



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
PATOLOGÍA APÍCOLA

**“IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMES Y SU RELACIÓN  
CON *VARROA DESTRUCTOR* EN *APIS MELLIFERA* L. EN DOS CLIMAS DE  
MÉXICO”**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

RICARDO ANGUIANO BAEZ

**TUTOR PRINCIPAL:**

LAURA GUADALUPE ESPINOSA MONTAÑO FMVZ-UNAM

**COMITÉ TUTORAL:**

ERNESTO GUZMÁN NOVOA – UNIVERSITY OF GUELPH

ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ FMVZ-UNAM

**MÉXICO, D.F. ENERO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

A mis padres Sabino y Piedad, por que ustedes son siempre mi ejemplo e inspiración.

A mi esposa, gracias por acompañarme en este camino, que no fue nada fácil, pero nunca me dejaste caer. TE AMO LILY.

A las Dras. Laura y Adriana, por que sin ustedes no hubiera empezado ni terminado este viaje, GRACIAS.

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor. Dra. Laurita, gracias por su apoyo, amistad y ejemplo.

Al Dr. Ernesto Guzmán, le agradezco mucho su apoyo y paciencia, así como el brindarme su amistad y la gran oportunidad de trabajar con usted.

Al Dr. Antonio Verdugo, por su compartir su conocimiento y experiencia, las cuales no sólo ayudaron a enriquecer este trabajo, además me ayudaron a tener otro punto de vista.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento, por que siempre estuvo al tanto y brindando toda la ayuda posible, y por enseñarme lo maravillosa que puede ser la virología.

Al Señor Marco Muñoz y al Ing. Juan Amador, por todo su apoyo, compartir sus experiencias y además brindarme su amistad.

A todos los apicultores que me permitieron trabajar con sus colmenas: Sr. Valentín, Sra. Aurelinda, Sr. Nicolas, en verdad muchas gracias.

A la Dra. Adriana Correa, por siempre confiar en mi e impulsar mi desarrollo.

Al MVZ Ángel López, por siempre estar dispuesto a brindar su ayuda y amistad, y por todas esas risas que siempre ayudan.

A mis compañeros del departamento de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos: Itzel, Yava, Mary, Kike, Pris, Aldo y Héctor. Gracias por todo.

Al personal de la Universidad de Guelph, por todo su apoyo y amabilidad.

A Hamid, por su paciencia y enseñanzas.

A Hanan, Hailey y Jaquelin muchas gracias por todo el apoyo, fue un gusto trabajar con ustedes.

A ti mi vida, sin tu amor, apoyo y consejo nada de esto se hubiera logrado. TE AMO LILY.

A Nuria, por la suerte de haber coincidido aun que sea en una pequeña parte de esta aventura y por la suerte aun mayor de contar con tu amistad desde hace tantos años.

A Marcos, gracias Compadre por su amistad , apoyo y por hacernos parte de su familia.

A Jos, gracias por tu amistad.

A Nachiburus por que aun desde lejos, nunca dejaste de estar al pendiente y brindarme ayuda cuando la necesite.

A los Pumitas, por que la vida siempre es mejor con amigos.

## Índice

<b>I. índice de figuras</b>	<b>V</b>
<b>II. índice de cuadros</b>	<b>VI</b>
<b>III. Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Varroa destructor</i>	1
1.1.1. Ciclo biológico	3
1.1.2. Patología	4
1.2. Virus de las abejas melíferas	5
1.2.1. Virus de las Alas Deformes (VAD)	6
1.2.1.1. Patogenia del VAD	7
2. Justificación	11
3. Objetivos	12
3.1. Objetivo general	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. Material y Métodos	13
4.1. Área de estudio	13
4.1.1. Clima tropical	13
4.1.2. Clima templado	13
4.2. Grupos de trabajo	14
4.3. Obtención de muestras	14
4.3.1. Infestación de <i>Varroa destructor</i>	15
4.3.2. Presencia del Virus de las Alas Deformes (VAD)	15
4.4. Pruebas diagnósticas	16
4.4.1. Infestación de <i>V. destructor</i> en abejas adultas	16
4.4.2. Infestación de <i>V. destructor</i> en cría	17
4.4.3. Identificación morfométrica	17
4.4.4. Identificación del VAD	18
4.4.5. Cuantificación relativa del VAD	20
4.4.6. Análisis estadístico	21
5. Resultados	22
5.1. Efecto de clima y de la etapa de desarrolla de las abejas en la prevalencia del VAD	22
5.2. Asociación entre <i>V. destructor</i> y el VAD en dos climas	23
5.3. Efecto del morfotipo de abeja en los niveles relativos de infección del VAD	28
6. Discusión	30
6.1. Asociación del clima y <i>Varroa destructor</i> en la prevalencia del VAD en cría y abejas adultas	30
6.2. Asociación del clima y <i>Varroa destructor</i> en los niveles del VAD en cría y abejas adultas	31
6.3. Interacción del clima y <i>Varroa destructor</i> en la prevalencia y niveles del VAD de las abejas	33
7. Conclusiones	35
8. Referencias	38

## I.

Índice de figuras	Pag.
<b>Figura 1.</b> Abeja obrera parasitada por hembras de <i>Varroa destructor</i>	2
<b>Figura 2.</b> Abeja obrera con alas deformes	10
<b>Figura 3.</b> Captura de pantalla de los productos de RT-PCR obtenidos	22
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de colonias positivas al Virus de las Alas Deformes (VAD) en abejas adultas, cría infestada y no infestada con <i>Varroa destructor</i> en una región templada y tropical	23
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de infestación con <i>Varroa destructor</i> ( $\pm$ EE) en abejas adultas, de colonias que resultaron positivas y negativas al virus de las alas deformes (VAD), en una región climática templada y tropical	24
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de infestación con <i>Varroa destructor</i> ( $\pm$ EE) en la cría de las abejas, a partir de colonias que resultaron positivas y negativas al virus de las alas deformes (VAD) en una región climática templada y tropical	24
<b>Figura 7.</b> Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del VAD en abejas adultas, cría infestada y no infestada con <i>V. destructor</i> , en una región climática templada y tropical	25
<b>Figura 8.</b> Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del VAD en crías de las abejas clasificadas por presentar niveles de infestación, con <i>V. destructor</i> , bajos, altos y muy altos, y que se localizaron en una región climática templada y tropical	26
<b>Figura 9.</b> Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del VAD en abejas adultas, clasificadas por presentar niveles de infestación, con <i>V. destructor</i> , bajos, altos y muy altos, y que se localizaron en una región climática templada y tropical	28
<b>Figura 10.</b> Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del VAD en crías y abejas adultas clasificadas morfométricamente como europeas o africanizadas.	29

## II.

Índice de cuadros	
	Pag.
<b>Cuadro 1.</b> Análisis de varianza para los niveles del VAD en la cría de las abejas de colonias clasificadas con bajo, alto y muy alto nivel de infestación de <i>Varroa destructor</i> , localizadas en climas tropical y templado	26
<b>Cuadro 2.</b> Análisis de varianza para los niveles del VAD en abejas adultas de colonias clasificadas con bajo, alto y muy alto nivel de infestación de <i>Varroa destructor</i> , localizadas en climas tropical y templado	27
<b>Cuadro 3.</b> Análisis de varianza para los niveles del VAD en crías y abejas adultas de colonias clasificadas morfométricamente como europeas o africanizadas	29

