

Informe final publicable de proyecto

Descifrando la relación entre las abejas melíferas y el ácaro Varroa destructor

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_162302

01/03/2023

ARREDONDO PAPIOL, Daniela (Responsable Técnico - Científico)

INVERNIZZI CASTILLO, Ciro (Investigador)

JURI TOMÁS, Pablo Andrés (Investigador)

NOGUEIRA ROBALLO, Enrique (Investigador)

ZUNINO ABIRAD, Pablo (Investigador)

AÑON, Guillermo (Investigador)

ANTÚNEZ CLAUSTRE, Karina (Investigador)

BRANCHICCELA CORREA, Maria Belen (Investigador)

CASTELLI NORANDO, Loreley (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"

(Institución Proponente) \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE VETERINARIA \\

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA \\ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

El ácaro *Varroa destructor* es el principal ectoparásito que afecta a las colonias de *Apis mellifera* y representa una amenaza para su sobrevivencia. Este parásito obligatorio pasa su vida dentro de la colonia y se reproduce dentro de las celdas operculadas. Las pupas son debilitadas debido a que el ácaro se alimenta de los cuerpos grasos, reduciendo la vida media de las abejas y transmitiendo diversos virus. Este ácaro, junto con el virus de las alas deformes (DWV) están involucrados en los episodios de pérdidas de colonias que se han reportado alrededor del mundo ya que si las colonias no son tratadas con acaricidas, mueren. Algunas poblaciones de abejas presentan mecanismos naturales de defensa para superar la infestación por ácaros y/o los virus transmitidos por éstos, y pueden sobrevivir sin la necesidad de tratamientos. Este parece ser el caso de las poblaciones de abejas presentes en el noreste de Uruguay. El objetivo de este proyecto fue comprender los mecanismos involucrados en la sobrevivencia de las colonias de *A. mellifera* a *V. destructor* y cómo influye esta interacción en los virus presentes en estas poblaciones. En este trabajo se encontró que las abejas sobrevivientes muestran un mayor comportamiento higiénico frente a la varroa, producen mayor cantidad de miel y poseen menor nivel de infestación con *Varroa* y menor nivel de infección con diversos virus. En este trabajo además, se caracterizó el viroma de estas poblaciones y se detectaron algunos virus que no estaban descritos en Uruguay. Por último, se observó que los ácaros de las poblaciones sobrevivientes y de las susceptibles son similares desde el punto de vista de la genética. Los resultados obtenidos nos ayudan a comprender la dinámica de la interacción abeja-varroa-virus, lo que servirá como base para poder avanzar hacia un control sustentable de las poblaciones de ácaros en Uruguay.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Sanidad animal

Palabras clave: abejas melíferas sobrevivientes / abejas *Apis mellifera* sobrevivientes a *Varroa destructor* / Virus de las alas deformes /

Introducción

1. Antecedentes

La abeja melífera (*Apis mellifera*) es el principal insecto polinizador tanto de cultivos agrícolas como de especies silvestres y representan entre el 60-95% de todos los polinizadores en diferentes ambientes naturales (Dedej et al., 2003; Klein et al., 2006; Breeze et al., 2016). Además de su importancia en la polinización, las abejas generan diversos productos, como miel, polen, jalea real, propóleos y apitoxina. En los últimos años se han reportado pérdidas masivas de colonias de abejas melíferas alrededor del mundo (Neumann y Carreck, 2010; Requier et al., 2018), asociadas a factores de estrés ambiental así como estrés biótico. La intervención de los seres humanos en la vida de las abejas, a través de la apicultura y su uso para servicios de polinización, ha favorecido la propagación de plagas y patógenos como el ácaro *Varroa destructor* y diferentes virus ARN (Goulson et al., 2015; Steinhauer et al., 2018). La apicultura en Uruguay involucra 2600 apicultores registrados que poseen unas 600.000 colonias (MGAP-DIGEGR). El 90% de la producción de miel es exportada principalmente a Estados Unidos y Europa generando divisas de entre 15 y 31 millones de dólares al año por este concepto (Anuario OPYPA, 2021). Además, se ha reportado que al menos 100.000 de las colmenas registradas brindan servicios de polinización en diferentes cultivos (Santos et al., 2019), estimándose el valor económico atribuible a este servicio en 54 millones de dólares anuales (Santos y Varela, 2016). Si bien la apicultura en Uruguay ha crecido y el sector se ha consolidado, en la última década se ha observado una disminución sostenida del número de apicultores. Esto puede deberse a que el sector apícola ha enfrentado diversos desafíos en los últimos años y, para mantener la productividad por colonia, se requiere cada vez mayor inversión y trabajo. De acuerdo al monitoreo nacional de pérdidas de colonias, se pierden entre el 25 y 30% de las colonias al año (Antúnez et al., 2017; Requier et al., 2018) y así como en el resto del mundo, se ha identificado que los productores las asocian a la presencia de diversas plagas y patógenos que están presentes y ampliamente distribuidos (Anido et al., 2015; Antúnez et al., 2017).

- *Varroa destructor*

El ácaro *Varroa destructor* es la principal amenaza biótica de *A. mellifera* (Anderson y Trueman, 2000; Traynor et al., 2020). Este parásito se reproduce dentro de las celdas de cría operculada y se alimenta de los cuerpos grasos de las pupas, y posteriormente de la abeja adulta (Ramsey et al., 2019). Esto ocasiona el debilitamiento del sistema inmune, favorece la infección por patógenos y disminuye la vida media de las abejas (Anderson y Trueman, 2000; Yang y Cox-Foster 2005; Beaupaire et al., 2020). Un alto nivel de parasitación con *V. destructor* puede ser letal para las colonias, por esto,

las colonias deben ser tratadas adecuadamente con acaricidas (Rosenkranz et al., 2010; Goulson et al., 2015). Por otra parte, la presencia de *V. destructor* en las colonias no sólo es un problema en sí mismo, sino que actúa como vector y favorece la infección por múltiples virus ARN (Beaurepaire et al., 2020; Traynor et al., 2020). Se ha descrito que cuando se incrementa la población de *V. destructor* también lo hace la transmisión de virus y las cargas virales, lo que puede ocasionar que virus que estaban presentes en baja carga y sin desarrollar síntomas, se conviertan en infecciones sintomáticas (Beaurepaire et al., 2020).

