

ATRAȚIA CELULELOR DE PUIET PENTRU *VARROA DESTRUCTOR* PE BAZA HRANEI LARVALE

F. NAZZI, N. MILANI, G. DELLA VEDOVA

Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante
Università di Udine, via delle Scienze 208, 33100 Udine, ITALIA, E-mail: francesco.nazzi@pldef.uniud.it

Rezumat

Numeroase cercetări au fost consacrate studierii substanțelor semiochimice, care îl determină pe acarian să intre în celulele de puiet pentru reproducere. Încă de la început cercetarea s-a concentrat asupra posibilelor semnale emise de larvele de albine. De curând, a fost demonstrat că hrana larvală care există în celulele de puiet în momentul în care acarianul pătrunde în acesta ar putea juca un rol semnificativ în invadarea celulei.

În studiul de față, sunt aduse informații în legătură cu elementele de identificare a compușilor hranei larvale care răspund de atragerea acarienilor *Varroa* în celulele de puiet.

Cuvinte cheie: hrană larvală / *Varroa destructor* / invadarea celulelor / substanțe semiochimice

Introducere

În vederea reproducerii, acarianul *Varroa destructor* Oud. intră într-o celulă de puiet, care conține o larvă de albină, înainte de căpăcirea acesteia (BOOT et al., 1992). Ideea potrivit căreia anumiți atractanți, care sunt probabil implicați în acest proces, ar putea fi utilizați pentru combaterea acarianului așa cum alți atractanți sunt utilizați în combaterea dăunătorilor, a stimulat cercetările pe această temă.

Anumiți autori au examinat stimulii care declanșează invadarea celulelor de către acarian. De la bun început cercetarea s-a concentrat asupra stimulilor eliberați de larvele de albine. LE CONTE et al. (1989) a arătat că acarienii *Varroa* sunt atrași de anumiți esteri ai acizilor grași simpli alifatici, care se găsesc în larvele din stadiul al cincilea. RICKLY et al. (1992) a demonstrat că acidul palmitic, detectat în aerul care înconjură larvele de albine, este atrăgător pentru acarianul *Varroa*. RICKLY et al. (1994) și AUMEIER și ROSENKRANZ (1995) au arătat că anumite hidrocarburi saturate și nesaturate, găsite pe cuticula larvelor, erau active asupra acarianului *Varroa* în cadrul unui bioexperiment.

În timpul invadării celulelor, acarianul părăsește albina-doica pentru a intra în celula de puiet care conține o larvă de albine. Preferința arătată într-un studiu de acarian mai degrabă pentru albinele-doici, decât pentru larve (KRAUS, 1993; LEDOUX et al., 2000) sugerează că în procesul de invazie a celulelor au fost implicați stimulii din altă sursă decât puietul însuși. Pe lângă larve, celulele de puiet conțin și câteva miligrame de hrană larvală, furnizată de albinele-doici larvelor aflate în creștere. De fapt, după ce intră în celulă acarianul atinge fundul acesteia și este prins în lăptișorul larval (IFANTIDIS, 1988).

Atractivitatea hranei larvale pentru trântori a fost luată ca ipoteză încă din 1985 (ISSA et al., 1985). MILANI și CHIESA (1991) au arătat că hrana larvală influențează reproducerea lui *V. destructor*.

În lucrarea de față prezentăm rezultatele unui studiu, în care am examinat efectul hranei larvale asupra comportamentului acarianului, pentru a verifica rolul jucat de aceasta în procesul de invadare a celulei. Unele rezultate ale acestui studiu au fost deja comunicate de NAZZI et al. (2001).

Materiale și metode

Materialul biologic

Larvele de albine și acarienii utilizați în experimente au provenit din colonii netratate de *Apis mellifera*, instalate în Udine (nord-estul Italiei). Acarienii și larvele au fost prelevate din celule de puiet căpăcite cu 15 ore înainte (0-15 PC). Larvele în stadiul al cincilea au fost extrase manual înainte de căpăcire (15 BC) din celulele de puiet necăpăcite. Hrana larvală a fost extrasă cu ajutorul unei spatule mici din celule de trântor care conțineau larve în stadiul al 4-lea sau al 5-lea și a fost ținută până la utilizare la -20°C în fiole sigilate.