### III. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue comparar la prevalencia y niveles del virus de las alas deformes y los niveles de infestación de *Varroa destructor* en colonias de abejas establecidas en climas tropical y templado de México. Para esto se tomaron de cada colonia seleccionada muestras de abejas adultas en alcohol al 70% y cría operculada, las que se conservaron en refrigeración para determinar el nivel de infestación de varroa y el morfotipo de las abejas, así como muestras de abejas adultas, cría infestada, cría no infestada y ácaros, que se conservaron con un estabilizador de ARN y en congelación hasta su procesamiento. Se empleó la transcripción en reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para amplificar un fragmento de la secuencia que codifica para la helicasa del VAD y un gen de expresión constitutiva de la abeja (RPs5). Para la cuantificación relativa del virus con base en la intensidad de la banda observada del VAD en relación con el producto correspondiente del RPs5 se empleó el programa Scion Imagen®. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa estadístico R (R Development Core Team) realizando pruebas de Chi cuadrada, ANOVA y correlación. Se encontró una interacción significativa entre el clima y el tipo de muestra, encontrando los niveles más altos del VAD en la cría parasitada con varroa de las colonias ubicadas en clima templado, siendo este clima el único donde se pudieron apreciar en algunas colonias abejas con alas deformes al momento del muestreo; también se pudo observar que las colonias positivas al VAD fueron aquellas en presentar los niveles más altos de *V. destructor* en el clima templado, no así en el tropical. Por otra parte, se observó que las colonias con morfotipo africanizado mostraron menor prevalencia del VAD que las colonias con morfotipo europeo. Estos resultados sugieren fuertemente que existe una interacción entre el clima y el grado de infestación de *V. destructor*, y que esta interacción puede jugar un papel fundamental en la prevalencia y cantidades relativas del VAD, así como en la presentación de infecciones evidentes en las colonias.

Palabras clave: *Varroa destructor*, *Apis mellifera*, virus de las alas deformes, clima, morfotipo.



## INTRODUCCIÓN

La varroosis o varroasis es una parasitosis externa causada por ácaros del género *Varroa*; actualmente es uno de los principales problemas que afectan a la actividad apícola a nivel mundial. Esta parasitosis, que se creía exclusiva de las abejas asiáticas *Apis cerana*, fue identificada por primera ocasión afectando colonias de *Apis mellifera* en la URSS a principios de los años 50; a finales de esta década se presentaron los primeros casos en Japón y China y fue para finales de los sesenta que se reportó la presencia del ácaro en Europa. En las décadas de los setentas y ochentas ya se contaba con casos en el sur y norte del continente Americano. Actualmente, el género *Varroa* cuenta con una distribución prácticamente mundial, siendo Australia el único país aparentemente libre (Rosenkranz *et al.* 2010; Guzmán-Novoa *et al.* 2012).

En un principio se consideraba a *Varroa jacobsoni* Oudemans como el agente causal de la varroosis, tanto en las abejas *A. cerana* como en las *A. mellifera* (Rosenkranz *et al.* 2010). Posteriormente en el año 2000, Anderson y Trueman encontraron diferencias morfológicas y genéticas suficientes para considerar al ácaro encontrado parasitando las colonias de abejas melíferas como una especie diferente, y lo denominaron *Varroa destructor* (Anderson y Trueman 2000).

### ***Varroa destructor***

El ácaro *Varroa destructor* (en lo sucesivo, varroa) pertenece al filo Arthropoda, clase Arachnida, subclase Acari, orden Parasitiformes, suborden Mesostigmata. Los ácaros varroa presentan un marcado dimorfismo sexual, con adaptaciones anatómicas específicas para su supervivencia. Tanto en la hembra como en el macho, su cuerpo se divide en dos regiones bien definidas: el idiosoma y el gnatosoma; el idiosoma es la región más grande del cuerpo, donde se encuentran contenidos los órganos reproductivos, el canal alimentario y el sistema nervioso; asimismo, está conformado por un gran escudo dorsal y una serie de escudos ventrales; en el caso de las hembras

adultas todos los escudos son rígidos (altamente esclerotizados<sup>1</sup>) y presentan una coloración rojiza-marrón, estos escudos están unidos por membranas delgadas y flexibles que permiten la dilatación del cuerpo, al alimentarse o iniciar la oviposición. A los lados de los escudos ventrales se insertan cuatro pares de patas cortas y fuertes, de las cuales las dos primeras cumplen funciones táctiles-olfativas y el resto funciones motrices. En el extremo distal de cada pata se encuentra una estructura llamada apotelo, la cual es similar a una ventosa que ayuda al ácaro a sujetarse del cuerpo de las abejas. La forma del idiosoma de la hembra es ovalada y aplanada en sentido dorso-ventral, de aproximadamente 1.1mm de largo por 1.7mm de ancho; estas características anatómicas permiten al ácaro adherirse al cuerpo de la abeja y esconderse entre los segmentos abdominales facilitando la obtención de alimento y dificultando su remoción por parte de las abejas (**Figura 1**).



**Figura 1.** Abeja obrera parasitada por hembras de *Varroa destructor*

En el caso de los machos el idiosoma es más pequeño que el de la hembra (0.8mm de largo por 0.7mm de ancho), con forma triangular o de pera y levemente esclerotizado en las patas y el escudo dorsal, donde presenta una coloración amarillenta. Las patas son alargadas y se observan más largas en relación con el tamaño de su cuerpo.

---

<sup>1</sup> **Esclerotizar:** endurecer un órgano o tejido por la formación de escleroproteínas

El gnatosoma se ubica en posición antero ventral y está compuesto por un par de pedipalpos y un par de quelíceros, los cuales están conformados por tres segmentos o dígitos; el tercer dígito o dígito distal en las hembras es móvil y presenta estructuras similares a dientes con los cuales perfora la cutícula de las larvas y/o pupas, así como la membrana intersegmental de las abejas adultas para alimentarse. En el caso del macho adulto sexualmente maduro, el dígito móvil se modifica para formar un ducto espermático con el cual transfiere el esperma al tracto genital de la hembra (De Jong 1997; Rosenkranz *et al.* 2010; Guzmán-Novoa *et al.* 2012)

### **Ciclo biológico**

El ciclo biológico de este ácaro se divide en dos fases: la fase reproductiva y la fase forética. La fase reproductiva se lleva a cabo sobre la pupa de la abeja melífera dentro de la celda operculada, para ello el ácaro que se encuentra parasitando a las abejas adultas busca infestar abejas más jóvenes que están cumpliendo la función de nodrizas, y por lo tanto mantienen un contacto más estrecho con la cría; el ácaro ingresa a las celdas de cría horas antes de ser operculadas (15-30h en cría de obrera y de 40-60h en caso de cría de zángano). Al ingresar a la celda se desplaza hasta el fondo de la misma quedando inmerso en el alimento de la larva para evitar ser detectado por las abejas nodrizas, 5 h después que la celda fue operculada la prepupa ya finalizó sus reservas de alimento y el ácaro inicia su alimentación (perforando la cutícula de la prepupa para obtener hemolinfa) lo cual estimula su ovoposición, la cual tendrá lugar entre 60-70h después, iniciando con un huevo no fecundado para dar origen a un macho y los siguientes huevos serán fecundados por lo cual darán origen a hembras, y se depositan en intervalos de 30h. En total se genera un macho y de tres a cuatro hembras en cría de abeja obrera o cinco a seis hembras en caso de cría de zángano. Tanto el macho como las hembras de varroa pasan por diferentes fases de desarrollo: huevo, protoninfa, deutoninfa y adulto (el desarrollo completo dura de 5.5 a 6.3 días para el ácaro macho y 6.5 a 6.9 días para las hembras). Durante todo su desarrollo, las crías del ácaro se alimentan de la hemolinfa de la pupa a través de la perforación en la cutícula donde se alimentó la hembra fundadora, y que

mantiene abierta durante el desarrollo de sus crías. Pocas horas después de alcanzar la madurez, los ácaros inician su apareamiento, el macho fecundará a sus hermanas, que al finalizar el desarrollo de la obrera o zángano, emergerán de la celda junto con las abejas. Los ácaros que se liberan de esta manera son la hembra fundadora y las hijas adultas fecundadas (dos o cuatro hembras fecundadas en obrera y zángano, respectivamente), el macho y las hembras inmaduras permanecen y mueren en la celda después de que la abeja emerge. La otra fase del ciclo es denominada “fase forética”, en la cual las hembras fecundadas del ácaro utilizan a las abejas adultas como medio de transporte y diseminación, el ácaro se vale de su forma aplanada ventro dorsal para ocultarse entre los escleritos abdominales de la abeja y se alimenta de la hemolinfa de la abeja adulta perforando la membrana intersegmentaria de las placas abdominales (De Jong 1997; Rosenkranz *et al.* 2010; Guzmán-Novoa *et al.* 2012).

