

ATRACCION DE *VARROA DESTRUCTOR* POR LAS CELDAS DE CRÍA, SOBRE LA BASE DE LAS SEÑALES EMITIDAS POR EL ALIMENTO LARVAL

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

Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante, Università di Udine, via delle Scienze 208, 33 100 Udine, ITALIA
E-mail: francesco.nazzi@pldef.uniud.it

Resumen

Se dedicaron investigaciones al estudio de las sustancias semioquímicas, que inducen al ácaro a penetrar en las celdas de cría para reproducirse. Desde un principio la investigación se centró en las posibles señales emitidas por las larvas de abejas. En fechas recientes se ha demostrado que el alimento larval contenido en las celdas de cría, en el momento de la entrada del ácaro, puede desempeñar un papel significativo en el proceso de invasión celular.

En el presente estudio, se aporta información en relación con los elementos de identificación de los componentes del alimento larval responsables por la atracción de los ácaros *Varroa* hacia las celdas de cría.

Palabras clave: alimento larval / *Varroa destructor* / invasión de las celdas / sustancias semioquímicas

Introducción

En vista de su reproducción, el ácaro *Varroa destructor* Oud. penetra en la celda de cría, que contiene una larva de abejas, antes de su operculación (BOOT et al., 1992). La opinión de que ciertos atrayentes, supuestamente implicados en este proceso, se podrían utilizar para el combate del ácaro, igual que otros señuelos que se usan en el combate de los insectos predadores, impulsó las investigaciones sobre este tema.

Algunos autores estudiaron, desde el principio, los estímulos desencadenantes de la invasión de las celdas por el ácaro, centrandó su investigación en los estímulos liberados por las larvas de abejas. LE CONTE et al. (1989) señaló que los ácaros *Varroa* se sienten atraídos por ciertos ésteres de los ácidos grasos simplemente alifáticos, que se encuentran en larvas en el quinto estadio. RICKLY et al. (1992) demostró que el ácido palmítico, detectado en el aire que rodea a las larvas de abejas, resulta atractivo para el ácaro *Varroa*. En un bioensayo, RICKLY et al. (1994) y AUMEIER y ROSENKRANZ (1995) mostraron que ciertos hidrocarburos saturados y no saturados de la cutícula de las larvas estaban activos sobre el ácaro *Varroa*.

Durante la invasión de las celdas, el ácaro abandona a la abeja-nodrizas, para penetrar en la celda de cría que contiene una larva de abejas. La preferencia manifestada por el ácaro por las abejas-nodrizas, antes que por las larvas (KRAUS, 2003, LeDOUX et al., 2000), sugiere que estímulos de una fuente distinta de la propia cría están involucrados en el proceso de invasión de las celdas. Además de larvas, las celdas de cría también contienen unos cuantos miligramos de alimento larval, suministrado por las abejas nodrizas a las larvas en crecimiento; de hecho, el ácaro, después de haber penetrado en la celda, alcanza su fondo y queda atrapado en la jalea real (IFANTIDIS, 1988).

La atractividad del alimento larval para los zánganos se tomó como hipótesis ya en 1985 (ISSA et al., 1985); MILANI y CHIESA (1991) mostraron que el alimento larval incide en la reproducción de *V. destructor*.

En el presente trabajo, presentamos los resultados de un estudio en el marco del cual examinamos el efecto del alimento larval sobre el comportamiento del ácaro, al efecto de comprobar el papel de aquél en el proceso de invasión de la celda. Algunos de los resultados del estudio fueron comunicados también por NAZZI et al. (2001).

Materiales y métodos

Material biológico

Las larvas de abejas y los ácaros experimentales provenían de colonias sin tratar de *Apis mellifera*, mantenidas en Udine (noreste de Italia). Los ácaros y las larvas se obtuvieron de celdas de cría operculada en las 15 horas anteriores al operculado (0-15 PC). Las larvas en el quinto estadio, con anterioridad al operculado (15 BC), se extrajeron a mano de las celdas de cría sin opercular. El alimento larval se extrajo con la ayuda de una espátula de las celdas de zánganos con larvas adentro, en el cuarto o el quinto estadio, y se conservó a -20° C, en frascos cerrados, hasta el momento de su utilización.

