciación y permite distinguir la inclusión de la colmena en el linaje africano o europeo occidental, así como distinguir variantes dentro de cada linaje. Es una característica que se hereda por vía materna y arroja información sobre la historia y la geografía de la colmena muy fiable. Por su parte, los microsatélites se han convertido en la herramienta de rutina para investigar la genética de poblaciones de todo tipo de organismos. Su empleo ha permitido caracterizar la estructura genética de numerosas poblaciones melíferas de la Península Ibérica, Baleares y Canarias, particularmente de la vertiente mediterránea. Ambos marcadores se han estudiado dentro de los siguientes proyectos y contratos de investigación:

- "Caracterización molecular de la abeja canaria". Asociación de Apicultores de La Palma y la Consejería de Agricultura del Gobierno Autónomo Canario. 1995-1996.
- "Caracterización molecular de la abeja murciana". Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Comunidad Autónoma de Murcia. 1996.
- "Caracterización molecular de la abeja murciana: protección y mejora de las poblaciones locales" PB/35/FS/99. Fundación Séneca. 2000-2003.
- "Beekeeping and Apis biodiversity in Europe" EVK2-2000-00628. V Programa MARCO, Unión Europea. 2000-2003
- "Uso de marcadores moleculares para el análisis de la diversidad genética de poblaciones peninsulares e insulares de *Apis mellifera iberica*" RZ00-013. I.N.I.A. 2000-2003
- "Introgresión y flujo génico en la abeja (*Apis mellifera iberica*) derivados de la trashumancia y la importación de reinas. Análisis molecular (microsatélites y haplotipo mitocondrial) y morfométrico" BOS2003-09765, Ministerio de Educación y Ciencia 2003-2006.
- Además uno de los miembros del equipo formado para este proyecto trabajó en un proyecto europeo INCO-COPERNICUS del Cuarto Programa Marco titulado "Mapeo de genes de resistencia con loci de caracteres cuantitativos en abejas", enfocándose la investigación en los mecanismos de resistencia a la varroosis.

La difusión de los resultados de dichos proyectos ha sido realizada en revistas y congresos especializados en la temática (ecología molecular y apicultura) tanto al nivel nacional como internacional.

En cuanto al control remoto de las colmenas el profesor Atauri ya ha desarrollado un primer prototipo basado en las experiencias pioneras desarrolladas por Eddie Woods, quien diseñó y fabricó en los años cuarenta un aparato eléctrico (Apidictor) que amplificaba y aislaba las frecuencias comprendidas entre 225 Hz y 285 Hz, emitidas por un enjambre. Este aparato le permitía predecir con varias semanas de antelación el momento de la enjambrazón. A partir de los trabajos de Eddie Woods, el Dr. Atauri ha elaborado una hipótesis de partida: "si las abejas de diferentes edades baten las alas a frecuencias diferentes por estar completamente formadas o no y las actividades que realizan las abejas se dividen en función de su edad, entonces será posible analizando el espectro de frecuencias conocer la demografía y las actividades del enjambre."

A partir de 2004 ha desarrollado un primer software operativo y posteriormente un software para PC, con el que se recogieron y analizaron muestras en el colmenar durante el invierno de ese año y en la primavera de 2005. Las conclusiones preliminares indican (1) que el espectro de frecuencias es estacionario; que las frecuencias más bajas (hasta 125 Hz aproximadamente) aumentan cuando se reanuda la puesta (primavera y otoño); (3) que la infección de varroa altera fuertemente el sonido. Otros eventos probablemente detectables son las diferencias entre colmenas en una visita y la evolución de una colmena entre diferentes visitas.

Se trata ahora de validar y perfeccionar su funcionamiento ubicándolo en las colmenas objeto de selección en Córdoba, y también realizar replicas en las colmenas que tiene el grupo de Murcia, así como otras que hay en Madrid. De esta manera, se puede contrastar la utilidad del sistema de control remoto con vistas a ser patentado y difundido entre los apicultores, mediante la comparación continuada de los registros computerizados con los datos del control tradicional que llevan a cabo los investigadores de los tres emplazamientos ya citados (Córdoba, Madrid y Murcia). Esto permitirá lograr el perfeccionamiento deseado del sistema al usar tres réplicas del mismo, que trabajan bajo condiciones ambientales y biológicas diferentes.

Justificación del proyecto.