### **Patología**

La patología ocasionada por el ácaro *Varroa destructor* en abejas se asocia principalmente a dos factores: los daños directos ocasionados por los hábitos alimenticios del ácaro y su asociación como vector de los principales virus que afectan a las abejas melíferas. Entre los daños directos provocados por el ácaro se ha encontrado que las abejas obreras y zánganos emergidos de celdas infestadas muestran una disminución de entre 7% hasta 50% del peso, dependiendo del grado de infestación (De Jong *et al.* 1982; Duay *et al.* 2002; Kotwal y Abrol 2009). Los zánganos parasitados durante su desarrollo han demostrado una disminución de hasta 70% en su capacidad de vuelo y de entre 24% a 45% en su producción espermática, dificultando que cumplan con su principal función que es la reproducción (Duay *et al.* 2002). En el caso de las obreras adultas parasitadas también se ha observado que tardan dos veces más tiempo en sus vuelos de pecoreo, presentan una tasa de retorno 20% menor y mayor desorientación al retorno a su colmena (Kralj y Fuchs 2006); además, se ha observado que abejas emergidas de celdas infestadas muestran una concentración hasta 50% menor de proteínas en la hemolinfa, principalmente vitelogenina. Ésta es una glicoproteína abundante en la

hemolinfa, considerada una proteína de almacenamiento que está relacionada con la longevidad de las abejas y la producción de alimento para la cría (Amdam *et al.* 2004).

También se ha determinado que varroa afecta la capacidad de respuesta de las abejas ante diversos patógenos. Los mecanismos de defensa de las abejas son básicamente dos: la respuesta mediada por células de la hemolinfa o hemocitos (fagocitosis, encapsulación y coagulación) y la secreción de péptidos antimicrobianos, los cuales atacan componentes de la pared celular de bacterias y hongos. Algunos estudios han demostrado que las abejas que se infestan durante su desarrollo presentan una mayor proporción de hemocitos pro apoptóticas (Amdam *et al.* 2004), lo cual concuerda con la observación *in vitro* de los efectos de la saliva del ácaro, donde se observa que puede ocasionar la lisis de los hemocitos y disminución de su capacidad para extender pseudópodos y formar agregados celulares, lo que dificulta el proceso de coagulación (Richards *et al.* 2011). Por otra parte se ha observado también que la infestación con el ácaro provoca alteraciones en la expresión de al menos 32 genes de las abejas, los cuales están relacionados principalmente con desarrollo embrionario, metabolismo celular y respuesta inmune (Navajas *et al.* 2008), lo cual se ve reflejado en la disminución de ARNm que codifica para la producción de péptidos antimicrobianos como himenoptaecina (Yang y Cox-Foster 2005), abaecina y defensina (Gregory *et al.* 2005), moléculas de señalización como *dorsal-1A* implicada en respuesta celular al estrés o enzimas como la glucosa deshidrogenasa, fenol oxidasa y glucosa oxidasa, las cuales participan en la respuesta primaria ante patógenos y en la eliminación de los mismos por encapsulación (Nazzi *et al.* 2012).

El otro factor importante en la patología causada por *V. destructor* es su función como vector de algunos patógenos, primordialmente de los principales virus que afectan a la abeja melífera (Rosenkranz *et al.* 2010).

### **Virus de las abejas melíferas**

A la fecha se tiene registro de 19 virus que afectan a *Apis mellifera* L., de los cuales todos excepto los virus iridiscente y filamentoso comparten características propias del orden de los Picornavirales, ya que están

constituidos por un genoma ARN en sentido positivo, el cual se encuentra contenido dentro de una cápside icosaédrica de proteínas sin envoltura, presentan ligada al extremo 5´ de su genoma la proteína VPg y en el extremo 3´ una cola poliadenilada; el genoma viral se traduce en una poliproteína (Iflaviridae) o en dos poliproteínas (Discistroviridae), estas poliproteínas se procesan proteolíticamente por proteasas virales y celulares. Con base en la organización de su genoma los virus de las abejas son clasificados en dos familias dentro del orden de los Picornavirales; la familia *Dicistroviridae*, en la cual el genoma viral presenta dos marcos abiertos de lectura donde el primero (5´proximal) codifica para las proteínas no estructurales y el segundo (3´proximal) codifica para las no estructurales; dentro de esta familia se encuentra el Virus de las celdas reales negras, Virus de la parálisis aguda, Virus de la parálisis crónica, Virus de Cachemira y el Virus de la parálisis aguda israelí. En la familia *Iflaviridae* el genoma presenta un solo marco abierto de lectura donde en el extremo 5´se encuentran codificadas las proteínas estructurales y en el 3´ las no estructurales; dentro de esta familia se encuentran el Virus de la cría ensacada y el Virus de las alas deformes (Chen y Siede 2007; Aubert *et al.* 2008).

### **Virus de las alas deformes (VAD)**

El virus de las alas deformes, género *Iflavirus*, familia Iflaviridae, orden de los Picornavirales, cuenta con un genoma de 10,140 pares de bases, el cual presenta una organización típica de los *Iflavirus* con un solo marco abierto de lectura que se encuentra flanqueado por dos regiones no traducidas, una región amplia en el extremo 5´ y una región más corta y altamente conservada en el extremo 3´, la cual termina en una cola de poli-A. El marco abierto de lectura codifica para una poliproteína de 328kDa donde en el extremo N-terminal se encuentran las proteínas estructurales que conforman la cápside (VP3, VP4, VP1 y VP2) y en el extremo C-terminal las no estructurales (helicasa, 3C-proteasa, VPg y la RNA polimerasa dependiente de RNA) (de Miranda y Genersch 2010; Bacandritsos *et al.* 2012). Este virus fue identificado por primera vez por Ball en 1983 en una muestra de abejas melíferas adultas provenientes de Japón e infestadas con *Varroa destructor*, por lo cual se le

denominó en un principio como variante japonesa del virus Egipcio de las abejas ya que presentaba una relación serológica lejana con ese virus. Posteriormente se determinó que existía suficiente diferencia para clasificarlo de forma independiente y se decidió nombrarlo con base en el signo característico de la enfermedad: la presencia de malformaciones o falta de desarrollo de las alas en abejas adultas recién emergidas. Este signo junto con algunos otros como la reducción en el tamaño del abdomen y la decoloración de la cutícula eran anteriormente considerados como signos de la patología causada por *Varroa destructor* (Chen y Siede 2007; Aubert *et al.* 2008), por lo cual se comenzó a asociar la presencia del ácaro con la infección viral. Esta idea se ha ido reforzando con el tiempo, al observar que la dispersión del virus siguió el mismo patrón que la dispersión del ácaro, presentando actualmente una distribución prácticamente mundial. Se ha detectado la presencia de este virus en todos los continentes, excepto Oceanía (Chen y Siede 2007; de Miranda y Genersch 2010) y es el virus de las abejas con mayor prevalencia en los últimos años. La prevalencia del virus se ha reportado entre el 55 y 100% en diferentes estudios realizados en países como Francia, Austria, Dinamarca, Estados Unidos y Uruguay (Tentcheva *et al.* 2004; Antúnez *et al.* 2006; Berényi *et al.* 2006; Chen *et al.* 2006; Nielsen *et al.* 2008), e incluso se ha podido determinar su presencia en diferentes especies de abejas como *Apis cerana* y *Apis florea*, en otros himenópteros como abejorros (*Bombus terrestris* y *B. pascuorum*), así como en otros insectos y ácaros como el parásito *Tropilaelaps mercedease* y el escarabajo *Aethina tumida* M. (de Miranda y Genersch 2010; Bacandritsos *et al.* 2012).

