

Selección bidireccional de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) para aumento de la resistencia y la susceptibilidad a la nosemosis

MENDOZA, Yamandú¹, Estela SANTOS², Karina ANTUNEZ³ & Ciro INVERNIZZI²

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Ruta 50 km11, CP 70000, Colonia, Uruguay. E-mail: ymendoza@inia.org.uy

²Facultad de Ciencias. Iguá 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay.

³Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Avenida Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay.

Bidirectional selection of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) for increased resistance and susceptibility to nosemosis

ABSTRACT. Nosemosis is a disease caused by microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, that affects the digestive functions of honey bees. In Uruguay, the only species detected is *N. ceranae*. In order to determine whether the infection by *N. ceranae* in colonies has a genetic component, a bidirectional selection was carried out, selecting resistant and susceptible colonies without parental control. The experiment started with 130 colonies located in a *Eucalyptus grandis* plantation, in autumn 2009, and followed with 30 and 63 colonies during 2010 and 2011. *N. ceranae* infection level of the colonies was determined as 1) the percentage of infected forager bees and 2) the average number of spores per field in 10 fields. The obtained results indicated that the selection response was limited; only in the first generation, bees from resistant colonies presented fewer spore number than bees from the susceptible line (19.6 ± 5.8 and 26.8 ± 10.4 , respectively, $W = 41.5$, $P = .03$). These results suggest that resistance to *N. ceranae* is strongly affected by the environment. Future efforts to increase the resistance of bees to *N. ceranae* through genetic improvement should include parental control.

KEY WORDS. Honey bees. *Nosema ceranae*. Diseases. Breeding. Uruguay.

RESUMEN. La nosemosis es una enfermedad que afecta las funciones digestivas de las abejas melíferas causada por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. En Uruguay la única especie detectada es *N. ceranae*. Para determinar si la incidencia de *N. ceranae* en las colonias tiene un componente genético se realizó una selección bidireccional para aumento de la resistencia y la susceptibilidad a este parásito sin control de la paternidad. Las colonias fueron evaluadas en una forestación de *Eucalyptus grandis* en otoño. La infección de las colonias se determinó como 1) el porcentaje de abejas pecoreadoras infectadas y 2) el número promedio de esporas por campo en 10 campos. El trabajo se inició con 138 colonias y se evaluaron dos generaciones de 30 y 63 colonias. La respuesta a la selección fue muy limitada, solo en la primera generación las colonias de la línea resistente presentaron menos esporas por abejas que las colonias de la línea susceptible ($19,6 \pm 5,8$ y $26,8 \pm 10,4$, respectivamente, $W = 41,5$; $P = 0.03$). Esto indicaría que la resistencia a la nosemosis está fuertemente afectada por el ambiente. Futuros esfuerzos para aumentar la resistencia de las abejas a *N. ceranae* a través de mejora genética deberán incluir el control de la paternidad.

PALABRAS CLAVE. Abejas melíferas. *Nosema ceranae*. Enfermedades. Crianza. Uruguay.

La nosemosis es una enfermedad que afecta las funciones digestivas de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) causada por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Fries, 2010). Las dos especies de *Nosema* se reproducen en las células epiteliales del ventrículo de las abejas afectando las funciones digestivas, lo que conduce a la desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad de las mismas (Fries, 2010).

En Uruguay la única especie detectada es *N. ceranae* (Invernizzi *et al.*, 2009; Antúnez *et al.*, 2013). Esta especie, aparentemente más virulenta que *N. apis*, podría ser la causa de la pérdida de colonias en algunos países europeos (Higes *et al.*, 2010).

La única medida terapéutica para controlar la nosemosis es el antibiótico fumagilina. El uso de este antibiótico está prohibido en Europa (Fries, 2010) y en Uruguay está habilitado solo para los criaderos de reinas (MGAP, 2010).

La posibilidad de reducir la incidencia de la nosemosis seleccionando abejas más resistentes es una alternativa aún poco explorada (Fries, 2010). Los estudios realizados para determinar si existen colonias con mayor resistencia a la nosemosis han obtenido resultados limitados (L'Arrivee, 1965; Rinderer & Sylvester, 1978; Rinderer *et al.*, 1983) y tampoco se ha detectado resistencia diferencial a la enfermedad entre diferentes razas de abejas europeas (Malone *et al.*, 1992; Malone *et al.*, 1995; Malone & Stefanovic, 1999).