Bioensayo

Se llevó a cabo un bioensayo, al efecto de estudiar, bajo condiciones de laboratorio, los estímulos involucrados en el proceso de invasión de las celdas. Este consistió en observar una zona de la lámina de vidrio, parecida a la empleada por ROSENKRANZ (1993), con cuatro pocillas (7 mm de diámetro, 8 mm de profundidad), equidistantes (1 cm) del centro (Figura 1). El tratamiento se aplicó en dos pocillas opuestas, sirviendo los dos restantes de testigo. En cada pocilla se colocaron sendas larvas. Al comienzo del análisis, un ácaro hembra adulto fue colocado en el centro de la zona, y su posición estuvo siendo observada a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos. Las láminas de vidrio se guardaron en un armarito, a los 35° C y 75 % de humedad relativa, por toda la duración del bioensayo. Se utilizaron simultáneamente veinte láminas de vidrio. Estas se replicaron en días distintos.

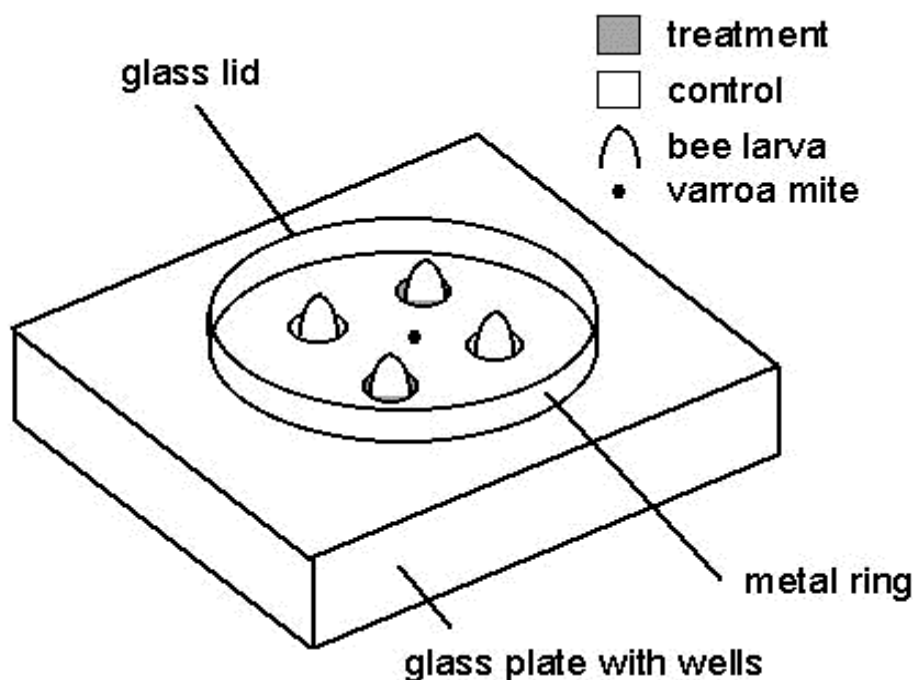


Fig. 1 - La lámina utilizada en el bioensayo

glass lid = tapa de vidrio;

■ tratamiento;

□ testigo;

⊖ larva de abejas

• ácaro Varroa

metal ring = anillo metálico; glass plate with wells = lámina de vidrio con pocillas

Experimentos efectuados

(a) Edad de las larvas

Al efecto de comprobar la eficacia del bioensayo y de la selección de las mejores edades de las larvas para el bioensayo, se llevó a cabo un experimento preliminar, en el transcurso del cual se estudió la atracción mostrada por el ácaro frente a las larvas de abejas de dos edades diferentes. Esto se consiguió colocando sendas larvas 15 BC en dos pocillas opuestas y de sendas larvas 0 -15 PC en las dos pocillas restantes.

(b) Alimento larval

Se estudió asimismo el posible efecto del alimento larval sobre el comportamiento del ácaro, tratando dos pocillas opuestas con 10 mg de alimento larval y dejando sin tratar a las dos restantes, que sirvieron de testigo. Todas las pocillas recibieron larvas 0-15 PC.

(c) *Extractos de alimento larval*

Con el propósito de comprobar la hipótesis de que la actividad biológica del alimento larval depende de ciertas sustancias químicas en él contenidas, se extrajo el alimento larval con dos disolventes diferentes, y los extractos se estudiaron durante el bioensayo.

