



DICIEMBRE 4, 2017

EVALUACIÓN DEL ESTADO ACTUAL DE LA  
RESISTENCIA A LOS ACARICIDAS EN  
POBLACIONES DE VARROA DESTRUCTOR  
DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

DR. JOEL GONZÁLEZ CABRERA  
ERI BIOTECMED. UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



# Índice

Resumen .....	2
Objetivos específicos .....	4
Breve descripción de los objetivos .....	5
Metodología.....	7
Tipos de muestra .....	7
Tareas.....	7
Extracción de material genético a partir de muestras de <i>Varroa destructor</i> . .....	7
Determinar la distribución y frecuencia de las mutaciones en el Canal de Sodio Dependiente de Voltaje, que causan resistencia a los piretroides sintéticos. ....	8
Determinar la presencia (y en su caso la frecuencia) de individuos resistentes a cumafós y amitraz en las poblaciones de <i>Varroa destructor</i> de la Comunidad Valenciana. ....	9
Transferencia de la información generada a las ADS. Diseño de una estrategia de gestión del parasitismo que se ajuste a cada caso concreto.....	10
Bibliografía .....	11

## Resumen

El efecto devastador que ejerce el ácaro ectoparásito *Varroa destructor* sobre las colonias de las abejas de la especie *Apis mellifera* es considerado uno de los principales problemas de la apicultura actual. La pérdida de las colonias parasitadas puede ser del 100 % en 2-3 años si no se toman medidas eficaces de control (Rosenkranz et al. 2010). Los apicultores continúan aplicando de forma intensiva y muchas veces sin control veterinario un reducido grupo de materias activas, fundamentalmente de estos tres grupos de plaguicidas: piretroides (tau-fluvalinato y flumetrina), organofosforados (cumafós) o amidinas (amitraz). Actualmente, en la Comunidad Valenciana, existen focos de resistencia a estos compuestos sin que exista un plan con directrices claras para detectar y cuantificar sus niveles y distribución.

En el caso de los piretroides sintéticos se conoce que la resistencia en las poblaciones europeas analizadas es debida a la mutación L925V (González-Cabrera et al. 2013), localizada en el sitio propuesto para el anclaje del piretroide a la molécula diana (O'Reilly et al. 2014). La distribución de esta mutación en las colmenas de la Comunidad Valenciana, se determinará a través del análisis de muestras recogidas en todo el territorio utilizando ensayos diagnóstico de alto rendimiento puestos a punto con anterioridad en nuestro laboratorio (González-Cabrera et al. 2013, González-Cabrera et al. 2016). Además, en nuestro laboratorio hemos optimizado un método de bioensayo que nos permite cuantificar de forma rápida y precisa la frecuencia de ácaros resistentes a cumafós y amitraz en una colmena determinada.

Esta propuesta pretende contribuir de forma significativa al conocimiento de la situación real en el sector apícola valenciano. La información generada se transferirá a las Asociaciones de Defensa Sanitaria (ADS) para diseñar la estrategia más eficaz para la gestión del parásito en cada caso.

El desarrollo de metodologías precisas, robustas y rápidas para la identificación de individuos resistentes es una necesidad en el contexto actual tanto europeo como español. La transferencia y difusión de nuestros resultados tanto a la comunidad científica como entre los apicultores y reguladores permitirá una mejora considerable en la toma de decisiones a la hora de seleccionar las metodologías y estrategias más adecuadas para controlar al parásito. Creemos que esto supondrá un avance importante hacia el logro de una apicultura sostenible, segura y de calidad.

## Objetivos específicos

1. Determinar la distribución y frecuencia de las mutaciones en el Canal de Sodio dependiente de Voltaje, que causan resistencia a los piretroides sintéticos.
2. Determinar la presencia (y en su caso la frecuencia) de individuos resistentes a cumafós y amitraz en las poblaciones de *Varroa destructor* de la Comunidad Valenciana.
3. Transferencia de la información generada a las ADS. Diseño de una estrategia de gestión del parasitismo que se ajuste a cada caso concreto.