Bioexperiment

S-a recurs la efectuarea unui bioexperiment, pentru studierea, în condiții de laborator, a stimulilor implicați în procesul de invadare a celulelor. Acesta a constatat în observarea unei zone pe placa de sticlă,

asemănătoare celei utilizate de ROSENKRANZ (1993), cu patru godeuri (7 mm diametru, 8 mm adâncime) așezate echidistant (1 cm) față de centru (Figura 1). Tratamentul a fost aplicat în două godeuri opuse, celelalte două fiind utilizate ca martor. În fiecare godeu a fost plasată câte o larvă. La începutul analizei, o femelă adultă de acarian a fost plasată în centrul plăcii și timp de 30 de minute a fost observată poziția acesteia la intervale de 5 minute. Plăcile au fost menținute pe toată durata bioexperimentului într-un incubator la 35°C și 75% umiditate relativă. Au fost utilizate concomitent douăzeci de plăci. Testele au fost replicate în zile diferite.

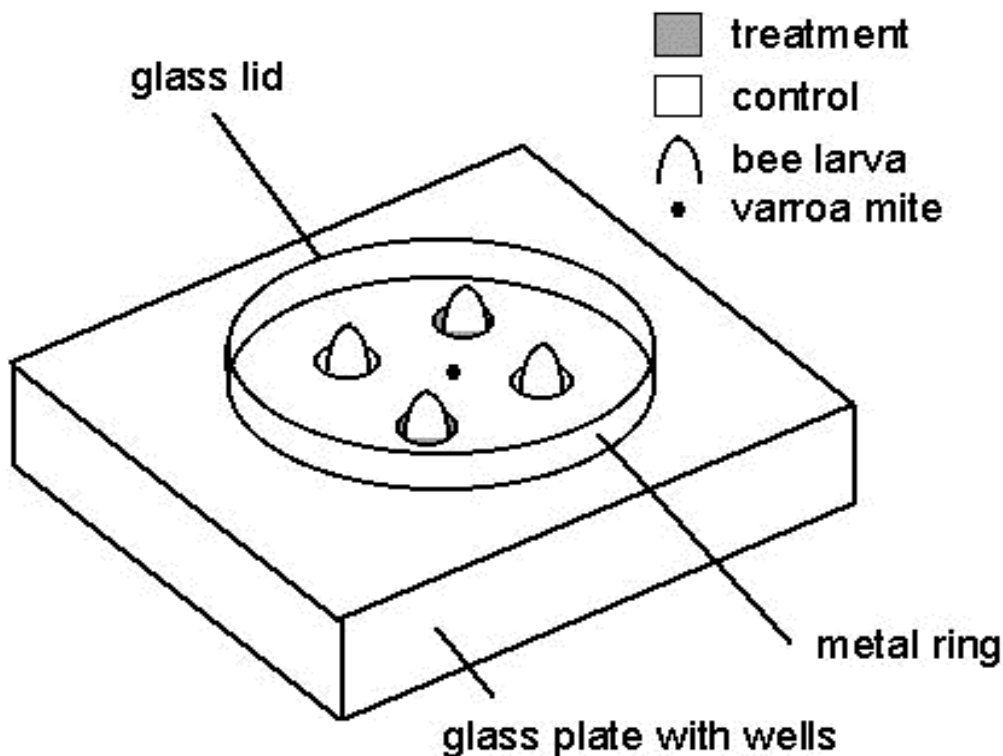


Fig. 1 – Placa utilizată în bioexperiment

- tratament
- martor
- larvă de albină
- acarian Varroa

glass lid = capac de sticlă; metal ring = inel metalic; glass plate with wells = placă de sticlă cu godeuri

Experimentele efectuate

(a) Vârsta larvei

În vederea verificării eficienței bioexperimentului și a selectării celei mai bune vârste a larvei pentru bioexperiment, a fost realizat un experiment preliminar, în cursul căruia a fost studiată atracția acarianului față de două vârste diferite a larvei de albină. Acest lucru s-a făcut prin plasarea câte unei larve 15 BC în câte două godeuri opuse și a câte unei larve 0-15 PC în celelalte două godeuri.