### **Patogenia del VAD**

En cuanto a la patogenia de los virus que afectan a las abejas melíferas, poco se sabe sobre los mecanismos mediante los cuales los virus ingresan a la célula y los daños que causan a la misma mediante su replicación, ya que hasta la fecha no se cuenta con cultivos celulares adecuados que permitan realizar estos estudios. Para comprender mejor los daños ocasionados por estos virus a las abejas infectadas, es necesario identificar dos términos que son constantemente utilizados en la virología de los insectos: infección abierta

o evidente e infección encubierta u oculta, los cuales permiten discriminar adecuadamente el tipo de infección que se desarrolla en el huésped. La infección evidente es aquella donde se observan signos claros de la enfermedad cuando el insecto presenta altos títulos virales. La vía principal de transmisión es horizontal y desenlaza con la muerte del individuo o la recuperación del mismo, donde ya no habrá replicación viral (de Miranda y Genersch 2010). La infección encubierta se caracteriza por no presentar signos claros de enfermedad, aun cuando es posible encontrar partículas virales o genoma viral en el individuo. El virus se transmite de forma vertical y puede ser capaz de ocasionar una infección evidente si se presenta la situación propicia (dependiendo de factores ambientales e individuales del huésped) (Aubert *et al.* 2008; de Miranda y Genersch 2010).

Se ha observado que el Virus de las Alas Deformes (VAD) puede causar ambos tipos de infección, aunque comúnmente causa una infección encubierta. Diversos estudios han determinado la presencia del virus en obreras, reina y zánganos; sin signos evidentes de enfermedad, tanto en colonias claramente afectadas por el virus como en aquellas aparentemente sanas. La transmisión vertical del virus es factible ya que se ha determinado la presencia del virus en ovarios, espermateca, testículos, vesículas seminales, semen y huevo; además es posible observar “brotes” de infección evidente en colonias aparentemente sanas fuertemente infestadas con varroa, con lo cual se cumplen los tres aspectos básicos de la infección encubierta (Fievet *et al.* 2006; Aubert *et al.* 2008; Boncristiani *et al.* 2009; de Miranda y Genersch 2010).

En cuanto a la infección evidente, ésta se distingue principalmente por la presentación de deformidades en las alas (**Figura 2**), reducción del tamaño del abdomen, decoloración del exoesqueleto y reducción drástica del tiempo de vida del individuo adulto, el cual llega a ser menor a 67 h. La manifestación de los signos característicos de una infección evidente está relacionada con la infestación de la colonia con varroa, aun cuando la sola infestación no es suficiente, ya que no todas las abejas que emergen de celdas infestadas muestran signos evidentes de enfermedad (Aubert *et al.* 2008; de Miranda y



Genersch 2010). Es por esto que se considera que en ocasiones el ácaro participa como vector biológico del virus, permitiendo la replicación del mismo en su interior (Yue y Genersch 2005) . Algunos estudios han demostrado que la infestación con el ácaro ocasiona un incremento tanto en la prevalencia del virus como en los títulos virales encontrados, e incluso parece ejercer cierta selección sobre las variantes virales, disminuyendo la variación y aumentando la prevalencia de aquellos que son factibles de replicarse en el ácaro (Gisder *et al.* 2009; Martin *et al.* 2012). Se ha observado que en celdas donde emergieron abejas con alas deformes, los ácaros presentan cargas virales de entre  $10^{10}$  y  $10^{12}$  equivalentes genómicos, mientras aquellos de celdas donde emergieron abejas aparentemente sanas no presentan una carga mayor a  $10^8$  equivalentes genómicos (Gisder *et al.* 2009). Aunado a esto, también existe una correlación positiva entre el número de ácaros que infestan una celda y la observación de deformidades en las alas, es por ello que se asocia la observación de abejas con alas deformes como signo del colapso de la colonia ocasionado por el ácaro (Di Prisco *et al.* 2011). De hecho, algunos estudios sugieren que la fortaleza de las colonias, el número de abejas con alas deformes y el grado de infestación de varroa pueden emplearse como parámetros predictivos para la supervivencia de la colonia al periodo invernal (Dainat y Neumann 2013), además de que ambos agentes (varroa y VAD) son dos de los principales patógenos encontrados en diversas regiones afectadas por el síndrome del colapso de las colonias, evento que ha afectado la actividad apícola de Estados Unidos y Europa desde 2006, causando fuertes pérdidas económicas, ya que en algunas regiones de los Estados Unidos se llegaron a presentar pérdidas de más del 80% de las colonias, con el consecuente desequilibrio ecológico de algunas zonas, pues aun más importante que la actividad productiva es la función de polinización, tanto de cultivos como de flora silvestre, que realizan las abejas melíferas (Carreck *et al.* 2010; Le Conte *et al.* 2010; Guzmán-Novoa *et al.* 2012).



**Figura 2.** Abeja obrera con alas deformes

## **JUSTIFICACIÓN**

En México el ácaro *Varroa destructor* se identificó desde 1992 en el estado de Veracruz, (Chihu-Amparán *et al.* 1992) y a la fecha se encuentra distribuido a lo largo de todo el país, donde se han podido comprobar algunos de los efectos adversos que ocasiona a las colonias. En lo que a producción de miel se refiere, se ha determinado que existe una correlación negativa entre el grado de infestación y la producción de miel; esto quedó demostrado por primera vez al estudiar colonias ubicadas en el altiplano mexicano (Arechavaleta-Velasco y Guzmán-Novoa 2000; Medina-Flores *et al.* 2011), en el cual predomina el clima templado y donde se ha observado que el ácaro tiene efectos adversos. En el caso de los virus, aun cuando es de suponer que son agentes transportados por varroa o que se replican en el ácaro (en especial el VAD), y que pueden estar implicados en la problemática presentada por las colonias infestadas, hasta antes del 2012 no se tenía evidencia de su existencia en México y fue a partir de ese año que se determinó por primera vez la presencia, no solo del VAD sino del Virus de la Parálisis Aguda de Israel (VPAI), el Virus de la Cría Ensacada (VCE), el Virus de la Parálisis Aguda (VPA) y Virus de las Celdas Reales Negras (VCRN) en colonias establecidas en el Distrito Federal (Guzmán-Novoa *et al.* 2012, 2013). Habiendo identificado la presencia de estos virus en el altiplano mexicano, resulta necesario realizar estudios enfocados en determinar su epizootiología con relación a la infestación de las colonias por varroa en diferentes regiones apícolas del país y observar si factores como el clima de cada región y el genotipo de abejas pudieran jugar un papel trascendente en la prevalencia y niveles de infección de las colonias, lo cual ayudará a identificar zonas con mayor susceptibilidad a presentar problemáticas serias con estos virus, principalmente con el virus de las alas deformes.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Determinar mediante técnicas moleculares la presencia del Virus de las Alas Deformes (VAD) de la abeja melífera, así como determinar los niveles de infestación del ácaro varroa y analizar la posible relación que guarda la presencia del virus con la del ácaro, en apiarios establecidos en clima templado y tropical de México.

### **Objetivos específicos**

- Determinar el porcentaje de infestación del ácaro varroa en muestras de abejas adultas y cría operculada de colonias establecidas en clima tropical y templado de México
- Determinar la presencia y niveles de infección del VAD de la abeja melífera en abejas adultas y cría operculada de colonias establecidas en clima tropical y templado de México
- Determinar si existe asociación entre la prevalencia y cuantificación del VAD y el porcentaje de infestación del ácaro varroa en abejas adultas y cría
- Determinar si existe efecto del morfotipo de las abejas en los niveles relativos del VAD

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Área de estudio.**

Se obtuvieron muestras de abejas adultas y cría de colonias de abejas establecidas en dos climas, tropical y templado.

