

# RESUMEN

La abeja de la miel *Apis mellifera* es la principal especie polinizadora empleada por el hombre para aumentar la productividad de los cultivos, y además desempeña una importante función en el mantenimiento de la biodiversidad en todo el mundo. En las últimas décadas, se ha apreciado un incremento de la mortalidad de las colonias de abejas en numerosas regiones, lo que ha llevado a generar una gran alarma debido a sus potenciales repercusiones económicas y medioambientales. Este fenómeno, caracterizado por no tener una causa conocida, se ha clasificado principalmente en “Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas” (SDC), cuando presenta una sintomatología concreta de despoblamiento de abejas adultas, o simplemente “mortalidad invernal”, cuando las colmenas no superan el invierno por causas no identificadas. Estas pérdidas se han observado también en España, el país con mayor censo de colmenas de la Unión Europea e importante productor de miel. Esta situación ha generado la necesidad de estudiar las causas de tales pérdidas. Actualmente se considera que no existe una causa única que explique esta mortalidad sino que, por el contrario, se trata de un fenómeno en el que la interacción de varios factores afecta a las colonias. Entre estos factores considerados ‘de riesgo’ destacan la mala nutrición y la escasez de recursos, la climatología adversa y el cambio climático, la exposición a pesticidas neonicotinoides empleados en los cultivos donde pecorean las abejas, la presencia de depredadores naturales y especies invasoras y la acción de los patógenos presentes en las colmenas. Entre los patógenos que pueden afectar a la abejas, destacan los virus porque a pesar de conocerse su amplia distribución y prevalencia en las colmenas y haber sido asociados con eventos de mortalidad de colonias de abejas, aún son muchos los interrogantes sobre su patogenia, cómo se ven afectados por otros factores y cómo son capaces de alterar el equilibrio con el hospedador produciendo estados patológicos.

Esta tesis doctoral, que lleva el título **“Análisis virológico y epidemiológico del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas en España. Estudio de causas y consecuencias”**, se ha centrado en el estudio de la implicación de los virus de abeja en las pérdidas de colmenas desde una perspectiva global, estudiando tanto aspectos del diagnóstico de virus, como de su epidemiología, considerando la asociación con otros factores que tienen un potencial efecto sobre las colonias. El trabajo desarrollado en la presente tesis ha generado cuatro artículos científicos, dos de ellos publicados y otros dos en fase de revisión en revistas científicas de impacto. Por un lado, estos artículos abarcan la aplicación del diagnóstico molecular y la metagenómica para la detección de virus presentes

en muestras de colmenas que presentan síntomas compatibles con el SDC (objetivos 1 y 2). Por otro lado, considerando las peculiaridades de las infecciones víricas en abejas y que las pérdidas de colmenas son un fenómeno multifactorial, se ha integrado el diagnóstico vírico en estudios epidemiológicos en los que se han considerado la influencia de otros factores, tanto internos como externos a la colmena, en el efecto patógeno que producen los virus. Así, se ha estudiado la presencia, carga vírica y estacionalidad de los virus de abeja que destacan por su potencial patógeno en dos regiones de España, Andalucía y Comunidad de Madrid, y se ha evaluado su relación con factores como las técnicas de manejo y la presencia de otros patógenos en la colmena (objetivos 3 y 4).

El **primer objetivo** de esta tesis doctoral fue estudiar la potencial relación del virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) con el SDC en colonias de abejas en España. Este virus había sido señalado como potencial indicador del SDC en EEUU en 2007, y su presencia en España fue detectada a partir del año 2010. En este objetivo, sin embargo, se cuantifica por primera vez y se analiza su potencial implicación con el SDC en nuestro país, seleccionando como área de estudio la CCAA de Andalucía. Se determinó mediante RT-PCR que la frecuencia de IAPV en las colmenas muestreadas fue del 13.5% y la carga media  $4.9 \times 10^5$  copias de genoma equivalente (CGE)/abeja, aunque se detectaron cargas de entre  $10^2$  y  $10^7$  CGE/abeja en las colonias muestreadas. Sin embargo, no se encontró asociación entre las colmenas que mostraban debilidad y la presencia de IAPV, observándose que las cargas más altas se encontraron tanto en colonias sanas como débiles. Esto parece indicar que altas cargas de IAPV no producen el colapso de las colmenas por sí solas, aunque sería interesante comprobar a nivel molecular e histopatológico si esta carga de IAPV produce daño a nivel individual. Además, se estudió el origen de la variante de IAPV presente en Andalucía mediante un análisis filogenético que reveló que dicha variante se agrupa junto con muestras de Francia en un clúster diferente del de la primera muestra descrita en España, concretamente en Valencia. Por tanto, estos resultados indican la presencia de dos linajes de IAPV evolutivamente distintos y con diferente origen en España.