El alimento larval se extrajo con acetona y dietiléter y se analizó a la concentración de 10 mg equivalentes de alimento larval en 10 µl de disolvente, por pocilla tratada; 10 µl de disolvente se colocaron en las pocillas testigo. Todas las pocillas recibieron larvas 0-15 PC.

Análisis estadístico de los datos

Para cada lámina, se calculó el número de veces que al ácaro *Varroa* se le había observado en las pocillas tratadas y en las testigo, en el intervalo de 30 minutos, y se le empleó ulteriormente para el análisis estadístico. Los resultados de los tratamientos y los testigos, en un juego de datos dados, se compararon mediante la prueba de muestras aleatorias (MANLY, 1991; SOKAL y ROHLF, 1995). En este caso, la distribución aleatoria se volvió a someter al muestreo, en 10⁶ veces, empleando un programa informático diseñado al efecto.

Resultados(a) *Edad de las larvas*

En las pocillas con larvas procedentes de las celdas sin opercular (15 BC) se encontraron más ácaros que en aquellas con larvas procedentes de las celdas operculadas (0-15 PC) (P = 0,016) (cf. Tabla I).

Tabla I

Respuesta de *V. destructor* a larvas de edades distintas. La suma de los resultados de 20 ácaros en las pocillas con una larva en quinto estadio (15) o una larva de una celda operculada (0-15 PC). P representa la significación estadística de la diferencia observada

Replicación	15 PC	0-15	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
tot.	211	128	0.016

(b) *Alimento larval*

El número de ácaros encontrados en las pocillas tratadas con alimento larval fue significativamente mayor (P<0,001) que el observado en las pocillas testigo (cf. Tabla II).

Tabla II

Respuesta de *V. destructor* al alimento larval y sus extractos. Se presenta también los resultados sumados de las pocillas tratadas y testigo. P representa la significación estadística de la diferencia observada.

Tratamiento	Replicaciones	Tratadas	Control	P
Alimento larval	5	249	54	<0,001
Alimento larval -extracto en éter	8	152	56	<0,001
Alimento larval - extracto en acetona	4	110	22	<0,001

(c) *Extractos de alimento larval*

Tanto el extracto de alimento larval en éter como el en acetona determinaron una respuesta significativa en *V. destructor*, reflejada en el hecho de que el número de ácaros que escogieron las pocillas tratadas fue significativamente distinto (P<0,001, en ambos casos) del número registrado en las pocillas testigo (cf. Tabla II).

Discusiones

Los ácaros *Varroa* utilizados en nuestro bioensayo respondieron más intensamente a las larvas en quinto estadio antes del operculado que a las larvas de las celdas operculadas. Esto pudo haberse debido a ciertos compuestos presentes en la cutícula de las larvas en el quinto estadio, pero también podría depender de los compuestos activos presentes en la cutícula larval, a causa de su contaminación por sustancias contenidas en la celda, tales como el alimento larval. En cualquier caso, el resultado del experimento confirmó la eficacia del bioensayo y determinó la elección de las larvas 0-15 PC, menos activas, para los futuros experimentos, destinados a estudiar la actividad biológica de estímulos no larvales.

Al examinar el alimento larval dentro del experimento, se observó una clara respuesta por parte de *V. destructor*; la actividad biológica de los extractos demuestra que el efecto observado se debe a las sustancias semioquímicas contenidas en el propio alimento larval y no a otros índices no específicos (por ej., la humedad).

Los resultados muestran que los índices de índole química, provenientes de una fuente distinta del huésped, están involucrados en el proceso de invasión de las celdas por el ácaro *Varroa*, hecho al parecer bastante sorprendente. Para llevar a la práctica esta función, los índices químicos tienen que ser de confianza, o sea que indiquen claramente al observador la presencia y la disponibilidad del huésped; de hecho, los estímulos detectados hasta ahora en la cutícula larval están incumpliendo este requerimiento específico, al estar muy dispersos por el interior de la colmena. Por otra parte, el alimento larval posee una composición distinta, que también incluye unos cuantos hidroxiácidos (LERCKER et al., 1994).

El aislamiento de las sustancias semioquímicas responsables por la actividad biológica del alimento larval abrió el camino a su identificación. Esto podría contribuir a un mejor entendimiento de la biología del ácaro y sugiere nuevos métodos de combate del parásito.

BIBLIOGRAFIA

- 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'acarion *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.