(b) Hrana larvală

A fost examinat și efectul posibil al hranei larvale asupra comportamentului acarianului prin tratarea a două godeuri opuse cu câte 10 mg hrană larvală, în timp ce celelalte două au rămas netratate, fiind utilizate ca martor. În toate godeurile au fost plasate larve 0-15 PC.

(c) *Extracte de hrană larvală*

Pentru verificarea ipotezei că activitatea biologică a hranei larvale depinde de anumite substanțe chimice conținute în ea, ea a fost extrasă cu doi solvenți diferiți, iar extractele au fost testate în cursul bioexperimentului.

Hrana larvală a fost extrasă cu acetonă și dietileter și analizată la o concentrație de 10 mg echivalente de hrană larvală în 10 μ l de solvent, per godeu tratat. 10 μ l de solvent au fost aplicate în godeurile martor. În toate godeurile, au fost plasate larve 0-15 PC.

Analiza statistică a datelor

La fiecare placă, a fost calculat numărul de observații a acarianului *Varroa* în godeurile tratate și în cele martor pe parcursul unei perioade de 30 de minute. Ulterior au servit ca bază pentru analiza statistică. Rezultatele tratamentului și martorilor, cuprinse într-un set de date dat, au fost comparate prin intermediul unui test cu mostre arbitrare (MANLY, 1991; SOKAL și ROHLF, 1995). În acest caz, distribuția arbitrară a fost supusă, din nou, prelevării de mostre (de 10⁶ ori) cu ajutorul unui program de calculator, special conceput în acest scop.

Rezultate(a) *Vârsta larvelor*

Mai mulți acarieni au fost găsiți în godeurile care conțineau larve din celule necăpăcite (15 BC) decât în godeurile care conțineau larve din celulele căpăcite (0-15 PC) (P=0,016) (Tabelul I).

Tabelul I

Răspunsul lui *V. destructor* la larve de vârste diferite. Suma rezultatelor de la 20 de acarieni în godeuri care conțineau o larvă în stadiul al cincilea (15) sau o larvă dintr-o celulă căpăcită (0-15 PC). P reprezintă semnificația statistică a diferenței observate.

Replicarea	15	0-15 PC	P
1	33	8	0,027
2	36	36	0,521
3	37	32	0,418
4	40	16	0,066
5	33	12	0,067
6	32	24	0,333
Total	211	128	0,016

(b) *Hrana larvală*

Numărul de acarieni găsiți în godeurile tratate cu hrană larvală a fost semnificativ mai mare (P<0,001) decât cel observat la godeurile martor (Tabelul II).

Tabelul II

Răspunsul lui *V. destructor* la hrana larvală și extracte ale acesteia. Suma rezultatelor pentru godeurile tratate și cele martor. P reprezintă semnificația statistică a diferenței observate.

Tratament	Replicări	Tratate	Martor	P
Hrană larvală	5	249	54	<0,001
Hrană larvală - extract în eter	8	152	56	<0,001
Hrană larvală - extract în acetonă	4	110	22	<0,001

(c) *Extracte de hrană larvală*

Atât extractul în eter cât și în acetonă al hranei larvale au indus un răspuns semnificativ la *V. destructor*, manifestat prin numărul semnificativ diferit (P<0,001, în ambele cazuri) al acarienilor în godeurile tratate față de numărul în godeurile martor (Tabelul II).

Discuții

Acarienii *Varroa* utilizați în bioexperimentul nostru au răspuns mai bine la larvele de stadiul al cincilea înainte de căpăcire decât la larvele din celulele căpăcite. Răspunzători ar putea fi anumiți compuși prezenți pe cuticula larvelor de stadiul al cincilea, dar și compușii activi prezenți pe cuticula larvală și care proveneau din substanțe conținute în celulă, precum hrana larvală. În orice caz, rezultatul experimentului a confirmat eficiența bioexperimentului și a determinat alegerea larvelor 0-15 PC, mai puțin active, pentru experimentele următoare, menite să testeze activitatea biologică a stimulilor non-larvali.