#### **Clima tropical**

Las muestras de colonias establecidas en clima “tropical” se obtuvieron de apiarios ubicados en el municipio de Ahuacatlán, el cual se encuentra a 1000 msnm, a 20°55’ y 21° 11’ de latitud norte; 104°24’ y 104°44’ de longitud oeste en el estado de Nayarit, México. El clima de la región es Aw (cálido subhúmedo) con temperaturas que van de 16 a 24°C y precipitación promedio anual de 1100 mm. La vegetación predominante son bosques de pino (*Pino sylvestris*), encino (*Quercus rugosa*), copal (*Protium copal*) y tepehuaje (*Lysiloma acapulcense*) (INEGI 2015).

#### **Clima templado**

Las muestras de colonias establecidas en clima “templado” se obtuvieron en tres localidades diferentes:

Municipio de Atlixco, el cual se encuentra a 1800 msnm y a 18° 48’ y 19° 00’ de latitud norte; 98° 19’ y 98° 36’ de longitud oeste en el estado de Puebla, México. El clima predominante es Cw (templado subhúmedo con lluvias en verano) presentando temperaturas que van de 10 a 20°C y precipitación promedio anual de 700 mm. La vegetación dominante de forma natural eran bosques de pinos (*Pino sylvestris*) y cedros (*Cupressus lucitanica*), los cuales se han sustituido en su mayoría por cultivos anuales o semipermanentes (INEGI 2015).

Municipio de Cortazar, el cual se encuentra a 1800 msnm y 20° 19’ y 20° 31’ de latitud norte; 100° 49’ y 101° 03’ de longitud oeste en el estado de Guanajuato, México. El clima de la región se considera Cw (templado

subhúmedo con lluvias en verano) con temperaturas que van de 14 a 20°C y precipitación promedio anual de 700 mm. La vegetación dominante son los mezquites (*Prosopis laevigata*), huizaches (*Acacia pennatula*) y nopales (*Opuntia ficus-indica*), además de especies forrajeras como navajita (*Bouteloua gracilis*), zacatón (*Panicum máximum*) y lanudo (*Holcus lanatus*) (INEGI 2015).

Delegación Milpa Alta, la cual se encuentra a 2500 msnm y 19° 03' y 19° 14' de latitud norte; 98° 57' y 99° 10' de longitud oeste en el Distrito Federal, México. El clima de la región se considera Cw (templado subhúmedo con lluvias en verano) con temperaturas que van de 6 a 16°C y precipitación promedio anual de 700 mm. La vegetación dominante en la zona son bosques de pino (*Pino sylvestris*), encino (*Quercus rugosa*), oyamel (*Abies religiosa*) y bosques mixtos (pino-aile (*Alnus acuminata*)-encino), pastizales y matorrales (INEGI 2015).

### **Grupos de trabajo**

Se emplearon 80 colonias en total; 40 colonias localizadas en una región con clima tropical (Nayarit) y 40 localizadas en regiones con clima templado (Cortazar, Atlixco y Milpa Alta), las colonias fueron seleccionadas aleatoriamente de apiarios que no hubieran sido tratados contra el ácaro varroa en los últimos seis meses.

### **Obtención de muestras**

Al momento de tomar las muestras se evaluó la condición general de cada colonia, observando al momento de abrir la colmena el número de bastidores que en cámara de cría se presentaban cubiertos por abejas y posteriormente registrando, durante el manejo de la colmena, la totalidad de bastidores que presentaban cría en los diferentes estados de desarrollo, además de que se valoraron las reservas de alimento (miel y polen) y se registró si durante el muestreo en cada colonia había abejas con signos de infección evidente del VAD (abejas con alas deformes).

### **Infestación de *Varroa destructor*.**

Para determinar el nivel de infestación en abejas adultas se obtuvo de cada colonia una muestra de 100 a 200 abejas las cuales fueron conservadas en alcohol al 70% en recipientes de boca ancha con tapa de rosca. Con el objetivo de determinar el nivel de infestación en la cría se colectó de cada colonia un fragmento de panal de 10 X 10 cm con cría operculada, el cual fue envuelto en papel estraza, identificado, transportado y conservado en refrigeración (4°C).

### **Presencia del Virus de las alas deformes (VAD).**

Para determinar la presencia del VAD en abejas adultas, se colectaron de cada colonia 20-30 abejas, las cuales fueron colocadas en tubos tipo Falcon; los tubos tenían perforaciones en la tapa para permitir la entrada y salida del aire y fueron transportados en contenedores térmicos con refrigerantes para disminuir el metabolismo de las abejas, con la intención de mantenerlas vivas hasta su procesamiento. Una vez ubicados en una superficie de trabajo previamente esterilizada, se obtuvieron 15 abejas adultas de cada tubo, se les colocó en tres tubos de microcentrífuga con capacidad de 2 ml (cinco abejas por tubo) y se adicionó 1.5 ml de un estabilizador de ARN (RNA later, Ambiom®) con fin de mantener estable este ácido nucleico para su posterior extracción. Las abejas fueron trituradas con puntas de micropipeta estériles para permitir que el líquido penetrara en los tejidos y posteriormente fueron incubadas por 24 h a 4° C para finalmente conservarse a -20° C hasta su procesamiento.

Con el objetivo de determinar la presencia del VAD en cría se obtuvo de cada colonia un fragmento de panal de 5 x 5 cm el cual debía contener cría operculada. Cada fragmento fue envuelto en tela de jerga y conservado en contenedores térmicos para evitar la pérdida de calor de la cría con la finalidad de mantenerlas vivas. En una superficie de trabajo previamente esterilizada, se obtuvieron 15 pupas de celdas donde no se observara infestación con el ácaro varroa y 15 pupas de celdas infestas con el ácaro, las cuales fueron colocadas igualmente en tubos de microcentrífuga con capacidad de 2 ml (cinco pupas por tubo) y se adicionó 1.5 ml de un estabilizador de ARN (RNA later, Ambiom®), las pupas fueron trituradas con puntas de micropipeta estériles

para permitir que el líquido penetrara los tejidos y posteriormente fueron incubadas por 24 h a 4° C para finalmente conservarse a -20° C hasta su procesamiento.

De cada colonia se colectaron también de 50 a 80 ácaros varroa que se obtuvieron sacudiendo entre dos y tres bastidores con abejas adultas en un embudo de metal colocado sobre una caja de madera de 25 x 20 x 15 cm, la cual contaba en una de sus paredes con una perforación de 12 cm de diámetro y en la cara contraria una pared de malla criba de 3 mm. Una vez depositadas las abejas en la caja, se tapó el orificio con una madera cuadrada de 15 x 15 cm y la caja se introdujo a una bolsa de plástico donde previamente se había colocado una torunda de algodón impregnada con éter (10 ml). Enseguida se cerró la bolsa y se hizo circular el aire al interior por 5 a 10 min. Una vez que las abejas se encontraron anestesiadas, los ácaros se desprendieron y pasaron a través de la malla a la bolsa, donde fueron transportados a un área de trabajo previamente esterilizada para colocarlos en un tubo de microcentrífuga de 2 ml con 1.5 ml de un estabilizador de ARN (RNA later, Ambiom®), incubando la muestra por 24 h a 4° C para finalmente conservarlos a -20° C para su procesamiento posterior.

Todas las muestras fueron preparadas y conservadas en un área de trabajo designada en las instalaciones del Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos de la FMVZ-UNAM, hasta su posterior procesamiento en la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá.