- Virus de las abejas

Al día de hoy se han identificado más de 80 virus en abejas y muchos otros permanecen aún sin ser caracterizados (Beaurepaire et al., 2020). Diferentes estudios revelaron que los virus de ARN de polaridad positiva son los principales agentes infecciosos de las abejas (Chen y Siede, 2007; Brutscher et al., 2016; Gisder y Genersch, 2017). Los virus en las abejas pueden transmitirse tanto horizontal como verticalmente dentro de la especie (Grozinger y Flenniken, 2019; Beaurepaire et al., 2020) y también se ha descrito que puede haber derrame entre diferentes géneros de abejas (Colla et al., 2006; Kojima et al., 2011; Alger et al., 2019; Manley et al., 2019; Tehel et al., 2019; Salvarrey et al., 2021) y a depredadores de las abejas como es el caso de la avispa *Vespa velutina* (Marzoli et al., 2021). Cuatro de estos virus han adquirido más atención en la última década por su impacto negativo en la salud de las abejas, estos son: el Acute bee paralysis virus (ABPV), el Black queen cell virus (BQCV), el Deformed wing virus (DWV) y el Sacbrood virus (SBV). Los virus ARN tienen altas tasas de mutación y existen como una población diversa de variantes o cuasiespecies (Domingo et al., 2012). Un ejemplo, es el caso del DWV, del cual ya se han descrito al menos 3 variantes con diferente virulencia (Mordecai et al., 2016; Kevill et al., 2017; Kevill et al., 2019).

Cabe destacar que los análisis de secuencias de virus identificados a partir de datos metagenómicos están cambiando nuestra percepción de la evolución de los virus y el papel que desempeñan (Roossinck et al., 2015; Quer et al., 2022). El conocimiento de los viomas de los insectos no es una excepción y se ha observado que la gran mayoría de los virus están infectando a las abejas de manera asintomática (Roossinck et al., 2015).

- Colonias sobrevivientes a *V. destructor*

A pesar del profundo impacto generado por *V. destructor*, se ha observado que algunas poblaciones de abejas melíferas, sobreviven con éxito al parásito sin ningún tratamiento (Locke, 2016). Se ha observado que las poblaciones sobrevivientes de Brasil y Sudáfrica presentan un mayor comportamiento higiénico (limpieza de celdas conteniendo pupas muertas), mayor grooming (eliminación de ácaros mediante auto y aloacicalamiento), un tamaño de colonia más pequeño, y una reducción del tiempo de desarrollo de las abejas, que lleva a que la varroa no pueda reproducirse eficazmente (Locke, 2016). Mientras que en Francia se observó que el principal rasgo es la reducción de la reproducción del ácaro (Locke et al., 2012a; Locke, 2016). Las poblaciones de abejas sobrevivientes a *V. destructor* poseen otra característica destacable, y es que son capaces de sobrevivir a altos niveles del DWV, niveles que para abejas susceptibles serían letales (Locke, 2016).

El uso de estas poblaciones de abejas sobrevivientes a *V. destructor* en programas de mejoramiento genético ha mostrado resultados alentadores, constituyendo una gran alternativa al uso de tratamientos acaricidas que pueden perjudicar a la colonia y a la producción de miel (Locke et al., 2014; Büchler et al., 2014; Moro et al., 2021).

En el noreste de Uruguay, en el departamento de Treinta y Tres, se identificó una población de abejas sobrevivientes a *V. destructor*. Estas colonias hace más de 7 años que no se tratan con acaricidas, y si bien el ácaro está presente, las colonias consiguen sobrevivir. Sin embargo se desconoce la relación entre estas abejas sobrevivientes, el ácaro y los virus presentes en nuestro país (ABPV, BQCV y SBV). Por eso consideramos que es necesario profundizar en el estudio de los viomas asociados a las poblaciones sobrevivientes y susceptibles, esto nos permitirá comprender los posibles papeles funcionales y ecológicos de estos virus (Grozinger y Flenniken, 2019; McMenemy y Flenniken, 2018; Roossinck et al., 2015).

Las hipótesis de partida fueron:

- Las colonias sobrevivientes presentan menor nivel de infestación por *V. destructor* que las colonias susceptibles
- Las colonias sobrevivientes presentan poblaciones de virus diferentes a las colonias susceptibles, y éstas varían de primavera a otoño. En particular, las colonias sobrevivientes presentan menor nivel de infección por DWV que las colonias susceptibles.
- Las colonias sobrevivientes poseen mayor comportamiento defensivo frente al ácaro (grooming y comportamiento higiénico) que las colonias susceptibles.

El objetivo general de este proyecto fue identificar los mecanismos involucrados en la sobrevivencia de las colonias de abejas *A. mellifera* frente al ácaro *V. destructor* y evaluar cómo influye esta interacción en los virus presentes en estas poblaciones de abejas.

De este objetivo general se desprendieron cuatro objetivos específicos.

Evaluar y comparar la dinámica temporal de *V. destructor* y de las abejas melíferas en colonias sobrevivientes al ácaro y colonias susceptibles.

Evaluar y comparar la dinámica temporal del virus DWV en colonias sobrevivientes a *V. destructor* y colonias susceptibles, así como evaluar las variantes circulantes

Caracterizar el viroma de las colonias sobrevivientes y susceptibles a *V. destructor*

Cuantificar la resistencia comportamental (comportamiento higiénico y grooming) de las colonias sobrevivientes a *V. destructor* y las colonias susceptibles.