Una estrategia muy utilizada para estudiar la herencia de una característica importante es realizar una selección bidireccional para aumentar y disminuir la expresión de la misma. En abejas melíferas este tipo de abordaje se realizó para estudiar la resistencia a la Loque Americana causada por la bacteria *Paenibacillus larvae* (Rothenbuhler, 1964), la resistencia al virus de las abejas sin pelo (Kulinčević & Rothenbuhler, 1975), el comportamiento de acopio (Rothenbuhler *et al.*, 1979), la predisposición para coleccionar polen de alfalfa (Mackensen & Nye, 1969), la tendencia a coleccionar polen (Hellmich *et al.*, 1985; Calderone & Page, 1988), la longevidad de las abejas (Kulinčević & Rothenbuhler, 1982) y la producción de miel (Calderone & Fondrk, 1991), entre otras características.

En Uruguay la nosemosis se presenta con frecuencia en colonias que se trasladan a las

forestaciones de *Eucalyptus grandis* para aprovechar la floración durante el otoño. Así, estas forestaciones constituyen un ambiente adecuado para detectar naturalmente diferencias en las colonias en la resistencia a *N. ceranae*. En estas condiciones se detectaron niveles diferenciales de infección entre colonias de razas europeas y africanizadas (Mendoza *et al.*, 2013). En este estudio se buscó identificar colonias con alta resistencia y susceptibilidad a la nosemosis y ampliar las diferencias a través de selección.

En abril de 2009 se tomaron muestras de abejas pecoreadoras de 138 colonias ubicadas en una forestación de *Eucalyptus grandis* para medir el nivel de nosemosis. De cada muestra se tomaron 30 abejas y se maceraron individualmente con 0,5 ml de agua. Cada suspensión se observó con microscopio óptico a 400x para ver si tenían esporas de *N. ceranae*. La infección de la colonia se determinó como el porcentaje de abejas infectadas (Pickard & El-Shemy, 1989). Como criterio secundario para medir el grado de infección se contó el número de esporas por campo en 10 campos de cada preparado (Invernizzi *et al.*, 2009; Antúnez *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2013). El número de esporas registrado con esta metodología mantiene una relación 1,21:1 con el obtenido con un hemocitómetro siguiendo el método descrito por la OIE (2008) (Estela Santos, información no publicada).

Sobre la base de los resultados obtenidos se seleccionaron cuatro colonias poco infectadas y cuatro muy infectadas para iniciar una línea de colonias resistentes y otra de susceptibles. En la primavera siguiente se obtuvieron reinas de las colonias resistentes y susceptibles que se aparearon libremente sin control de los zánganos. Estas reinas se utilizaron para encastrar las colonias de la primera generación.

En marzo de 2010 se trasladaron 22 colonias de la línea resistente y 8 de la susceptible a una forestación de *E. grandis*. A los 15 días de instaladas las colonias de la primera generación se muestrearon abejas pecoreadoras para determinar el nivel de nosemosis siguiendo la metodología descrita anteriormente. Se escogieron tres colonias poco infectadas de la línea resistente y dos colonias muy infectadas de la línea susceptible. Estas colonias se multiplicaron en primavera para obtener la segunda generación de cada línea.

En marzo de 2011 se trasladaron 34 colonias

de la línea resistente y 29 de la susceptible a una forestación de *E. grandis*. El nivel de nosemosis de las colonias se evaluó de la misma manera que las colonias de la generación anterior.

Para el análisis estadístico de las variables medidas, en primera instancia, se verificó si estas cumplían con los supuestos de la estadística paramétrica. En estos casos las comparaciones se hicieron empleando la prueba de Student, en caso contrario se utilizó la prueba de Wilcoxon. Los cálculos se realizaron empleando el programa estadístico R (R Development Core Team 2012) estableciendo un nivel de significación de 0,05.

La estimación del nivel de nosemosis en las 138 colonias que se encontraban en una forestación de *E. grandis* en otoño del año 2009 mostró que todas las colonias estaban enfermas, con un nivel de infección promedio de $78 \pm 16\%$ de abejas infectadas y 68 ± 35 esporas por campo.