El **segundo objetivo** de esta tesis doctoral fue analizar la presencia de virus desconocidos potencialmente implicados en el SDC mediante metagenómica. Este objetivo surge por las limitaciones del diagnóstico de virus de abeja como: la ausencia de producción de anticuerpos, la imposibilidad de emplear cultivos celulares para su crecimiento, las infecciones mixtas y las limitaciones propias del diagnóstico molecular, que requiere del conocimiento previo de la secuencia del virus. La metagenómica se basa en la secuenciación masiva del genoma vírico, por lo que no se ve afectada por estas limitaciones y por tanto

ofrece una alternativa y una oportunidad única para el estudio de los virus implicados en la pérdida de colonias. Mediante este enfoque, se estudiaron los virus presentes en una muestra de una colonia que presentaba síntomas de SDC en un colmenar de Navarra. Se detectaron tres virus de abeja en coinfección en la muestra: IAPV y, por primera vez en Europa, los virus de la parálisis letal de los ápidos (ALPV) y del Lago Sinaí (LSV), dos virus previamente descritos en EEUU de los que es necesario estudiar su patogenia y su efecto concreto en el SDC. Por su parte, en análisis filogenético de IAPV reveló su similitud con la variante previamente descrita en Andalucía y otras secuencias descritas en Francia, lo cual podría explicarse por su proximidad geográfica. Además, este estudio reveló que las abejas pueden ser portadoras de un virus de planta, el virus del mosaico del nabo (TuRSV), constituyendo un potencial vector de este virus.

El **tercer objetivo** de esta tesis doctoral fue determinar las prácticas de manejo que pueden influir en el efecto de las infecciones víricas sobre la salud de las colmenas. Entender el efecto de las prácticas de manejo sobre la dinámica de los virus en las colonias puede ayudar en su optimización como estrategia para la prevención de enfermedades víricas, que pueden desencadenar el colapso de las colonias. Para ello se realizó un extensivo muestreo en la CCAA de Andalucía para caracterizar las prácticas de manejo y la presencia y carga de virus de abeja (virus de las alas deformadas (DWV), virus de la realera negra (BQCV), virus de la parálisis aguda (ABPV), IAPV, virus Kashmir (KBV), virus de la cría sacciforme (SBV) y virus de la parálisis crónica (CBPV)), en dos muestreos en primavera-verano y otoño-invierno. Se observó un ligero empeoramiento del estado sanitario de las colonias en otoño-invierno, coincidiendo con una mayor presencia de enfermedad fúngica y síntomas inespecíficos como pillaje, aunque no se notificó la presencia de síntomas víricos. La presencia de virus fue común en ambos muestreos, aunque sólo BQCV y DWV fueron detectados en todas las provincias en los dos muestreos y sólo en el caso de DWV se apreció una tendencia de aumento de presencia y carga entre los dos muestreos, aunque no superaron el orden de  $10^7$  CGE/abeja y no se observaron síntomas de deformidad en las alas. El estudio de las relaciones entre las prácticas de manejo y la presencia de virus reveló tendencias para BQCV y DWV, destacando la asociación de prácticas y factores relacionados con un manejo profesional con una menor presencia vírica. Por tanto, la formación en técnicas de manejo es esencial para mantener un óptimo estado sanitario de las colmenas.

El **cuarto objetivo** de esta tesis doctoral fue analizar la dinámica y las interacciones de los virus junto con otros patógenos y su implicación en el debilitamiento de las colmenas. Para ello se caracterizó la presencia de virus (DWV, BQCV, ABPV, IAPV, KBV y SBV), un

microsporidio (*Nosema ceranae*) y un parásito (*Varroa destructor*), en muestras de abejas adultas y cría, durante los periodos de primavera-verano y verano-otoño, en seis colmenares comerciales situados en entorno natural en la CCAA de Madrid. Se observó que la presencia de patógenos fue frecuente en las colonias durante primavera-verano, pero tanto la prevalencia como la carga de patógenos aumentaron en verano-otoño junto con la presencia de sintomatología evidente y debilidad en las colonias. El análisis de componentes principales mostró que las colonias de un mismo colmenar tienen presencia y cargas de patógenos similares, y por tanto, la caracterización del entorno de las colmenas puede ser clave en el estudio de la dinámica de los patógenos en las colonias. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre los virus BQCV y SBV en las dos estaciones, y una correlación entre DWV y Varroa en verano-otoño. El debilitamiento de las colonias se relacionó con la presencia de altas cargas de DWV en verano-otoño, cuando se observó la presencia de sintomatología abierta. Además, el estudio por separado de muestras de abejas adultas y cría reveló que la cría tiene mayor carga de DWV en esta época del año, indicando que puede ser una muestra interesante en el estudio de la interacción Varroa-DWV y su implicación en el colapso de las colonias. Por último, en este estudio se describe por primera vez la presencia del virus ABPV en España.

Por tanto, esta tesis doctoral ha supuesto un gran avance en el estudio de la implicación de los virus en la pérdida de colonias desde una perspectiva multidisciplinar, combinando diagnóstico y epidemiología, en colonias de España, cuyo sector apícola es el más importante de la Unión Europea en censos y producciones. Los resultados de esta tesis permitirán implementar medidas de control y vigilancia que ayuden a minimizar el efecto de los virus sobre las colmenas y a mantener el estado sanitario de las mismas.