



Resistencia a acaricidas en *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Arachnida: Acari: Varroidae): papel de la modificación del sitio diana

Joel González-Cabrera¹, Sonia Rodríguez-Vargas², T. G. Emyr Davies³, Linda M. Field³, Daniel Schmehl⁴, James D. Ellis⁵, Klemens Krieger⁶, Martin S. Williamson³

¹ERI BIOTECMED. Department of Genetics. Universitat de València, Spain.

²Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos-CSIC, Valencia, Spain.

³Department of Biological Chemistry and Crop Protection, Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire, UK.

⁴Bayer Division of Crop Science, Pollinator Safety, Research Triangle Park, NC, USA.

⁵University of Florida, Department of Entomology and Nematology, Gainesville, FL, USA.

⁶Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Germany.

RESUMEN

El efecto devastador del ácaro *Varroa destructor* se ha relacionado con la reducción significativa en el número de colmenas de abejas melíferas en gran parte del mundo. Los piretroides sintéticos tau-fluvalinato y flumetrina, comercializados como Apistan® y Bayvarol®, respectivamente, han sido muy efectivos para el control de esta plaga durante décadas, pero su uso intensivo ha provocado la aparición de zonas de elevada resistencia que han limitado su eficacia.

El análisis de muestras del ácaro recogidas en colmenares tanto del Reino Unido como de los Estados Unidos, permitió identificar nuevas mutaciones asociadas a la resistencia a estos productos. Estas mutaciones están localizadas en la zona donde muy probablemente se localiza el sitio de unión de los piretroides a su molécula diana.

La información generada se ha utilizado para diseñar ensayos diagnóstico que permiten diferenciar con gran precisión los ácaros resistentes de los susceptibles. Estos ensayos pueden ser una herramienta muy útil para evaluar los niveles de resistencia en los colmenares y diseñar la mejor estrategia para lograr un control eficaz de la plaga.

NOTA ACLARATORIA: Para tener una versión más detallada de estos trabajos se pueden consultar sus versiones ampliadas (en inglés):

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0082941>

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0155332>

INTRODUCCIÓN

El ácaro ectoparásito *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Arachnida: Acari: Varroidae) provoca daños muy significativos en las colmenas la especie *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Actualmente es considerado uno de los factores más importantes para la pérdida de colmenas en casi todo el mundo. [1,2].

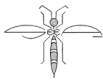
Los piretroides tau-fluvalinato y flumetrina son conocidos por su eficacia en el control de Varroa ya que son capaces de eliminar el 98 % de los ácaros susceptibles [3] sin que se produzca un daño significativo a las abejas. Sin embargo, su uso intensivo en muchos casos indiscriminado y sin control veterinario, ha provocado la evolución de múltiples casos de resistencia [4-12] con lo que su utilización se ha reducido considerablemente en favor de otras alternativas menos eficaces.

El mecanismo de resistencia más común a los piretroides es la modificación del canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC, por sus siglas en inglés), sitio de unión de los piretroides, que está localizado en los axones de las neuronas y otras células excitables [13,14]. En este trabajo nos propusimos investigar si este mecanismo estaba también relacionado con la falta de eficacia del tau-fluvalinato (comercializado como Apistan®) detectada en varias localidades del Reino Unido y de los Estados Unidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Varroa destructor. Las muestras del ácaro, hembras adultas, fueron recogidas por los apicultores, después de haber recibido tratamiento con Apistan®, en colmenas situadas en varias localidades del Reino Unido y de los Estados Unidos. El control estuvo compuesto por ácaros recogidos de colmenas que no





habían sido tratadas con piretroides. Según el experimento a realizar los ácaros fueron recogidos vivos, del interior de las colmenas, o muertos, de las bandejas de inspección.

Secuenciación del VGSC. Se purificó ARN a partir de las muestras de ácaros recogidos vivos y éste fue posteriormente utilizado como molde para sintetizar ADN complementario (ADNc). A su vez el ADNc fue utilizado como molde para amplificar varios fragmentos del canal sodio (VGSC). Todos los fragmentos amplificados fueron secuenciados para obtener la secuencia de ADN correspondiente a los cuatro dominios del canal sodio.