Las cuatro colonias seleccionadas para iniciar la línea resistente de colonias presentaban un promedio de $40 \pm 12\%$ de abejas infectadas, mientras que las cuatro colonias seleccionadas para iniciar la línea susceptible presentaban un 100% de abejas infectadas. Las colonias resistentes tenían en promedio 28 ± 9 esporas por campo, mientras que las susceptibles 142 ± 17 esporas por campo (Fig. 1).

En la primera generación de colonias seleccionadas evaluadas en marzo de 2010 se encontró que las 22 colonias de la línea resistente presentaban en promedio $73 \pm 12\%$ de abejas infectadas, mientras que las 8 colonias de la línea susceptible presentaban en promedio $67 \pm 8\%$ de abejas infectadas, sin encontrar diferencias significativas ($t = 1,65$; $P > 0,10$). El número promedio de esporas por campo que presentaron ambos grupos de colonias fue de $19,6 \pm 5,8$ y $26,8 \pm 10,4$, respectivamente, verificándose diferencias significativas ($W = 41,5$; $P = 0,03$) (Fig. 1). Las tres colonias de la línea resistente seleccionada presentaron en promedio $63 \pm 15\%$ de abejas infectadas y $10 \pm 1,0$ esporas por campo, mientras que las dos colonias de la línea susceptible presentaron $70 \pm 4\%$ de abejas infectadas y $27 \pm 2,8$ esporas por campo.

En la segunda generación de colonias seleccionadas evaluadas en marzo de 2011 se encontró que las 34 colonias de la línea resistente presentaban en promedio $33 \pm 19\%$ de abejas infectadas, mientras que las 29 colonias de la lí-

nea susceptible presentaban en promedio $34 \pm 16\%$ de abejas infectadas, sin encontrar diferencias significativas ($t = 0,24$; $P > 0,10$). El número promedio de esporas por campo que presentaron ambos grupos de colonias fue de $14,5 \pm 14,7$ y $14,3 \pm 10,3$, respectivamente, sin encontrar diferencias significativas ($W = 439$; $P > 0,10$) (Fig. 1).

Los limitados resultados obtenidos luego de seleccionar dos generaciones de colonias indican que la resistencia a la nosemosis seguramente presenta una baja heredabilidad, por lo que no sería fácil mejorarla por selección. Sólo en la primera generación las colonias de la línea resistente se diferenciaron de las de la línea susceptible, y en una sola de las formas de medir la infección (número de esporas por campo). Las diferencias entre las colonias seleccionadas en la población inicial de colonias como resistentes y susceptibles fueron de 2,5 veces el porcentaje de abejas infectadas y de más de cuatro veces el número de esporas por campo. Con estas diferencias notorias, en caso

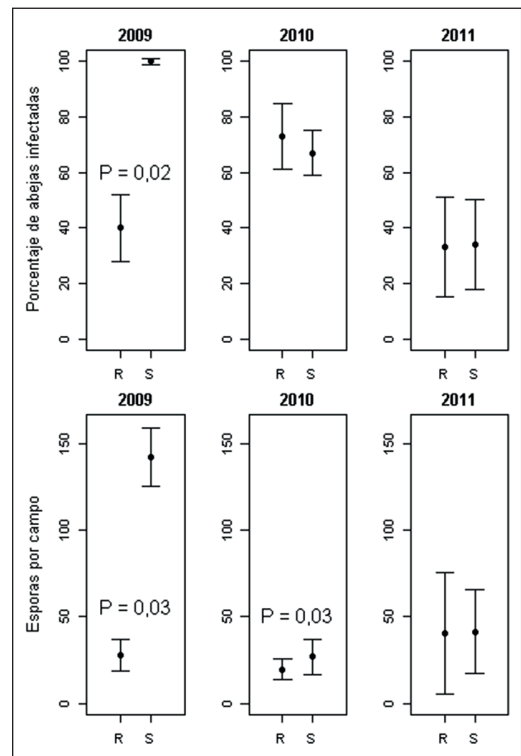


Fig. 1. Porcentaje de de abejas infectadas y promedio de esporas por campo en las tres poblaciones evaluadas (2009: población inicial; 2010: generación 1; 2011: generación 2). El valor de P corresponde a la prueba estadística Wilcoxon.

de que la resistencia a la nosemosis respondiera a selección, las colonias de las líneas resistente y susceptible debieron mostrar niveles de infección más contrastantes.