2. Abordaje, descripción del estudio y resultados esperados

Para alcanzar este objetivo instalamos un grupo de colonias sobrevivientes y otro de susceptibles en un apiario experimental en el departamento de Treinta y Tres. Estas colonias se monitorearon durante 6 meses y se evaluó la fortaleza de las colonias y el nivel de infestación por *V. destructor*. Se tomaron muestras de abejas nodrizas en primavera, verano y otoño para cuantificar la presencia de *V. destructor*, la carga de los virus que revisten mayor importancia (ABPV, BQCV, DWV y SBV) y para estudiar el perfil completo de virus ARN que infectan a las abejas de ambas poblaciones. A su vez, se analizó si el grooming, el comportamiento higiénico frente a *V. destructor* y la reducción de la reproducción del ácaro definían a las colonias sobrevivientes y si bien no estaba previsto, en el marco de una colaboración con el INRAE de Avignon se estudió si existían variaciones genéticas en los ácaros circulantes en ambos tipos de colonias.

Resultados esperados

De acuerdo a cada objetivo específico:

1. Se esperaba que las colonias sobrevivientes a *V. destructor* presentaran una mayor fortaleza y un menor porcentaje de infestación con *Varroa* que las colonias susceptibles.
2. Se esperaba observar un menor nivel del DWV en las colonias sobrevivientes al terminar el ensayo.
3. Se esperaba encontrar diferencias en el viroma de ambas poblaciones.
4. Se esperaba encontrar diferencias entre ambas poblaciones, siendo las abejas sobrevivientes a *Varroa* las que presenten valores más altos de VSH, SMR y grooming.

Metodología/diseño del estudio

1.- Dinámica poblacional, de *Varroa destructor* y del DWV en colonias sobrevivientes y sensibles al ácaro

1.1- Instalación de los apiarios.

Se instaló en el departamento de Treinta y Tres (Uruguay) un apiario experimental con 20 colonias sobrevivientes a *V. destructor*, y 20 colonias susceptibles que fueron niveladas en cantidad de abejas y de cría y de cuadros con miel. Las colonias sobrevivientes a *V. destructor* pertenecían al Apiario Experimental de INIA Treinta y Tres y no han recibido ningún tratamiento frente a este ácaro durante más de 7 años. Por otro lado, las colonias susceptibles pertenecían al Apiario Experimental de INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay), y son colonias que reciben anualmente tratamiento sintético frente al ácaro. Doce colonias de cada grupo se emplearon para los ensayos incluidos en los puntos 1 y 2, mientras que las colonias restantes se emplearon para los ensayos incluidos en el punto 3.

1.2.- Seguimiento de las colonias

Se realizó el seguimiento de las colonias desde la primavera (setiembre) hasta el siguiente otoño (marzo). En cada visita (primavera, verano y otoño) al apiario se evaluó la fortaleza de la población de abejas y de cría y se tomaron muestras de abejas nodrizas para monitorear el nivel de infestación por *V. destructor* y nivel de infección por los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV. Se colectaron 200 abejas nodrizas por colonia que fueron almacenadas en alcohol, para el análisis de *V. destructor*. A la vez, se colectaron 70 abejas nodrizas por colonia y se mantuvieron vivas hasta llegar al laboratorio, y se almacenaron a -80°C, para el análisis de virus. Por último, al final del ensayo (marzo) se cosechó y evaluó la producción de miel de las colonias que participaron del ensayo.

1.3 -Fortaleza de las colonias

La fortaleza de las colonias se evaluó mediante estimación visual de la cantidad de población adulta y cría. Al final del ensayo se evaluaron las reservas de miel de todas las colonias. Se empleó el método subjetivo descrito en el manual COLOSS Beebook (Delaplane et al., 2013).

1.4 -Tasa de infestación por *V. destructor*.

Se determinó el porcentaje de infestación por el ácaro de acuerdo a lo descrito por Dietman et al. (2013) en las muestras colectadas en primavera, verano y otoño.

1.5 -Nivel de infección por virus ARN

Se analizó la dinámica estacional de cinco de los virus que revisten mayor importancia en la apicultura en setiembre y en marzo.

Para esto se emplearon 20 abejas de cada colonia sobreviviente y susceptible almacenadas a -80°C . Se realizó la extracción del ARN, la degradación de ADN genómico y la retrotranscripción a ADNc empleando kits comerciales de (Applied Biosystems). La presencia y nivel de infección de los virus se evaluó mediante qPCR empleando el kit Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y primers específicos para cada virus: ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV (Locke et al., 2012b). Se realizó la cuantificación absoluta del nivel de infección viral utilizando una curva estándar con diluciones seriadas de un fragmento del virus de concentración conocida (Dalmon et al., 2019; Castelli et al., 2021).). Posteriormente se determinó la variante circulante del virus DWV en las abejas de las colonias sobrevivientes y susceptibles empleando el sistema ABC (Kevill et al. (2017) y se estableció la identidad de las variantes de DWV presentes.

2.-Caracterización del viroma de las abejas sobrevivientes y susceptibles:

Se emplearon las muestras de abejas nodrizas del ensayo 1 colectadas en primavera y otoño, y mantenidas a -80°C . Las muestras se organizaron en pooles de 2 colonias (20 abejas por colonia) de ambos grupos (sobrevivientes y susceptibles), en primavera y otoño de forma independiente. De esta forma se formaron 12 pooles: 3 de colonias sobrevivientes en primavera, 3 de colonias sobrevivientes en otoño, 3 de colonias susceptibles en primavera y 3 de colonias susceptibles en otoño. En primer lugar las abejas de cada pool se homogeneizaron, se filtraron para eliminar los restos del cuerpo (patas, alas, cutícula) y se centrifugó. El sobrenadante se concentró por filtración y centrifugación, se extrajo el ARN. Posteriormente se enriquecieron las muestras y las bibliotecas se secuenciaron en un Illumina MiniSeq siguiendo los protocolos estándar de Illumina y la metodología puesta a punto en la Plataforma de Genómica de la Facultad de Ciencias. Al finalizar la secuenciación de todos los pooles se procedió a realizar el filtrado de las secuencias, el ensamblado de novo. El análisis filogenético de las muestras se realizó comparando los contigs obtenidos con las secuencias de proteínas de referencia de todos los virus previamente caracterizados usando BLASTx (Altschul et al., 1990) y se anotaron los genomas completos o parciales de las secuencias de virus que se encuentren en las muestras. Por último se realizaron análisis filogenéticos de los contigs resultantes y se evaluó si existen diferencias entre los perfiles virales de las colonias sobrevivientes y las susceptibles.