Más allá del interés económico y ecológico que puedan tener la abeja de la miel *Apis mellifera* y la apicultura, debido a sus servicios en la polinización de cultivos y especies silvestres entomófilas, es la miel el producto que más difusión tiene entre los consumidores. La miel es considerada de forma tradicional como un alimento sano y natural, y como tal, no puede defraudar las expectativas que suscita.

Actualmente, una de las amenazas más graves para la calidad de la miel se encuentra íntimamente ligada al uso de fármacos para el control del ácaro *Varroa destructor*.

En los últimos años han sido múltiples las citas relacionadas con la aparición en la miel de residuos de los tratamientos usados para el control de estas enfermedades, algo que puede convertirse en una amenaza para la salubridad del producto. A ello hemos de sumar la aparición de resistencias por parte de los agentes causantes, como es el caso de varroa al fluvalinato.

Conseguir abejas tolerantes al parásitos varroa o a otras enfermedades representa los objetivos perseguidos por diferentes grupos de investigación repartidos por todo el mundo, entre los que también nos podemos incluir nosotros.

Como consecuencia la selección de abejas tolerantes al parásito nos permitirá reducir el uso de tratamientos químicos de síntesis y, consecuentemente, el riesgo de residuos en los productos de las colmenas.

Subproyecto 1. UCO.

El género *Varroa* incluye al menos a cuatro especies de ácaros que parasitan a la abeja asiática *Apis cerana*. *Varroa destructor* aparece en la abeja de la miel occidental *A. mellifera* cuando ambas especies de abejas se ponen en contacto, debido al empleo de esta última en el área natural de la primera. El ácaro parásito es inicialmente confundido con *V. jacobsoni*, pero posteriormente se revelaría como una especie diferente que es nombrada como *V. destructor*.

Desde que a mediados de los años 80 se citara por primera vez en territorio español, el ácaro varroa se ha convertido en el principal problema sanitario de nuestra apicultura. Ha habido grandes mortandades de colonias, los tratamientos con acaricidas eficaces se han revelado como costosos, han proliferado los tratamientos artesanales de eficacia dudosa, han aparecido líneas resistentes del parásito a los acaricidas permitidos, con la consiguiente pérdida de eficacia de los tratamientos, han aparecido residuos en las colmenas, etc.

Los tratamientos químicos de síntesis han permitido salvar a las abejas y a la apicultura de un desastre sin precedentes, pero también han mostrado diversos inconvenientes. Ante esta situación, la búsqueda de formas de lucha alternativas a estos tratamientos se ha convertido en una realidad, inicialmente apoyada en tratamientos orgánicos para las colmenas, y más recientemente en la selección de abejas tolerantes al parásito varroa. Ello ha permitido obtener varias líneas de abejas seleccionadas con este fin. Hay que resaltar que todas ellas pertenecen a razas diferentes a la oriunda de la Península Ibérica, es decir, *Apis mellifera iberiensis*.

Considerando la situación descrita, nuestra apicultura se enfrenta a varios retos que podemos resumir de la forma siguiente:

- Mejorar el control de la parasitosis en los colmenares.
- Eliminar los residuos en los productos de las colmenas
- Soslayar la resistencia de varroa a los acaricidas autorizados.
- Reducir el incremento de costes en las explotaciones avícolas.
- Evitar el recurso de la importación de abejas foráneas seleccionadas, pero cuya eficacia no está probada en los ecosistemas ibéricos.

De aquí la conveniencia de obtener líneas con mayor resistencia natural al parásito, al tiempo que se caracterizan los genes relacionados con la tolerancia de abejas ibéricas a *Varroa destructor*. Por ello, este proyecto se propone desarrollar soluciones en diferentes aspectos:

- La diseminación de abejas más tolerantes al parásito varroa, que permitiría distanciar el periodo entre los tratamientos y usar aquellos que sean menos agresivos.
- La reducción de efectos no deseados en los tratamientos químicos de síntesis (residuos en los productos de las colmenas y aparición de resistencias por parte del parásito).
- Una mejora de la economía de nuestros apicultores, ya que tendrían menor pérdida de colonias, menor gasto en tratamientos y cuidados del colmenar y una mayor calidad de los productos.
- Incrementar el interés de los apicultores por mejorar las abejas locales, siendo ésta una garantía para conservar las abejas mejor adaptadas a nuestros ecosistemas.

Subproyecto 2. UM.