Ensayo diagnóstico TaqMan: Este ensayo emplea la técnica de PCR en tiempo real para discriminar entre las muestras que contienen o no un determinado polimorfismo en su genoma. Se utilizan dos sondas marcadas con un fluoróforo diferente cada una y que hibridan exactamente en la zona donde previamente se ha identificado la mutación. En este caso se realizó la extracción de ADN genómico de ácaros individuales y este fue utilizado como molde en la reacción de PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las modificaciones en la conformación tridimensional de ciertas zonas del VGSC han sido relacionadas con la evolución de resistencia a los piretroides en varias especies de insectos y ácaros. En este estudio secuenciamos el 85 % de la región codificadora del VGSC en las muestras de ácaros recogidos vivos en el Reino Unido. Esta región contiene la zona donde se localiza la mayor parte de las mutaciones que causan la resistencia a piretroides en otras especies y por su naturaleza es la zona involucrada en la función del canal [13,14].

En el Reino Unido, la comparación de las secuencias obtenidas de muestras tratadas con las del control no tratado mostró que existe un único polimorfismo en el sitio de unión que permite

diferenciar ambos grupos de muestras. Esta variación es un cambio de Citosina (C) por Guanina (G) en el ADN, que a su vez provoca un cambio de Leucina (L) por Valina (V) en la posición 925 de la proteína (L925V) (**Figura 1**). En los Estados Unidos, los ácaros resistentes, en lugar de tener la mutación L925V, tenían dos mutaciones diferentes (L925I y/o L925M) pero localizadas en el mismo sitio del canal.

El hecho de que los ácaros que tienen estas mutaciones hayan sido recogidos vivos después del tratamiento con Apistan es una indicación clara de que estos han resistido el efecto tóxico del tau-fluvalinato. Además, estas mutaciones están localizadas en la región del VGSC donde mayor número de mutaciones se han identificado como causantes de la resistencia a los piretroides sintéticos. Esas mutaciones provocan la resistencia conocida como "super-kdr", caracterizada por los altos niveles de resistencia a los piretroides y cuya funcionalidad se ha demostrado en varios estudios de electrofisiología [13,14]. Las mutaciones L925V y L925M, no se habían descrito con anterioridad en otras especies. Sin embargo, la mutación L925I, ha sido correlacionada con la resistencia en al menos cuatro especies plaga de gran importancia económica: *Bemisia tabaci*, *Cimex lectularius*, *Rhipicephalus microplus* y *Trialeurodes vaporariorum* [15-17]. Otras mutaciones localizadas en posiciones cercanas, M918 y T929, han sido también descritas y caracterizadas en otras especies como causantes de altos niveles de resistencia [13,14]. Estudios anteriores de modelización del sitio de unión de los piretroides, realizados en nuestro grupo, apoyan de forma clara la implicación del residuo situado en la posición 925 en el mecanismo de acción con lo que su modificación puede impedir la unión correcta del compuesto activo al sitio diana [18,19].

Con el ánimo confirmar la asociación de L925V, I, M con la resistencia detectada, utilizamos un ensayo diagnóstico