3.- Evaluación del comportamiento higiénico de las colonias: Comportamiento higiénico (VSH), supresión de la reproducción del ácaro (SMR) y grooming Estos ensayos se realizaron en 4 colonias de cada apiario, seleccionadas al azar entre las colonias que no se analizaron en los ensayos 1 y 2.

3.1- Grooming

El grooming se evaluó a nivel colonial para saber si existe una relación entre la sobrevivencia de las abejas y el daño en los ácaros. Al inicio del ensayo se colocó un papel cubierto con vaselina en el fondo de las colonias para retener los ácaros caídos (Invernizzi et al., 2022). A la semana, se recogió el papel y se colectaron 100 ácaros al azar de cada colonia. Los ácaros se observaron en un microscopio óptico a 40x para evidenciar el daño hecho por las abejas (patas o gnotosoma mutilados y /o escudo roto). Finalmente se calculó el porcentaje de ácaros dañados por colonia y se comparó entre grupos (Corrêa-Marques et al., 2000).

3.2- Comportamiento higiénico frente a V. destructor o VSH (Varroa Sensitive Higiene).

Se realizó una infestación artificial para evaluar el comportamiento higiénico frente a V. destructor según lo descrito por Dietman et al., (2013) en el manual COLOSS Beebook. En la mañana se inspeccionaron las colonias para encontrar cuadros con gran cantidad de larvas en etapa tardía (a punto de ser operculadas). Se marcaron aproximadamente 120 celdas con larvas en una hoja transparente de acetato y se devolvieron los cuadros a las colonias. En la tarde del mismo día, las colonias se abrieron nuevamente, se tomaron los mismos cuadros que en la mañana y en las celdas marcadas que habían sido operculadas se colocaron ácaros vivos recién recolectados pertenecientes a la misma colonia. Los cuadros se devolvieron a la colonia de la que se retiraron. En total, se infestaron 40 celdas. Las celdas infestadas se marcaron en el acetato. En paralelo, se repitió el procedimiento en 10 celdas de control (abiertas, pero no infectadas) para evaluar si las abejas removían el opérculo por la manipulación o por las varroas que se encontraban dentro. A la semana, se realizó el conteo de las celdas manipuladas que fueron higienizadas (eliminación de las larvas) y se comparó entre las colonias sobrevivientes y susceptibles.

3.3- Supresión de la reproducción de V. destructor

Se evaluó la supresión de la reproducción de V. destructor o SMR (Suppressed Mite Reproduction) en las colonias sobrevivientes y susceptibles siguiendo el protocolo descrito por Dietman et al., (2013) en el manual COLOSS Beebook. Con este fin, se desopercularon las celdas que las abejas no habían abierto luego del experimento de infestación artificial, y se

desopercularon 20 celdas infestadas naturalmente y que contuvieran una sola varroa fundadora. Para ello, se abrieron las celdas y se describió su contenido (etapa de la pupa, número de fundadoras, número de crías de varroa maduras e inmaduras), las celdas con más de una varroa fundadora no se tomaron en cuenta para este índice. Para comprender si el experimento de infección artificial había perturbado la reproducción de varroa, se comparó la proporción de reproducción de ácaros entre las celdas restantes y las celdas naturalmente infectadas. Para cuantificar el índice en las colonias, se compararon estas dos estimaciones entre las colonias sobrevivientes y susceptibles.

Los ensayos (VSH y SMR) se realizaron tres veces para cada colonia utilizando ácaros del mismo grupo, es decir, ácaros procedentes de colonias sobrevivientes se usaron para infectar colonias sobrevivientes y viceversa.

3.4- Genotipado de *V. destructor*

Se utilizaron varroas que se colectaron de los papeles con vaselina del punto 3.1. Se colectaron 264 muestras de *V. destructor* de 6 colonias susceptibles ($n = 135$) y 6 colonias sobrevivientes ($n = 139$). El ADN se extrajo utilizando los métodos estándar de Chelex (Walsh et al., 1991). Se utilizó un total de 8 marcadores para genotipificar las muestras siguiendo los métodos descritos en Beaurepaire et al. (2017). Posteriormente se realizó el análisis de los genotipos y se realizaron las comparaciones estadísticas.

Resultados, análisis y discusión

El primer objetivo específico fue evaluar y comparar la dinámica temporal de *V. destructor* y de las abejas melíferas en colonias sobrevivientes al ácaro y colonias susceptibles.

Para ello se evaluaron distintos parámetros que se detallan a continuación:

-Población de abejas adultas y de cría

En primavera (al comienzo del estudio) los dos grupos presentaron similar población de abejas adultas (dunn.test, $p = 0,9$) y de cría (dunn.test, $p = 0,88$). En otoño, las colonias susceptibles fueron las que presentaron menor cantidad de abejas adultas (dunn.test, $p = 0,03$) mientras que la población de cría fue similar entre ambos grupos (dunn.test, $p = 0,3$).

La población de abejas adultas de las colonias susceptibles disminuyó en el tiempo siendo significativamente menor en otoño que en primavera (dunn.test, $p < 0,01$, Figura 1), mientras que en las colonias sobrevivientes esta disminución fue marginalmente significativa (dunn.test, $p=0,07$). La cantidad de cría en el grupo de las susceptibles disminuyó significativamente (dunn.test, $p = 0,04$, Figura 2), mientras que en las sobrevivientes se mantuvo estable entre la primavera y el otoño (dunn.test, $p = 0,1$).