Este subproyecto pretende caracterizar la base genética del proceso de selección y mejora que se busca en el subproyecto 1. Partiendo del estudio de los marcadores básicos, haplotipo mitocondrial y microsátélites, se pretende en primer lugar caracterizar las poblaciones de abejas que están siendo sometidas a procesos de selección por presentar tolerancia a la varroosis. Marcadores moleculares como el ADN mitocondrial pueden ser usados para cuantificar la biodiversidad de dichas poblaciones e incluirlas en un linaje evolutivo determinado. Por otro lado los microsátélites son marcadores en principio selectivamente neutros, que nos dan una estimación de la diversidad genética de las poblaciones seleccionadas y de cómo cambia ésta durante el proceso de selección. Poblaciones pequeñas como la que se está seleccionando, pueden sufrir como consecuencia del entrecruzamiento de los individuos y de las fecundaciones dirigidas una disminución de su diversidad genética y la acumulación de alelos deletéreos.

Utilizando los mismos tipos de marcadores moleculares se realizará también una caracterización de las poblaciones del ácaro *Varroa destructor*. El ADN mitocondrial de este insecto ha sido secuenciado completamente y se han detectado dos haplotipos diferentes con diferentes habilidades reproductoras: Japanese (J) presente en Japón, Tailandia y América, y Korean (K) distribuido casi por todo el mundo incluyendo gran parte de Asia. La virulencia de ambos haplotipos no es igual, siendo más virulento el K que el J, de ahí la importancia de determinar el haplotipo correspondiente a las poblaciones que se están estudiando. Por otro lado se han diseñado cebadores para amplificar al menos 13 loci de microsátélites con alelos diagnósticos para cada tipo de varroa y diferente variabilidad entre los tipos. Su estudio a lo largo del proceso de selección nos dará idea de cómo cambia la variabilidad genética de las poblaciones de varroa.

Por último se pretende iniciar la búsqueda de genes con expresión diferencial que estén asociados a tolerancia a la varroosis de las líneas que han sido objeto de selección. Actualmente se disponen de técnicas como la creación de librerías sustractivas de ADNc y las técnicas de detección de expresión diferencial que pueden ser usadas para revisar el genoma de los insectos sociales como las abejas en búsqueda de genes involucrados en diferentes comportamientos cuantificables. Para ello hay que buscar y caracterizar genes de *Apis mellifera iberiensis* implicados en el comportamiento de tolerancia a varroa, en este caso el comportamiento higiénico. Dicho comportamiento es realizado por abejas obreras jóvenes en dos tareas: desoperculación (eliminación de la tapa de cera con la que se tapan las celdas de la

cría) de las celdas y limpieza del contenido de las mismas. Para buscar los genes implicados en el desarrollo de estas tareas se ha de obtener ARNm de obreras de las líneas seleccionadas por tener una expresión preferencial de alguna de las tareas y compararlo con otras líneas de control que no presentan dicho carácter. Los genes que presenten una expresión diferencial se clonan y se cotejan con las bases de datos ya disponibles: la de los EST de una librería de ADNc del cerebro de la abeja (www.life.uiuc.edu/robinson) y la del genoma completo de la abeja *Apis mellifera* (www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee).

Tras esta caracterización viene la interpretación fisiológica y comparada del papel de dichos genes en los caracteres fenotípicos de interés.

En cuanto al perfeccionamiento experimental del equipo de monitorización computerizada de las colmenas, es patente que la disponibilidad de un sistema capaz de informar a distancia de parámetros vitales de la vida de la colmena, reducir los niveles de estrés del manejo, conferir protección contra robos y generar datos acumulables e interpretables de forma automática, configura un conjunto notabilísimo de beneficios, tanto para el apicultor en sus tareas cotidianas, como para la investigación y la experimentación. En este sentido, no parece necesario abundar en la adecuación de esta línea de trabajo a los fines de la convocatoria, pues igual puede informar del problema del despoblamiento que de la marcha de unos tratamientos o de los niveles de infestación de las colmenas, favoreciendo la toma de las medidas oportunas.

Esta línea de trabajo merecería por si misma ser objeto de un proyecto independiente, pero dado que ya está en un avanzado estado de desarrollo y que lo necesario ahora es perfeccionarlo en colmenares experimentales sujetos a un control científico, su inclusión en este subproyecto se justifica por la necesidad de contar con una financiación modesta pero eficaz para completar su puesta a punto.