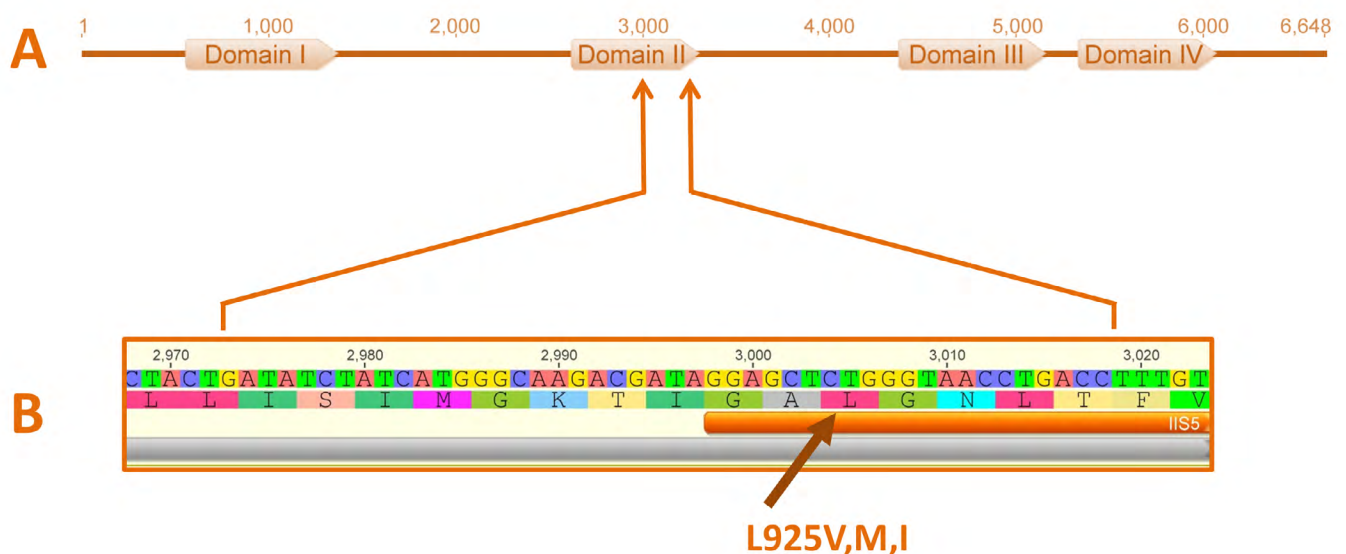


Figura 1. A: Representación esquemática de la distribución de los dominios del canal de sodio (I-IV). **B:** Secuencia de ADN y aminoácidos de la zona del canal de sodio donde se localizan las mutaciones. La flecha indica la posición del aminoácido 925 del canal.



que nos permite determinar si un ácaro tiene alguna de las mutaciones identificadas o no. En la **Figura 2** se muestran los resultados obtenidos tanto con muestras provenientes de colmenas tratadas con piretroides como de otras no tratadas. En el Reino Unido, todos los ácaros que habían sido tratados previamente tenían la mutación mientras que aquellos que no habían sido tratados con piretroides en los últimos 3 años mostraron una distribución más heterogénea con sólo un 8 % de alelos mutantes. En los Estados Unidos, el 98 % de los ácaros que sobrevivieron el tratamiento tenían al menos una de las mutaciones identificadas en esa región. Estos resultados evidencian de forma fehaciente que existe una correlación muy alta entre la presencia de las mutaciones L925V,M,I y el fenotipo resistente. Además, nuestros resultados sugieren que a pesar de los problemas con la resistencia a los piretroides detectados en las últimas décadas, es muy probable que el coste biológico de la resistencia sea muy alto por lo que la mutación causante de ésta no se mantenga en las poblaciones en ausencia de presión de selección. Existe por tanto la posibilidad de volver a utilizar los piretroides con alta eficacia en las zonas donde no esté presente la mutación o donde su frecuencia sea muy baja. Es también absolutamente necesario seguir una estrategia de manejo clara donde se roten productos con diferentes principios activos que mantengan la frecuencia de la mutación en niveles muy bajos.

El ensayo diagnóstico desarrollado por nuestro grupo es una herramienta muy robusta que puede utilizar de forma satisfactoria ácaros muertos que han estado en las bandejas de inspección durante varios días. Es además un método rápido y relativamente barato lo que hace factible el muestreo de los ácaros presentes en las colmenas antes de decidir que tratamiento es el más adecuado en cada caso.

AGRADECIMIENTOS

Joel González-Cabrera ha sido financiado por una beca Marie Curie Intraeuropea dentro del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea y por Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Alemania. Rothamsted Research recibe financiación del "Biotechnology and Biological Sciences Research Council" del