-Producción de miel

La producción de miel se evaluó al final del experimento (otoño), las colonias sobrevivientes produjeron significativamente más miel que las colonias susceptibles (Kruskal-Wallis.test, $p < 0,01$, Figura 3).

-Nivel de infestación con *Varroa destructor*

Los niveles de parasitación con el ácaro en primavera fueron similares entre los dos grupos (dunn.test, $p = 0,3$), mientras que en otoño, los niveles de infestación con este ácaro en las colonias sobrevivientes fueron significativamente menores al de las colonias susceptibles (dunn.test, $p=0,01$, Figura 4).

Los niveles de infestación en las colonias susceptibles el número de ácaros aumentó significativamente hacia el otoño (dunn.test, $p < 0,01$, Figura 4), mientras que en las colonias sobrevivientes se mantuvieron constantes en el tiempo (dunn.test, $p = 0,6$).

-Mortalidad colonial

En julio (invierno), luego de finalizado el ensayo, el 87,5% de las colmenas susceptibles murieron, en contraste con el 8 % de las colonias sobrevivientes. Los niveles de *V. destructor* en otoño (último muestreo del ensayo y previo a entrar a la invernada) fueron significativamente mayores en las colonias que colapsaron en junio en comparación a los niveles de las colonias que sobrevivieron (MW $< 0,01$) (Figura 5).

El segundo objetivo específico fue evaluar y comparar la dinámica temporal del virus DWV en colonias sobrevivientes a *V. destructor* y colonias susceptibles, así como evaluar las variantes circulantes. En primavera, las colonias sobrevivientes y susceptibles presentaban niveles similares de DWV (dunn.test, $p = 0,2$, Figura 6). Hacia el otoño, el nivel de infección con el DWV aumento significativamente en las colonias susceptibles (dunn.test, $p < 0,01$, Figura 6), mientras que en el caso de las colonias sobrevivientes no se encontraron diferencias entre primavera y otoño (dunn.test, $p = 0,29$). A su vez, en otoño, el nivel de infección con el DWV fue significativamente más alto en las colonias susceptibles que en las sobrevivientes (dunn.test, $p < 0,01$, Figura 6).

Por otro lado, se analizó la diversidad genética del DWV detectando únicamente la variante A de este virus. Estos resultados están en línea con estudios previos que demuestran la predominancia de la variante A en Uruguay. Como es de esperar, el comportamiento de los niveles del DWV-A fueron similares a los observados para el DWV con algunas

pequeñas diferencias que pueden deberse a la sensibilidad diferencial de los primers. En primavera, no se observaron diferencias en los niveles de este virus entre las colonias de los distintos grupos (dunn.test, $p = 0,4$). Hacia el otoño, se observó un aumento significativo en los niveles de infección con el DWV-A en las colonias susceptibles (dunn.test, $p < 0,01$, Figura 7), mientras que en las colonias sobrevivientes se mantuvo constante (dunn.test, $p = 0,41$). A su vez, en otoño, el nivel de infección con el DWV-A fue significativamente más alto en las colonias susceptibles que en las sobrevivientes (dunn.test, $p < 0,01$, Figura 7).

A este segundo objetivo se le añadió evaluar y comparar la dinámica temporal de los virus ABPV, BQCV, CBPV y SBV en las colonias sobrevivientes y susceptibles a *V. destructor*. En primavera, los niveles de infección del ABPV fueron mayores en las colonias sobrevivientes en comparación al de las susceptibles (dunn.test, $p = 0,03$, Figura 8). Estos niveles aumentaron en ambos grupos hacia el otoño (dunn.test, sobrevivientes: $p = 0,05$, susceptibles: $p < 0,01$, Figura 8), alcanzando mayores niveles de infección en las colonias susceptibles (dunn.test, $p = 0,03$, Figura 8).

Por otro lado, todas las colonias presentaron similares niveles de infección con el BQCV al inicio del ensayo (dunn.test, $p = 0,6$). Estos niveles aumentaron en el tiempo únicamente en las colonias susceptibles, siendo este aumento marginalmente significativo (dunn.test, $p = 0,08$, Figura 9), en otoño, las colonias susceptibles presentaron un nivel de infección mayor con este virus, siendo las diferencias marginalmente significativas (dunn.test, $p = 0,08$, Figura 9).

Los niveles de infección con el CBPV fueron muy bajos y su prevalencia en el ensayo también fue muy baja: solo cuatro colmenas resultaron positivas para este virus en otoño. Por tal motivo, no se presentan las comparaciones de los niveles de infección con el CBPV.

Por último, los niveles del SBV en primavera fueron similares entre los grupos (dunn.test, $p = 0,1$), en las colonias susceptibles aumentó significativamente en el tiempo (dunn.test, $p < 0,01$, Figura 10), mientras que en las colonias sobrevivientes se mantuvo constante (dunn.test, $p = 0,1$).

El tercer objetivo específico fue caracterizar el viroma de las colonias sobrevivientes y susceptibles a *V. destructor*. Cuando se analizó el número de reads obtenidos de cada grupo, se observó que existen diferencias significativas entre los grupos (Kruskal.Wallis.test, $p = 0,02$).

Posteriormente se evaluó entre qué grupos se daban esas diferencias significativas y se observó que en primavera, al principio de los ensayos, no se habían diferencias significativas entre los grupos (dunn.test, $p = 0,4$), sin embargo en las susceptibles hay una fuerte presencia del Varroa destructor virus, que se considera la variante B del DWV. En el segundo objetivo se estudió por qPCR si esa variante estaba circulando y se observó que no, sin embargo la metodología que utilizamos para concentrar las partículas virales y posterior la secuenciación masiva de los virus hacen que la detección sea más sensible. Además, como en la secuenciación masiva no se utilizan primers específicos, permite que aunque las secuencias sean distintas a las circulantes en el resto del mundo se puedan detectar. Los resultados obtenidos en este trabajo entonces, nos indican que quizás la variante B circulante en nuestro país podría tener variaciones en su secuencia y por eso no pudimos detectar este virus por qPCR, o que está en tan baja proporción que por qPCR no conseguimos detectarlo.