## Breve descripción de los objetivos

1. **Determinar la distribución y frecuencia de las mutaciones en el Canal de Sodio dependiente de Voltaje, que causan resistencia a los piretroides sintéticos.** En este caso se realizará un rastreo de la mutación L925V en muestras de ácaros muertos recogidos en la Comunidad Valenciana. Se solicitará información a los apicultores acerca de los métodos de control empleados en los últimos 3 años para clasificar las muestras de acuerdo al tipo de tratamiento que han recibido. De esta forma se pueden establecer los niveles de ácaros resistentes tanto en colmenares individuales como en zonas más amplias si la muestra es representativa. Aunque nuestras investigaciones previas indican que la mutación L925V está presente en gran parte de Europa, es posible que no sea este el único polimorfismo causante de la resistencia. La información y colaboración de los apicultores es vital en este caso: si hay colmenas donde no encontramos la mutación y éstas han sido tratadas con piretroides y presentan fallos terapéuticos, es probable que haya otro polimorfismo (u otro mecanismo) provocando la resistencia. Las muestras de esa(s) colonia(s) se analizarán con más detalle para determinar el mecanismo de resistencia.
2. **Determinar la presencia (y en su caso la frecuencia) de individuos resistentes a cumafós y amitraz en las poblaciones de *Varroa destructor* de la Comunidad Valenciana.** En estos dos casos necesitaremos muestras de ácaros vivos para realizar un bioensayo con cada uno de los ingredientes activos por separado. Los resultados que se obtengan reflejarán el porcentaje de individuos resistentes en cada colmena. Los ácaros vivos y muertos como resultado del ensayo se utilizarán posteriormente en nuestro laboratorio para localizar un marcador molecular que nos permita diseñar un

método de diagnóstico robusto y fiable para realizar muestreos futuros con eficacia y rapidez.

- 3. Transferencia de la información generada a las ADS. Diseño de una estrategia de gestión del parasitismo que se ajuste a cada caso concreto.** La información generada como resultado de las tres pruebas independientes (piretroides, cumafós y amitraz) se canalizará al sector apícola a través de las ADS. Estas entidades podrán conocer de primera mano, sobretodo antes del tratamiento, el estado real de la resistencia a los tres grupos de acaricidas que más se utilizan en nuestra comunidad autónoma para controlar al ácaro. El análisis conjunto de la información sobre la resistencia y el historial de tratamientos de cada colmena se utilizará en tomar la decisión sobre el tratamiento más adecuado para eliminar al ácaro de las colmenas.

## Metodología

### Tipos de muestra

**Tipo 1.** Ácaros recogidos vivos o muertos de las bandejas de inspección o de otros residuos de las colmenas. Estas muestras se utilizarán para los ensayos de detección de resistencia a piretroides. Los ácaros se deberán extraer de los residuos con un pincel fino o por lavado con etanol 95%. En este último caso es relativamente sencillo separar los ácaros de los residuos porque la mayoría flota en etanol. Una vez separados los ácaros, se secan sobre papel de filtro y se almacenan a -20°C.

**Tipo 2.** Panales parasitados por *V. destructor*. Los cuadros de cría deberán tener suficiente cría operculada para garantizar que se pueda extraer la cantidad de ácaros necesaria para la realización de los bioensayos con los acaricidas.

### Tareas

Extracción de material genético a partir de muestras de *Varroa destructor*.

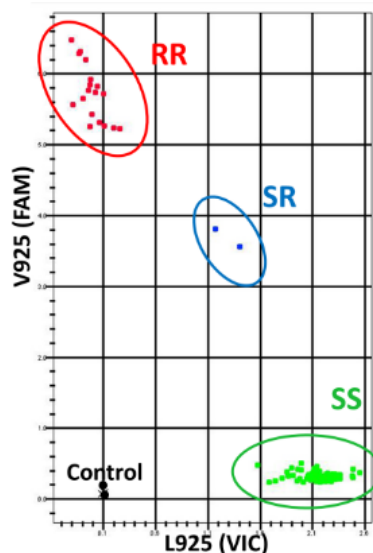
**Extracción de ADN genómico para TaqMan®.** Aunque la técnica puede utilizarse con ADN de alta calidad, en el contexto de este proyecto utilizaremos fundamentalmente ADN extraído por un método muy rápido y barato que ha resultado ser suficientemente bueno para que el ensayo funcione correctamente. El tipo de muestra más utilizado será del tipo 1 aunque también podremos utilizar muestras tipo 2 según el caso concreto. La metodología es una variación de la extracción con NaOH, cuya descripción publicamos con anterioridad (González-Cabrera et al. 2013).



Determinar la distribución y frecuencia de las mutaciones en el Canal de Sodio Dependiente de Voltaje, que causan resistencia a los piretroides sintéticos.

**Rastreo de la mutación L925V.** Esta tarea se acometerá utilizando el ensayo TaqMan® que ya tenemos puesto a punto para la detección de esta mutación (González-Cabrera et al. 2013). Este es un ensayo de alto rendimiento que permite trabajar con el ADN extraído de ácaros individuales (Muestras tipo 1 o tipo 2). La extracción de ADN genómico se realizará en placas de 96 pocillos por lo que podremos analizar un gran número de ácaros a la vez (Fig.1). La máquina de PCR cuantitativa necesaria para realizar esta técnica ya está disponible en la ERI Biotecmed de la Universidad de Valencia (StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems, Life technologies).