Otros estudios que abordaron la resistencia genética a la nosemosis tampoco obtuvieron resultados satisfactorios (L' Arrivee, 1965; Rinderer & Sylvester, 1978; Rinderer *et al.*, 1983; Malone *et al.*, 1992; Malone *et al.*, 1995; Malone & Stefanovic, 1999).

El mejoramiento genético en abejas melíferas a través de selección artificial presenta tres dificultades inherentes al sistema de determinación del sexo, organización social y sistema de reproducción que reducen la respuesta a la selección (Calderone & Fondrk, 1991).

En primer lugar, existe un efecto de casta debido a que en una colonia están presentes simultáneamente dos generaciones, la reina y sus hijas obreras. Sin embargo, las obreras son las que realizan todas las tareas, excepto la puesta de huevos. Cuando se selecciona una colonia valiosa para multiplicar se obtienen reinas a partir de larvas de obreras menores a tres días y en la siguiente generación se vuelven a evaluar las obreras. Quiere decir que entre dos generaciones se comparan las respuestas entre tías y sobrinas. En las abejas el coeficiente de relación genética (r) entre tías y sobrinas tiene un valor máximo de 0,375 si la colonia es monoándrica (producto del sistema haplodiploide de determinación del sexo). En cambio, el valor del coeficiente entre madre e hija es de 0,5. La diferencia entre ambos valores es considerado como el costo que tiene el proceso debido al efecto de casta (Calderone & Fondrk, 1991).

En segundo lugar, la poliandria de las colonias, consecuencia del apareamiento múltiple de las reinas, reduce drásticamente el coeficiente de relación promedio entre las obreras aproximándose a 0,25 a medida que aumenta el número de apareamientos. Como consecuencia la relación genética entre tías y sobrinas también disminuye de acuerdo a la siguiente fórmula: $r = (1/n)(0,375) + ((n-1)/n)(0,125)$, donde n es el número de zánganos que copulan con la reina (Calderone & Fondrk, 1991). Otra distorsión que produce la poliandria, en un proceso de selección, es que las larvas escogidas para criarlas como reinas no tienen por qué representar a los mejores genotipos (Perez-Sato *et al.*, 2009).

Por último, cuando las reinas que van a en-

cabezar las colonias de la siguiente generación salen a aparearse libremente, tienen acceso a cientos de zánganos de diferente origen, provenientes de colonias ubicadas en un radio de 7 kilómetros del lugar de donde salió (Winston, 1987). El hecho de no controlar la paternidad de las obreras reduce el control genético a sólo la mitad de la dotación genética de las abejas.

Los tres efectos mencionados actuando simultáneamente enlentecen el proceso de mejora genética y pueden explicar en parte las dificultades encontradas para ampliar la resistencia a la nosemosis.

Una alternativa para superar la falta de control de la paternidad es utilizar inseminación artificial (Harbo, 1986) o aparear las reinas en zonas aisladas sin colmenas (Oxley *et al.*, 2010).