En otoño se observa un mayor número de reads en las colonias susceptibles (dunn.test, $p = 0,04$), y se observa una fuerte presencia del Apis Melifera filamentous virus tanto en las susceptibles, sin embargo este virus también fue detectado en las colonias sobrevivientes.

Utilizando esta técnica de secuenciación masiva se confirmó que están presentes los virus previamente mencionados (ABPV, BQCV, DWV y SBV) y la ausencia del CBPV (Figura 11) y se encontraron reads de virus que aún no estaban descritos en nuestro país. Algunos de los virus que se detectaron por primera vez son: tal es el caso del Apis Melifera Filamentous virus, Bee Macula virus, Israeli Acute Paralysis virus, Kashmir virus, y Lake Sinai virus (Figura 11). A su vez, se pudo obtener por primera vez en Uruguay los genomas completos de los 4 virus que revisten mayor importancia en la apicultura (ABPV, BQCV, DWV y SBV) y también del Apis Melifera Filamentous virus (Figura 13) y del Lake Sinai virus. El Apis Melifera Filamentous virus es un virus ADN doble hebra con un genoma 50 veces más grande que los virus que más se estudian y por esto está tomando gran relevancia en la investigación de los virus que infectan a las abejas (Hartmann et al., 2015, Prodelalová et al., 2019, Quintana et al., 2021, Nascimento y Canedo, 2022). Como parte del postdoc que estoy realizando en el IIBCE, voy a continuar investigando sobre estos genomas, utilizando las secuencias obtenidas para estudiar si las cepas circulantes en Uruguay son similares a las reportadas en otros países y también profundizaré en el resto de los virus encontrados con el fin de caracterizar las cepas circulantes en nuestro país.

El cuarto objetivo específico fue cuantificar la resistencia comportamental (comportamiento higiénico y grooming) de las colonias sobrevivientes a *V. destructor* y las colonias susceptibles. Se evaluó la proporción de abejas dañadas para saber si existe una relación entre la resistencia de las abejas y el daño en los ácaros, sin embargo, no se observaron

diferencias significativas entre los grupos (MW $p = 0.05$, Figura 14). A su vez, se evaluó el comportamiento higiénico frente a Varroa y en esta oportunidad sí se observó comportamiento higiénico significativamente mayor en las abejas de las colonias sobrevivientes frente a las susceptibles (MW $p < 0,0001$, Figura 14). Por último se observó que no habría una supresión de la multiplicación de la Varroa en las colonias sobrevivientes con respecto a las colonias susceptibles ya que ambos grupos poseen niveles similares de multiplicación del ácaro (MW $p > 0.05$, Figura 14).

De forma paralela, se realizó un estudio en colaboración con el INRAE de Aviñón en Francia y el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata para evaluar la diversificación genética de las varroas. En este estudio se encontró que en Uruguay y Argentina tanto en las colonias susceptibles como en las sobrevivientes las varroas que están circulando son genéticamente similares, mientras que en Francia, están diversificándose y son diferentes a las de América Latina (Figura 15, Beaurepaire et al., 2022). Ya se ha descrito que las poblaciones de *V. destructor* muestran niveles significativos de diversificación genética en distintas escalas geográficas (Beaurepaire et al., 2019; Dynes et al., 2017; Moro et al., 2021b). Aquí, nuestros resultados confirman estos hallazgos, y también revelan una diferenciación genética significativa en la población de ácaros dentro y entre las ubicaciones comparadas, a pesar de un bajo número general de alelos y heterocigosidad.

Conclusiones y recomendaciones

Nuestros resultados confirman lo reportado por Mendoza et al. (2020) en dónde encontraron que las poblaciones de colonias sobrevivientes a varroa ubicadas en el departamento de Treinta y Tres presentan un mayor comportamiento higiénico y una menor carga viral del DWV en comparación a las colonias susceptibles. Sin embargo en este trabajo no encontramos que el grooming fuera un factor que ayude a la resistencia de estas colonias sobrevivientes. Las colonias sobrevivientes logran mantener los niveles de *V. destructor* constantes, mientras que las colonias susceptibles no logran tal equilibrio. Además las poblaciones sobrevivientes como su nombre lo indica, presentan una menor mortalidad que las colonias susceptibles y producen más miel.

Las poblaciones de *V. destructor* que infestan *A. mellifera* a lo largo del Océano Atlántico difieren sustancialmente, aunque se conoce que estas poblaciones invasoras se originan de la misma fuente.

Los perfiles virales de las colonias sobrevivientes son diferentes de los de las colonias susceptibles e incluso pueden variar en el tiempo. Los resultados además, indican una clara asociación entre los niveles de infección virales que responden en cierta medida a las variaciones en los niveles de infestación con *V. destructor* y aunque los virus están presentes en prácticamente todas las colonias sobrevivientes, estos se mantienen en niveles más bajos que en las colonias susceptibles.

La sensibilidad de la secuenciación masiva de los virus presentes en las abejas nos permitió encontrar virus que aún no estaban descritos en nuestro país. Algunos de estos virus se han buscado activamente, tal es el caso del Israeli acute paralysis virus y del Kashmir bee virus, y otros que comenzarán a buscarse por ejemplo: el Bee Macula virus, el Lake sinai virus y el *Apis Mellifera filamentous virus*.

Estos hallazgos requieren estudios de seguimiento, se debe ahondar en el estudio de los viomas de las abejas melíferas y cuál es el papel que tiene *V. destructor* y las abejas en su transmisión.