Se analizarán muestras de toda la comunidad que serán suministradas por apicultores de forma directa a nuestro laboratorio o a través de las ADS.



**Figure 1.** Ejemplo de los resultados obtenidos con el ensayo TaqMan® para detectar la mutación L925V en *V. destructor*. En el gráfico cada punto representa un ácaro y su posición está determinada por las coordenadas de la fluorescencia medida a las longitudes de onda correspondientes a cada sonda. Como se puede observar, es posible diferenciar de forma precisa los tres genotipos posibles.

**Identificación de nuevos polimorfismos en el VGSC.** Aquellas muestras que provengan de colmenas con fallos terapéuticos, que tengan un historial reciente de tratamientos con

piretroides y que den negativas para la mutación en el ensayo TaqMan<sup>®</sup>, serán analizadas con más detalle para determinar que otros polimorfismos pueden estar implicados en la resistencia en esas colonias. Nosotros disponemos de la información necesaria acerca de la distribución y secuencia de intrones y exones en el VGSC de *V. destructor* por lo que diseñaremos cebadores que permitan amplificar por PCR fragmentos de ADN de las regiones relevantes del canal. Estas regiones se corresponden, principalmente, con la zona de los segmentos transmembrana 4 al 6 del dominio II y el segmento 6 del dominio III (Dong et al. 2014). El ADN molde para estas PCR será el mismo que se utilizó para realizar el ensayo TaqMan<sup>®</sup>, lo cual nos permite contar con muestras de ácaros individuales. La secuencia de los fragmentos amplificados será comparada con las secuencias de referencia y determinaremos si hay polimorfismos de interés que puedan estar correlacionados con la resistencia.

Determinar la presencia (y en su caso la frecuencia) de individuos resistentes a cumafós y amitraz en las poblaciones de *Varroa destructor* de la Comunidad Valenciana.

**Bioensayo para determinar la frecuencia de ácaros resistentes a cumafós y amitraz.** Estos ensayos se realizarán con muestras de tipo 2. Los ácaros vivos se extraerán del cuadro de cría con unas pinzas y un pincel fino, se depositarán encima de un fragmento de tira de Checkmite+ (Bayer Hispania, S.L.) o de Apitraz (Laboratorios Calier, S.A.) (Fig. 2) y se incubarán a 34 °C en un baño húmedo durante 1 hora.



**Figure 2.** Diferentes fases de la realización del bioensayo con los productos acaricidas.

Pasado ese tiempo se retirarán de la tira y se pasarán a un contenedor limpio sin el fragmento de tira y se incubarán en las mismas condiciones otras 3 horas. Posteriormente se contabilizarán los ácaros vivos y muertos para determinar la eficacia del producto en cada caso y determinar el nivel de resistencia en la colmena. En todos los ensayos se pondrán los correspondientes controles para garantizar la fiabilidad del resultado final.

[Transferencia de la información generada a las ADS. Diseño de una estrategia de gestión del parasitismo que se ajuste a cada caso concreto.](#)

Los resultados de los tres ensayos realizados con cada muestra se analizarán conjuntamente y se generará un informe donde se reflejará el nivel de resistencia esperado a cada uno de los principios activos evaluados. En ese informe además se hará constar el historial de tratamientos de la colmena de procedencia para que el veterinario de la explotación o de la ADS pueda evaluar la pertinencia de recetar un tratamiento u otro. El informe se remitirá a la ADS correspondiente que será la entidad encargada de gestionar la información con el fin de diseñar la estrategia de tratamientos más adecuada en cada asentamiento.

## Bibliografía

- Dong, K., Y. Du, F. Rinkevich, Y. Nomura, P. Xu, L. Wang, K. Silver, and B. S. Zhorov. 2014.** Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 50C: 1-17.
- González-Cabrera, J., T. G. E. Davies, L. M. Field, P. J. Kennedy, and M. S. Williamson. 2013.** An amino acid substitution (L925V) associated with resistance to pyrethroids in *Varroa destructor*. *PLoS ONE* 8: e82941.
- González-Cabrera, J., S. Rodríguez-Vargas, T. G. Davies, L. M. Field, D. Schmehl, J. D. Ellis, K. Krieger, and M. S. Williamson. 2016.** Novel Mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Varroa destructor* populations from the Southeastern USA. *PLoS One* 11: e0155332.
- O'Reilly, A. O., M. S. Williamson, J. González-Cabrera, A. Turberg, L. M. Field, B. A. Wallace, and T. G. Davies. 2014.** Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Manag Sci* 70: 369-377.
- Rosenkranz, P., P. Aumeier, and B. Ziegelmann. 2010.** Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103: S96-S119.