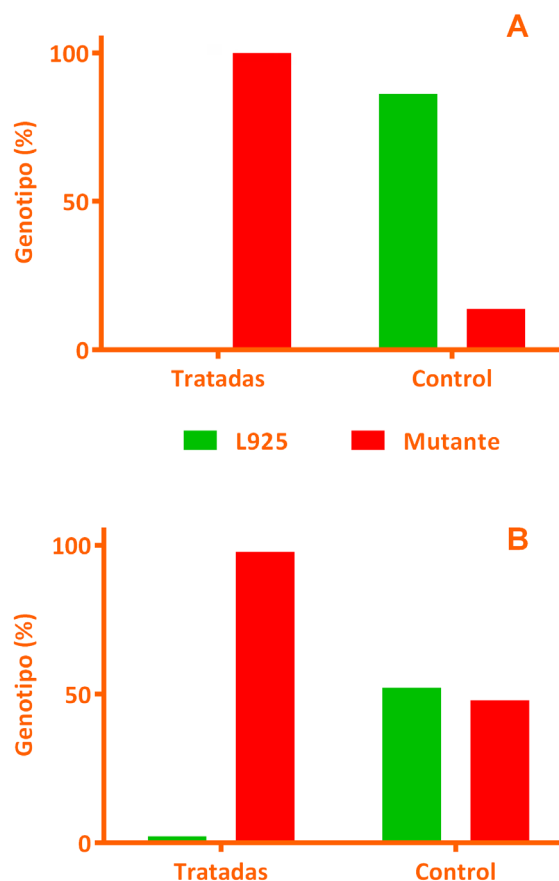


Figura 2. Resultados del análisis TaqMan en tiempo real para el genotipado de ácaros individuales provenientes de colmenas tratadas y no tratadas. Las columnas representan la distribución (en porcentaje) de cada genotipo en el conjunto de muestras. **A:** Muestras del Reino Unido. **B:** Muestras de los USA.

Reino Unido. El trabajo realizado en la Universidad de Florida ha sido financiado en parte por el Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor. Los autores agradecen particularmente a todos los apicultores que suministraron las muestras utilizadas en este estudio.

REFERENCIAS

1. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S96-S119.
2. Cornman SR, Schatz MC, Johnston SJ, Chen YP, Pettis J, et al. (2010) Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BMC Genomics* 11: 602.
3. Baxter JR, Ellis MD, Wilson WT (2000) Field evaluation of Apistan and five candidate compounds for parasitic mite control in honey bees. *American Bee Journal* 140: 898-900.

4. Wang RW, Liu ZQ, Dong K, Elzen PJ, Pettis J, et al. (2002) Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluralinate resistance in the mite, *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research* 41: 17-25.
5. Gracia-Salinas MJ, Ferrer-Dufol M, Latorre-Castro E, Monero-Manera C, Castillo-Hernández JA, et al. (2006) Detection of fluralinate resistance in *Varroa destructor* in Spanish apiaries. *Journal of Apicultural Research* 45: 101-105.
6. Bak B, Wilde J, Siuda M (2012) Characteristics of north-eastern population of *Varroa destructor* resistant to synthetic pyrethroids. *Medycyna Weterynaryjna* 68: 603-606.





- 7. Milani N** (1995) The resistance of *Varroa-Jacobsoni* Oud to pyrethroids - a laboratory assay. *Apidologie* 26: 415-429.
- 8. Elzen PJ, Eischen FA, Baxter JB, Pettis J, Elzen GW, et al.** (1998) Fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni* from several geographic locations. *American Bee Journal* 138: 674-676.
- 9. Sammataro D, Untalan P, Guerrero F, Finley J** (2005) The resistance of varroa mites (Acari : Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology* 31: 67-74.
- 10. Mozes-Koch R, Slabezki Y, Efrat H, Kalev H, Kamer Y, et al.** (2000) First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods. *Experimental and Applied Acarology* 24: 35-43.
- 11. Kim W, Lee M, Han S, Park K, Choi J, et al.** (2009) A geographical polymorphism in a Voltage-Gated Sodium Channel gene in the mite, *Varroa destructor*, from Korea. *Korean Journal of Apiculture* 24: 159-165.
- 12. Thompson HM, Brown MA, Ball RF, Bew MH** (2002) First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie* 33: 357-366.
- 13. Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS** (2007) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59: 151-162.
- 14. Rinkevich FD, Du Y, Dong K** (2013) Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 106: 93-100.
- 15. Yoon KS, Deok Ho Kwon, Joseph P. Strycharz, Craig S. Hollingsworth, Lee SH, et al.** (2008) Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae) *Journal of Medical Entomology* 45: 1092-1101.
- 16. Morgan JAT, Corley SW, Jackson LA, Lew-Tabor AE, Moolhuijzen PM, et al.** (2009) Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. *International journal for parasitology* 39: 775-779.
- 17. Karatolos N, Gorman K, Williamson MS, Denholm I** (2012) Mutations in the sodium channel associated with pyrethroid resistance in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Pest Management Science* 68: 834-838.
- 18. O'Reilly AO, Williamson MS, González-Cabrera J, Turberg A, Field LM, et al.** (2013) Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Manag Sci.*
- 19. O'Reilly AO, Khambay BPS, Williamson MS, Field LM, Wallace BA, et al.** (2006) Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal* 396: 255-263.