Referencias bibliográficas

- Alger, S.A., Burnham, P.A., Boncristiani, H.F., y Brody, A.K. (2019). RNA virus spillover from managed honeybees (*Apis mellifera*) to wild bumblebees (*Bombus* spp.). *PLoS one*, 14(6), e0217822.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Anderson, D.L., y Trueman, J.W.H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental y applied acarology*, 24(3), 165-189.
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P., y Antúnez, K. (2015). Prevalence and distribution of honey bee pests and pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 532-540.
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., Vanengelsdorp, D., y Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, 48(3), 364-370.
- Anuario OPYPA 2021. Sector apícola: situación y perspectivas. Alejandra Carrau, Sebastián Bianchi. <https://tinyurl.com/OPYPA2021>
- Beaurepaire, A., Sann, C., Arredondo, D., Mondet, F., y Le Conte, Y. (2019). Behavioral Genetics of the Interactions between *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Insects*, 10(9), 299.
- Beaurepaire, A.L., Krieger, K.J., y Moritz, R.F. (2017). Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 49-54.
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., ... y Dalmon, A. (2020). Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 11(4), 239.
- Beaurepaire, A., Arredondo, D., Genchi-García, M.L., Castelli, L., Reynaldi, F.J., Antunez, K., ... y Dalmon, A. (2022). Genetic diversification of an invasive honey bee ectoparasite across sympatric and allopatric host populations. *Infection, genetics and evolution*, 103, 105340.
- Breeze, T.D., Gallai, N., Garibaldi, L.A., y Li, X.S. (2016). Economic measures of pollination services: shortcomings and future directions. *Trends in Ecology y Evolution*, 31(12), 927-939.
- Brutscher, L.M., McMenamin, A.J., y Flenniken, M.L. (2016). The buzz about honey bee viruses. *PLoS Pathogens*, 12(8), e1005757.
- Büchler, R., Costa, C., Hatjina, F., Andonov, S., Meixner, M.D., Conte, Y.L., ... y Wilde, J. (2014). The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 53(2), 205-214.
- Castelli, L., Genchi García, M.L., Dalmon, A., Arredondo, D., Antúnez, K., Invernizzi, C., ... y Beaurepaire, A. (2021). Intra-colonial viral infections in Western honey bees (*Apis mellifera*). *Microorganisms*, 9(5), 1087.
- Caesar, L., Cibulski, S.P., Canal, C.W., Blochtein, B., Sattler, A., y Haag, K.L. (2019). The virome of an endangered stingless bee suffering from annual mortality in southern Brazil. *Journal of General Virology*, 100(7), 1153-1164.
- Chen, Y. P., y Siede, R. (2007). Honey bee viruses. *Advances in virus research*, 70, 33-80.
- Colla, S.R., Otterstatter, M.C., Gegear, R.J., y Thomson, J.D. (2006). Plight of the bumble bee: pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological conservation*, 129(4), 461-467.
- Corrêa-Marques, M.H., Issa, M.R.C., y Jong, D.D. (2000). Classification and quantification of damaged *Varroa jacobsoni* found in the debris of honey bee colonies as criteria for selection?. *American Bee Journal*, 140(10), 820-824.
- Dalmon, A., Peruzzi, M., Le Conte, Y., Alaux, C., y Pioz, M. (2019). Temperature-driven changes in viral loads in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate pathology*, 160, 87-94.
- Deboutte, W., Beller, L., Yinda, C.K., Maes, P., de Graaf, D.C., y Matthijssens, J. (2020). Honey-bee-associated prokaryotic viral communities reveal wide viral diversity and a profound metabolic coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(19), 10511-10519.
- Dedej, S., y Delaplane, K.S. (2003). Honey bee (Hymenoptera: Apidae) pollination of rabbiteye blueberry *Vaccinium ashei* var. 'Climax' is pollinator density-dependent. *Journal of Economic Entomology*, 96(4), 1215-1220.
- Delaplane, K.S., Van Der Steen, J., y Guzman-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-12.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D.L., Locke, B., Delaplane, K.S., ... y Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of apicultural research*, 52(1), 1-54.
- Domingo, E., Sheldon, J., y Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,