La búsqueda de abejas con mayor resistencia a la nosemosis es una estrategia que puede beneficiar a la industria apícola teniendo en cuenta las restricciones al uso de fumagilina, único antibiótico con probada eficacia contra *Nosema* spp. (Fries, 2010). Los resultados de este estudio muestran que la selección artificial llevada adelante multiplicando las reinas sin control de paternidad no produce mejoras significativas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ANTÚNEZ, K., Y. MENDOZA & C. INVERNIZZI. 2013. Differential expression of vitellogenin in honeybees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research* 52: 227-234.
- CALDERONE, N. W. & R. E. PAGE 1988. Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 22: 17-25.
- CALDERONE, N. W. & M. K. FONDRK. 1991. Selection for high and low, colony weight gain in the honey bee, *Apis mellifera*, using selected queens and random males. *Apidologie* 22: 49-60.
- FRIES, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S73-S79.
- HARBO, J. R. 1986. Propagation and instrumental insemination. En: Rinderer, T. E. (ed.), *Bee Genetics and Breeding*, Academic Press, Orlando, FL, pp. 361-389.
- HELLMICH, R. L., J. M. KULINCEVIC & W. C. ROTHENBUHLER. 1985. Selection for high and low pollen-hoarding honey bees. *Journal of Heredity* 76: 155-158.
- HIGES, M., R. MARTÍN-HERNÁNDEZ & A. MEANA. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: An emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41: 375-392.
- INVERNIZZI, C., C. ABUD, I. TOMASCO, J. HARRIET, G. RAMALLO, J. CAMPA, H. KATZ, G. GARDIOL & Y. MENDOZA. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 150-153.
- KULINCEVIC, J. M. & W. C. ROTHENBUHLER. 1975. Selection for resistance and susceptibility to hairless-black syndrome in the honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology* 25: 289-295.

- KULINCEVIC, J. M. & W. C. ROTHENBUHLER. 1982. Selection for length of life in the honeybee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 13: 347-352.
- L'ARRIVEE, J. C. M. 1965. Tolerance of honey bees to nosema disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 7: 408-413.
- MACKENSEN, O. & W. P. NYE. 1969. Selective breeding of honey bees for alfalfa pollen collection: sixth generation and outcrosses. *Journal of Apicultural Research* 8: 9-12.
- MALONE, L. A., H. A. GIACON, R. J. HUNAPO & C. A. MCIVOR. 1992. Response of New Zealand honey bee colonies to *Nosema apis*. *Journal of Apicultural Research* 31: 135-140.
- MALONE, L. A., H. A. GIACON & M. R. NEWTON. 1995. Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. *Apidologie* 26: 495-502.
- MALONE, L.A. & D. STEFANOVIC. 1999. Comparison of the responses of two races of honeybees to infection with *Nosema apis* Zander. *Apidologie* 30: 375-382.
- MENDOZA, Y., ANTÚNEZ, K., BRANCHICCELA, B., ANIDO, M., SANTOS, E. & C. INVERNIZZI. 2013. Nosema ceranae and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie* DOI: 10.1007/s13592-013-0241-6.
- MGAP, 2010. Decreto presidencial 14_6_2010- Oxitetraciclina y Fumagilina- Retiro y/o limitación uso en Uruguay. Available at: www.mgap.gub.uy.
- OIE Terrestrial Manual, 2008. Chapter 2.2.4. Nosemosis of honey bees.
- OXLEY, P. R., P. HINHUMPATCH, R. GLOAG & B. P. OLDROYD. 2010. Genetic evaluation of a novel system for controlled mating of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Heredity* 101: 334-338.
- PEREZ-SATO, J. A., N. CHÂLINE, S. J. MARTIN, W. O. H. HUGHES & F. L. W. RATNIEKS. 2009. Multi-level selection for hygienic behaviour in honeybees. *Heredity* 102: 609-615.
- PICKARD, R. S. & A. A. M. EL-SHEMY. 1989. Seasonal variation in the infection of honeybee colonies with *Nosema apis* Zander. *Journal of Apicultural Research* 28: 93-100.
- R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org>.
- RINDERER, T. E., A. M. COLLINS & M. A. BROWN. 1983. Heritabilities and correlations of the honey bee: response to *Nosema apis*, longevity, and alarm response to isopentyl acetate. *Apidologie* 14: 79-85.
- RINDERER, T. E. & H. A. SYLVESTER. 1978. Variation in response to *Nosema apis*, longevity, and hoarding behavior in a free-mating population of the honey bee. *Annals of the Entomological Society of America* 71: 372-374.
- ROTHENBUHLER, W. C. 1964. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and back-cross generations to disease-killed brood. *American Zoologist* 4: 111-123.
- ROTHENBUHLER, W. C., J. M. KULINČEVIC & V. C. THOMPSON. 1979. successful selection of honeybees for fast and slowhoarding of sugar syrup in the laboratory. *Journal of Apicultural Research* 18: 272-278.
- WINSTON, M. L. 1987. *The Biology of the Honeybee*. Harvard University Press. Cambridge, MA.