Testarea hranei larvale în bioexperiment a dat un răspuns clar din partea lui *V. destructor*. Activitatea biologică a extractelor demonstrează că efectul observat se datorează substanțelor semiochimice conținute de însăși hrana larvală și nu altor indicii nespecifice (ca de ex. umiditatea).

Rezultatele arată că indicii de natură chimică, proveniți din altă sursă decât gazda, sunt implicați în procesul invadării celulelor de către acarianul *Varroa*. Acest lucru poate părea mai degrabă neașteptat. Pentru punerea în practică a acestei funcții, indicii chimici trebuie să fie fiabili, adică să indice în mod clar prezența și disponibilitatea gazdei. Stimulii identificați până acum din cuticula larvală sunt lipsiți de această cerință specifică, ei fiind larg răspândiți în interiorul stupului. Pe de altă parte, hrana larvală posedă o compoziție distinctă, incluzând și câțiva hidroxiacizi (LERCKER et al., 1994).

Izolarea substanțelor semiochimice răspunzătoare de activitatea biologică a hranei larvale a deschis calea către identificarea acestora. Aceasta ar putea contribui la o mai bună înțelegere a biologiei acarianului și sugerează noi metode de combatere a parazitului.

BIBLIOGRAFIE

- Aumeier P., Rosenkranz P. (1995), Welche Faktoren der Bienenlarvenkutikula beeinflussen die Wirtsfindung der Varroa-Weibchen, *Apidologie* 26, 327-329
- Boot W.J., Calis J.N.M., Beetsma J. (1992), Differential period of Varroa mite invasion into worker and drone cells of honey bees, *Exp. Appl. Acarol.* 16, 295-301
- Ifantidis M.D. (1988), Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells, *Apidologie* 19, 387-396
- Issa M.R.C., De Jong D., Gonçalves L.S. (1985), Étude sur la preference de l'acarien *Varroa jacobsoni* pour les faux bourdons d'*Apis mellifera*, Proc. XXXth Congr. Apicult., Nagoya, 1985, Apimondia Publishing House, Bucharest, 168-170
- Kraus B. (1993), Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages, *J. Apic. Res.* 32, 57-64
- Le Conte Y., Arnold G., Trouiller J., Masson C., Chappe B., Ourisson G. (1989), Attraction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters, *Science* 245, 638-639
- LeDoux M.N., Pernal S.F., Higo H.A., Winston M.L. (2000), Development of a bioassay to test the orientation behaviour of the honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni*, *J. Apic. Res.* 39, 47-54
- Lercker G., Vecchi M.A., Piana L., Nanetti A., Sabatini A.G. (1994), Composition de la fraction lipidique de la gelée de larves d'abeilles reines et ouvrières (*Apis mellifera ligustica* Spinola) en fonction de l'âge des larves, *Apidologie* 15, 303-314
- Manly B.F.J. (1997), Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology, Chapman & Hall, London
- Milani N., Chiesa F. (1991), Some stimuli inducing oviposition in *Varroa jacobsoni* Oud, Proc. Intern. Symp. Recent research on bee pathology, Gent 1990, Ritter W. ed., Apimondia, Bucharest, 27-33.
- Nazzi F., Milani N., Della Vedova G., Nimis M. (2001), Semiochemicals from larval food affect the locomotory behaviour of the varroa mite, *Apidologie*, 32, 149-155
- Rickli M., Guerin P.M., Diehl P.A. (1992), Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosphere, *Naturwissenschaften* 79, 320-322
- Rickli M., Diehl P.A., Guerin P.M. (1994), Cuticle alkanes of honeybee larvae mediate arrestment of bee parasite *Varroa jacobsoni*, *J. Chem. Ecol.* 20, 2437-2453
- Rosenkranz P. (1993), Biotest zur Untersuchungen des Wirtsfindenverhaltens von *Varroa jacobsoni*, *Apidologie* 24, 486-488
- Sokal R.R., Rohlf F.J. (1995) Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, Freeman and Co., New York, 3rd ed.