## **Pruebas diagnósticas**

### **Infestación de *V. destructor* en abejas adultas**

Para determinar el porcentaje de infestación con el ácaro varroa en abejas adultas, se hicieron lavados de etanol al 70% (De Jong *et al.* 1982). Para ello, el recipiente en el cual se recolectó la muestra de abejas adultas en etanol se agitó manualmente durante 1 min. Posteriormente, se vació el contenido (abejas y etanol) en una botella de plástico de 1.5 L invertida, la cual fue



adaptada para este fin cortándola por la mitad e introduciendo una malla de alambre (8 cuadros/pulgada) en el extremo donde se encuentra la tapa-rosca para funcionar como colador de abejas; esta botella se colocó con la parte de la tapa-rosca hacia abajo en un soporte universal, verificando que la tapa estuviera bien cerrada para evitar derrames. Se adicionó etanol al 70% hasta cubrir por completo las abejas de la muestra y se agitaron nuevamente durante 2 min, para posteriormente abrir la tapa-rosca y drenar el etanol sobre una tela blanca (que funcionó como colador fino) colocada sobre un recipiente de 10 cm de diámetro por 12 cm de profundidad. Las abejas quedaron en la malla cribada y los ácaros desprendidos de las abejas quedaron retenidos en la tela. Se contaron los ácaros y las abejas que componían la muestra para después calcular el porcentaje de infestación con la siguiente fórmula: % infestación = [número de ácaros/número de abejas] x 100 (De Jong *et al.* 1982; Guzmán-Novoa *et al.* 2012).

#### **Infestación de *V. destructor* en cría**

Para determinar el porcentaje de infestación de varroa en la cría de las abejas, se examinaron las muestras de panal bajo un microscopio estereoscópico (Leica EZ4, Leica Microsystems Inc., Buffalo, United States), desoperculando 100 celdas de cada muestra, considerando como positivas aquellas celdas o pupas en las que se encontraban ácaros adultos o cualquier otra fase de desarrollo del parásito. Para obtener el porcentaje de infestación se utilizó la siguiente fórmula:

% infestación = [número de celdas positivas/número de celdas abiertas] x 100 (Guzmán-Novoa *et al.* 2012).

#### **Identificación morfométrica**

Para determinar el morfotipo de las abejas se empleó una adaptación del Sistema Rápido de Identificación de Abejas Africanizadas (FABIS por sus siglas en inglés, Sylvester y Rinderer 1987). Para ello se obtuvieron 12 abejas adultas de cada colonia, a las cuales se les desprendió el ala anterior derecha. Las alas se colocaron sobre un cubreobjetos en dos columnas de seis y se fijaron con una cinta adhesiva. Posteriormente, los cubreobjetos con las alas

fijadas se digitalizaron con un multifuncional (EPSON L355, EPSON México, México, D.F.), y se midió su longitud con ayuda del software Motic Imagen Plus®, trazando una línea de la parte más distal del ala hasta la escotadura de la vena costal. Los datos generados se exportan a una hoja de cálculo donde se obtiene el promedio de longitud del ala.

Los criterios de discriminación de morfotipo fueron los siguientes:

Si el promedio de longitud fue mayor o igual a 9.1 mm se consideró a la muestra como de morfotipo europeo, si el promedio era menor o igual a 8.7 mm se consideró de morfotipo africanizado y aquellas muestras que obtuvieron un promedio entre estos dos rangos fueron consideradas híbridos o sospechosas (Sylvester y Rinderer 1987; Santibáñez-Colmenares 2010).

### **Identificación del VAD**

En el presente estudio se empleó la transcripción en reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para amplificar un fragmento específico del genoma viral del VAD. Para ello, previamente se extrajo el ARN total de las muestras y se sintetizó ADN complementario.

Para realizar la extracción del ARN total se emplearon cinco abejas de cada muestra (adultas o cría), las cuales fueron homogeneizadas empleando el método descrito por Chen *et al.* (2000). Todos los instrumentos empleados en este proceso fueron adecuadamente lavados y esterilizados en autoclave para evitar contaminaciones. Al homogeneizado se le agregaron 800 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), 800 µL de amortiguador de extracción y se le centrifugó por 15 min a 13,000 rpm a 4°C. Se colectó el sobrenadante, al cual se le añadieron 800 µL de fenol-cloroformo (24:1) y se le centrifugó por 10 min a 13,000 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido se precipitó con cloruro de litio (CLi) (utilizando una cuarta parte del total del sobrenadante) y se dejó precipitar la reacción 12 h a 4°C. Posteriormente se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm a 4°C, decantando el sobrenadante y conservando el pellet de ARN, al cual se adicionaron 500 µL de alcohol al 70% y se le centrifugó a 12,000 rpm por 3 min; se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet en

una campana de flujo laminar por 30 min, para finalmente resuspender el pellet en 25  $\mu$ L de agua bidestilada tratada con 0.1% de dietilpirocarbonato a baño maría (60°C) por 3 min (Sambrook *et al.* 2000). La cantidad de ARN total se determinó con un espectrofotómetro (Nanoveu, GE Healthcare; Cambridge, UK).

La síntesis de ADNc fue realizada empleando 2  $\mu$ g de ARN total, 1  $\mu$ L de oligo (dT)<sub>18</sub> y 0.8  $\mu$ L de M.MuLVRT con el ReveltAid™ Hminus First Stand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Sciences; Burlington, Ontario, Canadá).

Las amplificaciones se realizaron a través de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple, donde se amplificó la región del genoma del virus que se encuentra entre las bases 6255 y 6897, correspondiente a un fragmento de la secuencia que codifica para la helicasa del virus obteniendo un producto de 642pb; igualmente se amplificó como control estándar una región del gen constitutivo de la abeja correspondiente a la proteína ribosomal S5 (RpS5) obteniendo un producto de 115pb.

La secuencia del oligonucleótido iniciador de ida, utilizada para detectar el VAD, fue ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA, la misma que utilizaron Chen *et al.* (2005), mientras que la secuencia del oligonucleótido iniciador de reversa fue CATAGATATCAGTCAACGGAGC. Este oligonucleótido se diseñó en el Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de Guelph (Guzmán-Nova *et al.* 2012) con el fin de obtener un producto de PCR más corto que el originalmente obtenido por Chen, evitando así la generación de lazos de ADN; esto obedece a que si fuera un poco más larga la secuencia de nucleótidos, se empezarían a formar lazos o anillos que dificultarían la amplificación. Asimismo, para diseñar el citado oligonucleótido iniciador, la secuencia del genoma completo del VAD se obtuvo del Centro Nacional de Información para la Biotecnología (*National Centre for Biotechnology Information-NCBI*). La secuencia fue alineada usando el programa CUSTALX y el iniciador con el programa *Gene Runner* (versión 3.05, *Hastings Software Inc.*, NY). Los oligonucleótidos se adquirieron del Laboratorio de Servicios de la Universidad de Guelph. Para la amplificación del RpS5 se emplearon las siguientes secuencias: iniciador de ida, 5'-AATTATTTGGTCGCTGGAATTG, e iniciador de reversa, 5'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA.

Todas las reacciones de PCR se hicieron con un termociclador Mastercycler™ (Eppendorf, Mississauga, Ontario). Cada 15 µl de reacción se preparó con 1.5 µl de un amortiguador de PCR de 10x (*New England BioLabs*; Pickering, Ontario), 0.5 µl 10 mM de dNTPs (*Bio Basic Inc.*; Markham, Ontario), 1 µl de 10 µM de los oligonucleótidos iniciadores de ida y reversa, 0.2 µl 5U/ µl de la Taq polimerasa (*New England BioLabs*; Pickering, Ontario), 1 µl del cDNA de la muestra y 7.8 µl de dd H<sub>2</sub>O. El termociclador se programó a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 60 s a 58°C y 60 s a 72°C, con un paso final de extensión a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las bandas amplificadas se capturaron en fotografías utilizando una cámara digital con un transiluminador Benchtop UV™ (*BioDoc-ItM Imaging System*; Upland, CA, USA). Para las identificaciones positivas, se seleccionaron aleatoriamente productos de PCR, los cuales se purificaron usando el kit de extracción EZ-10 *Spin Column DNA Gel*™ (*Bio Basic Canada Inc.*; Markmam, Ontario Canada) y se secuenciaron en el Laboratorio de Servicios de la Universidad de Guelph.