- Dynes, T.L., De Roode, J.C., Lyons, J.I., Berry, J.A., Delaplane, K.S., y Brosi, B.J. (2017). Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 48, 93-101.
- Gisder, S., y Genersch, E. (2017). Viruses of commercialized insect pollinators. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 51-59.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., y Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255-1257.
- Grozinger, C.M., y Flenniken, M.L. (2019). Bee viruses: Ecology, pathogenicity, and impacts. *Annual review of entomology*, 64(1).
- Hartmann, U., Forsgren, E., Charrière, J.D., Neumann, P., y Gauthier, L. (2015). Dynamics of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) infections in honey bees and relationships with other parasites. *Viruses*, 7(5), 2654-2667
- Invernizzi, C., Zefferino, I., Santos, E., Sánchez, L., y Mendoza, Y. (2022). Multilevel assessment of grooming behavior against *Varroa destructor* in Italian and Africanized honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 321-327.
- Kevill, J.L., Highfield, A., Mordecai, G.J., Martin, S.J., y Schroeder, D.C. (2017). ABC assay: Method development and application to quantify the role of three DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees. *Viruses*, 9(11), 314.
- Kevill, J.L., de Souza, F.S., Sharples, C., Oliver, R., Schroeder, D.C., y Martin, S.J. (2019). DWV-A lethal to honey bees (*Apis mellifera*): A colony level survey of DWV variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 states across the US. *Viruses*, 11(5), 426.
- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., y Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303-313.
- Kojima, Y., Toki, T., Morimoto, T., Yoshiyama, M., Kimura, K., y Kadowaki, T. (2011). Infestation of Japanese native honey bees by tracheal mite and virus from non-native European honey bees in Japan. *Microbial ecology*, 62(4), 895-906.
- Locke, B., Conte, Y.L., Crauser, D., y Fries, I. (2012a). Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. *Ecology and evolution*, 2(6), 1144-1150.
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., y de Miranda, J.R. (2012b). Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa destructor*-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Applied and environmental Microbiology*, 78(1), 227-235.
- Locke, B., Forsgren, E., y de Miranda, J.R. (2014). Increased tolerance and resistance to virus infections: a possible factor in the survival of *Varroa destructor*-resistant honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 9(6), e99998
- Locke, B. (2016). Natural *Varroa* mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie*, 47(3), 467-482.
- Marzoli, F., Forzan, M., Bortolotti, L., Pacini, M.I., Rodríguez-Flores, M.S., Felicioli, A., y Mazzei, M. (2021). Next generation sequencing study on RNA viruses of *Vespa velutina* and *Apis mellifera* sharing the same foraging area. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 2261-2273.
- Manley, R., Temperton, B., Doyle, T., Gates, D., Hedges, S., Boots, M., y Wilfert, L. (2019). Knock-on community impacts of a novel vector: spillover of emerging DWV-B from *Varroa*-infested honeybees to wild bumblebees. *Ecology letters*, 22(8), 1306-1315.
- McMenamin, A.J., y Flenniken, M.L. (2018). Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Current opinion in insect science*, 26, 120-129.
- Mendoza, Y., Tomasco, I.H., Antúnez, K., Castelli, L., Branchiccela, B., Santos, E., e Invernizzi, C. (2020). Unraveling honey bee-*Varroa destructor* interaction: Multiple factors involved in differential resistance between two Uruguayan populations. *Veterinary sciences*, 7(3), 116.
- MGAP-DIGEGRA. <https://tinyurl.com/mgap2021>
- Mordecai, G.J., Wilfert, L., Martin, S.J., Jones, I.M., y Schroeder, D.C. (2016). Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *The ISME journal*, 10(5), 1264-1273
- Moro, A., Blacquièrre, T., Panziera, D., Dietemann, V., y Neumann, P. (2021a). Host-parasite co-evolution in real-time: Changes in honey bee resistance mechanisms and mite reproductive strategies. *Insects*, 12(2), 120.
- Moro, A., Blacquièrre, T., Dahle, B., Dietemann, V., Le Conte, Y., Locke, B., ... y Beaurepaire, A. (2021). Adaptive population structure shifts in invasive parasitic mites, *Varroa destructor*. *Ecology and evolution*, 11(11), 5937-5949.
- Nascimento, G., y Canedo, A.D. (2022). *Apis mellifera* Filamentous Virus no RS. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 2(14).
- Neumann, P., y Carreck, N.L. (2010). Honeybee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1-6.
- Prodelalová, J., Moutelíková, R., y Titera, D. (2019). Multiple virus infections in western honeybee (*Apis mellifera* L.) ejaculate used for instrumental insemination. *Viruses*, 11(4), 306.

- Quer, J., Colomer-Castell, S., Campos, C., Andrés, C., Piñana, M., Cortese, M.F., ... y Taberner, D. (2022). Next-generation sequencing for confronting virus pandemics. *Viruses*, 14(3), 600.
- Quintana, S., Brasesco, C., Porrini, L.P., Di Gerónimo, V., Eguaras, M.J., y Maggi, M. (2021). First molecular detection of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) in honey bees (*Apis mellifera*) in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 60(1), 111-114.
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., ... y vanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792-1801.
- Requier, F., Antúnez, K., Morales, C.L., Aldea Sánchez, P., Castilhos, D., Garrido, P.M., Giacobino, A., Reynaldi, F.J., Rosso Londoño, J.M., Santos, E., y Garibaldi, L.A. (2018). Trends in beekeeping and honeybee colony losses in Latin America. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 657-662.
- Rinderer, T.E., Danka, R.G., Johnson, S., Bourgeois, A.L., Frake, A.M., Villa, J.D., ... y Harris, J.W. (2014). Functionality of *Varroa*-resistant honey bees (Hymenoptera: Apidae) when used for western US honey production and almond pollination. *Journal of economic entomology*, 107(2), 523-530.
- Roossinck, M.J. (2015). Move over, bacteria! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. *Journal of Virology*, 89(13), 6532-6535.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., y Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S96-S119.
- Salvarrey, S., Antúnez, K., Arredondo, D., Plischuk, S., Revainera, P., Maggi, M., y Invernizzi, C. (2021). Parasites and RNA viruses in wild and laboratory reared bumble bees *Bombus pauloensis* (Hymenoptera: Apidae) from Uruguay. *PloS one*, 16(4), e0249842.
- Santos, E., Bonilla, O. y Branchicella, B. (2019). "Polinizadores en época de producción de frutas y semillas." *Revista INIA Uruguay No 58*: 24-27.
- Santos, E. y Varela, G. (2016). Polinizadores como servicio ecosistémico, en *Guía de insectos del Uruguay*. Montevideo, Uruguay, Ediciones de la Fuga: 258-263.
- Shi, M., Lin, X.D., Tian, J.H., Chen, L.J., Chen, X., Li, C.X., ... y Zhang, Y.Z. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 540(7634), 539-543.
- Shi, C., Beller, L., Deboutte, W., Yinda, K.C., Delang, L., Vega-Rúa, A., ... y Matthijnssens, J. (2019). Stable distinct core eukaryotic viromes in different mosquito species from Guadeloupe, using single mosquito viral metagenomics. *Microbiome*, 7(1), 1-20.
- Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Human, H., Chantawannakul, P., y Chauzat, M.P. (2018). Drivers of colony losses. *Current opinion in insect science*, 26, 142-148.
- Tehel, A., Vu, Q., Bigot, D., Gogol-Döring, A., Koch, P., Jenkins, C., ... y Paxton, R. (2019). The two prevalent genotypes of an emerging infectious disease, deformed wing virus, cause equally low pupal mortality and equally high wing deformities in host honey bees. *Viruses*, 11(2), 114
- Thaduri, S., Locke, B., Granberg, F., y de Miranda, J.R. (2018). Temporal changes in the viromes of Swedish *Varroa*-resistant and *Varroa*-susceptible honeybee populations. *PLoS One*, 13(12), e0206938.
- Traynor, K.S., Mondet, F., de Miranda, J.R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M.A., ... y McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends in parasitology*, 36(7), 592-606.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., y Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.
- Yang, X., y Cox-Foster, D.L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7470-7475.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)