### **Cuantificación relativa del VAD**

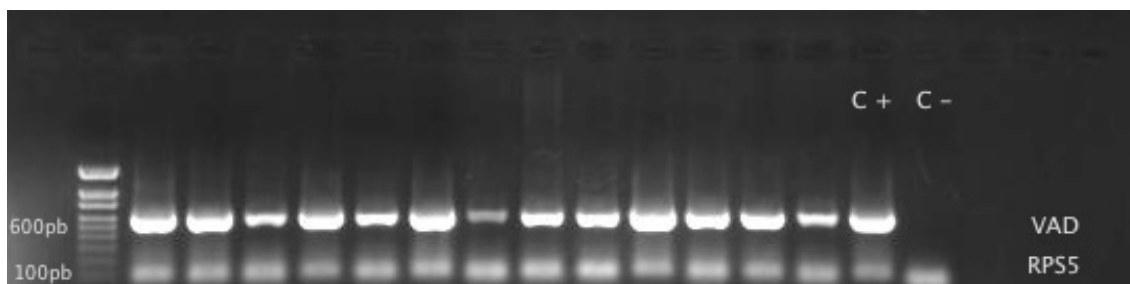
El VAD se cuantificó de manera relativa con base en la intensidad de la banda obtenida a partir del ARN viral con relación a la intensidad de la banda del producto del gen de referencia de la abeja (el RPS5). Para realizar la cuantificación relativa de las bandas observadas en los geles, se analizaron las imágenes obtenidas en el transiluminador mediante el programa Scion Imagen® con el cual se determina la cantidad de pixeles que componen la banda correspondiente al fragmento de producto viral amplificado, así como la cantidad de pixeles que conforman la banda obtenida por la amplificación del gen constitutivo de la abeja (RPS5). Se obtiene una proporción entre el número de pixeles de la banda asociada al virus (que es variable dependiendo de la cantidad de ARN viral) y el número de pixeles de la banda del gen constitutivo (que no cambia en intensidad, pues se expresa de manera uniforme) (Dean *et al.* 2002).

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos del presente trabajo fueron realizados con el programa estadístico R (R Development Core Team 2012). La prevalencia del VAD fue analizada a través de la prueba de Chi cuadrada, los datos del porcentaje de infestación de varroa en la cría y abejas adultas fueron transformados a la raíz cuadrada del arcoseno y se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Los datos obtenidos de la cuantificación relativa del virus fueron transformados por logaritmo, para cumplir con los criterios de normalidad y luego se sometieron a ANOVAs. Se realizaron pruebas de correlación con la finalidad de establecer la relación entre los niveles de infestación de varroa y los niveles relativos del VAD.

## RESULTADOS

Se determinó la presencia del VAD mediante la amplificación de un fragmento del genoma viral en reacciones duplex de PCR conjuntamente con un fragmento del gen RPS5 de la abeja melífera como control de la reacción (Figura 3).



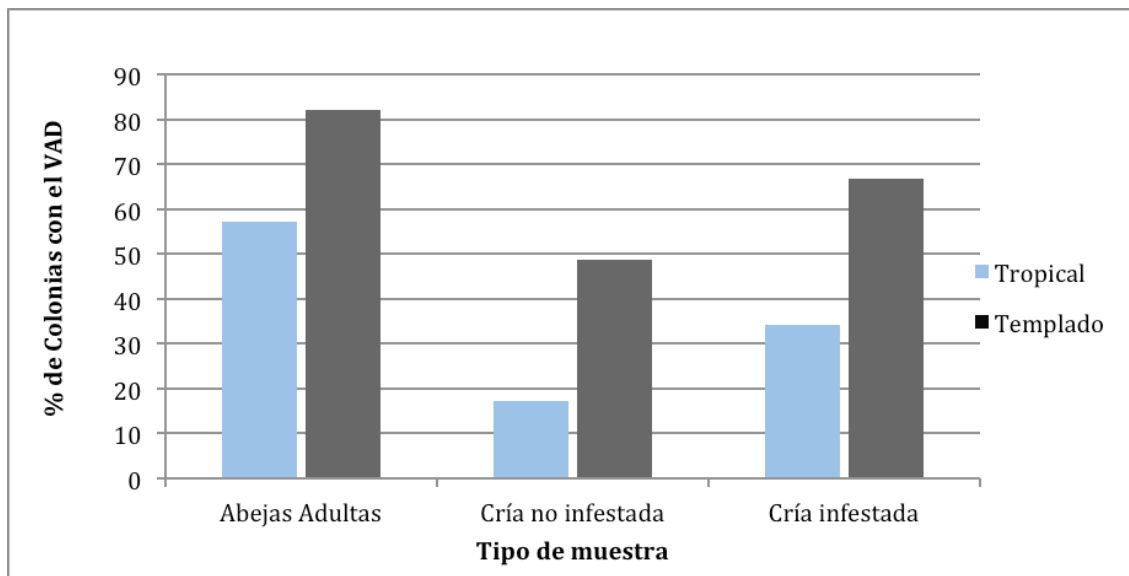
**Figura 3. Captura de pantalla de los productos de RT-PCR obtenidos. VAD (642pb) y el RPS5 (115pb). Carril 1 al 3 muestras de clima tropical (cría infestada, cría no infestada y adultas respectivamente), Carril 4 al 6 muestras de clima templado, Cortazar (adultas, cría no ifestada y cría infestda, respectivamente), Carril 7 al 11 muestras de clima templado, Milpa Alta (Cría infestada, adultas, cría no infestada, cría infestda y adultas, respectivamente) Carril 12 y 13 muestras de clima templado, Atlixco (Adultas) Carril 14 Control positivo (C+) y Carril 15 Control negativo (C-)**

### Efecto de clima y de la etapa de desarrollo de las abejas en la prevalencia del VAD

La **Figura 4** muestra que la prevalencia del VAD fue significativamente mayor en abejas adultas ( $\chi^2=5.5$ ,  $n=74$ ,  $P <0.05$ ), en cría no infestada con varroa ( $\chi^2=8.2$ ,  $n=74$ ,  $P <0.01$ ) y en cría infestada con varroa ( $\chi^2=7.7$ ,  $n=74$ ,  $P <0.01$ ) provenientes de regiones de clima templado en comparación con aquellas originarias de clima tropical.

Al comparar la prevalencia del VAD entre el tipo de muestras colectadas (abejas adultas y crías infestadas o no infestadas), se encontró que las abejas adultas presentaron una prevalencia significativamente más alta del VAD que la cría no infestada, tanto en clima templado como en tropical ( $\chi^2=9.6$ ,  $n=78$ ,  $P <0.01$ ;  $\chi^2=12.0$ ,  $n=70$ ,  $P <0.001$ , respectivamente), pero no hubo diferencia en la prevalencia del VAD entre abejas adultas y la cría infestada en ambos climas ( $\chi^2=2.4$ ,  $n=78$ ,  $P >0.05$ ;  $\chi^2=3.6$ ,  $n=70$ ,  $P >0.05$ , respectivamente). Además, la

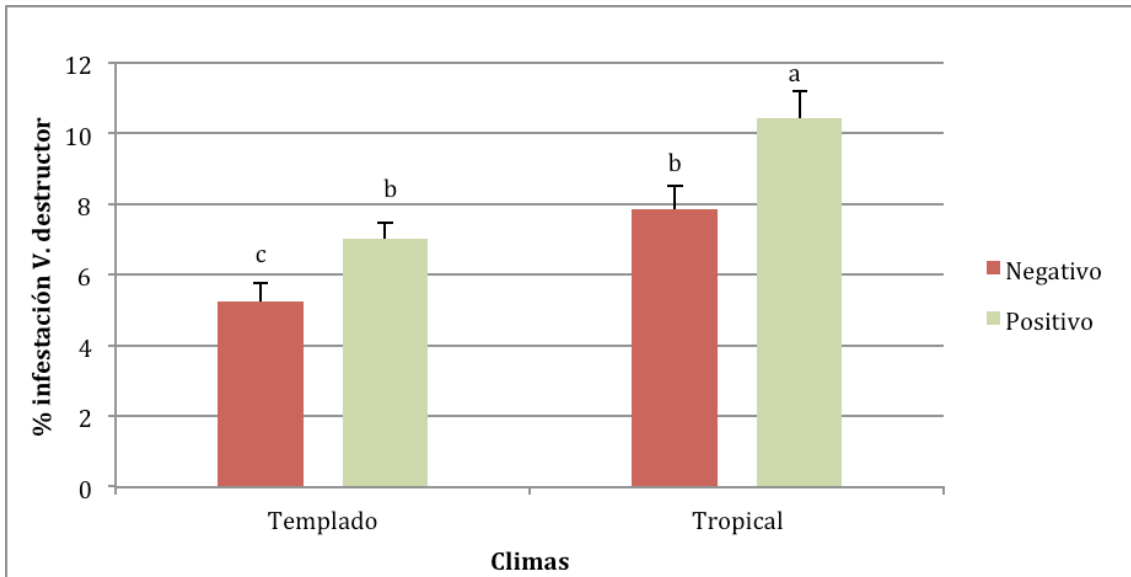
prevalencia del VAD no mostró diferencia significativa entre la cría infestada y la cría no infestada al ser analizada dentro de cada tipo de clima ( $\chi^2=2.6$ ,  $n=78$ ,  $P >0.05$ ;  $\chi^2=2.7$ ,  $n=70$ ,  $P >0.05$ , para clima templado y tropical, respectivamente); no obstante, al analizar los datos de ambos climas en conjunto, el VAD fue significativamente más prevalente en la cría infestada que en la cría no infestada ( $\chi^2=4.7$ ,  $n=148$ ,  $P <0.05$ ).



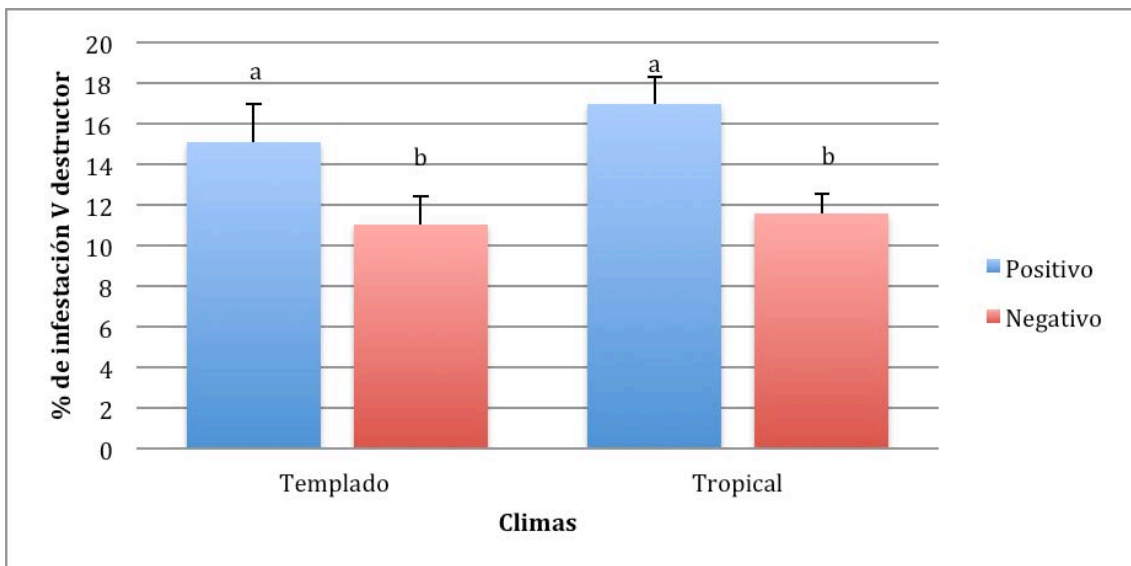
**Figura 4.** Porcentaje de colonias positivas al Virus de las Alas Deformes (VAD) en abejas adultas, cría no infestada y cría infestada con *Varroa destructor* en climas tropical y templado. Se detectaron, en todos los casos, diferencias significativas (basadas en pruebas de Chi-cuadrada), entre regiones climáticas.

#### **Asociación entre *Varroa destructor* y el VAD en dos climas**

Los niveles de infestación de *V. destructor* fueron significativamente más altos en colonias positivas al VAD que en colonias negativas, esto para ambas etapas de desarrollo (abejas adultas y cría) en ambos climas ( $F_{1,238} = 11.1$ ,  $P <0.001$ ;  $F_{1,236} = 7.6$ ,  $P <0.01$ ; para abejas adultas y cría, respectivamente). Los niveles de infestación con el ácaro fueron significativamente más altos en abejas adultas de clima tropical ( $F_{1,238} = 14.8$ ,  $P <0.001$ ), pero no así para la cría ( $F_{1,236} = 1.0$ ,  $P >0.05$ ). No se encontraron interacciones entre los niveles de infestación con el ácaro y el tipo de clima (**Figuras 5 y 6**).



**Figura 5.** Porcentaje de infestación con *Varroa destructor* ( $\pm$  EE) en abejas adultas, de colonias que resultaron negativas y positivas al virus de las alas deformes (VAD), en climas templado y tropical. Literales diferentes sobre las barras indican diferencias significativas, basadas en un ANDEVA y pruebas de Fisher LSD. Los datos se transformaron mediante la función de arcoseno de la raíz cuadrada. La figura se representa con los valores reales.

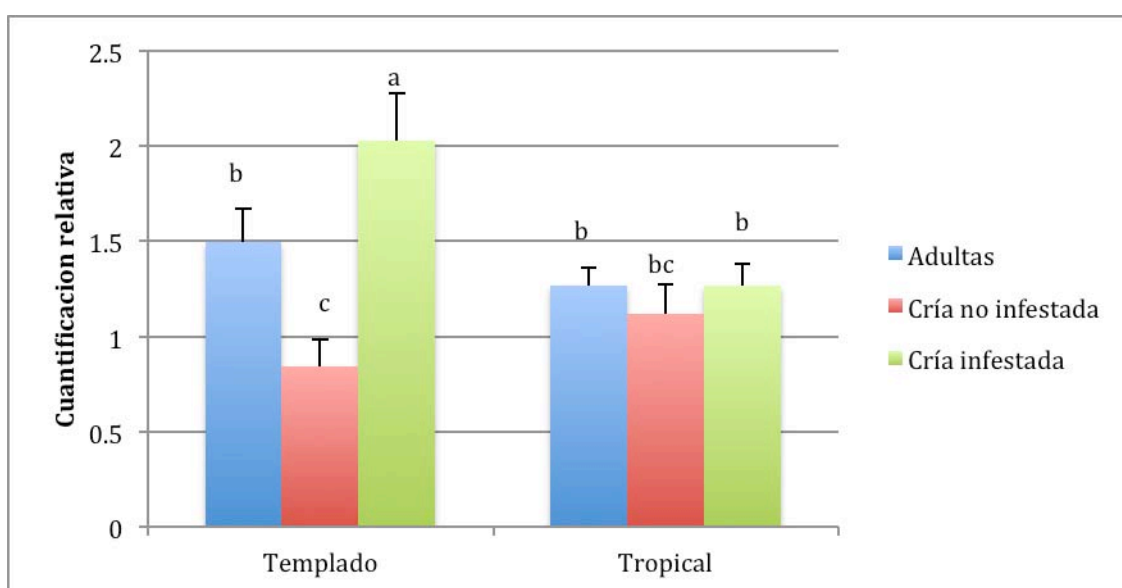


**Figura 6.** Porcentaje de infestación con *Varroa destructor* ( $\pm$  EE) en la cría de las abejas, a partir de colonias que resultaron positivas y negativas al virus de las alas deformes (VAD) en climas templado y tropical. Literales diferentes sobre las barras indican diferencias significativas basadas en un ANDEVA y



pruebas de Fisher LSD. Los datos se transformaron mediante la función de arcoseno de la raíz cuadrada. La figura se representa con los valores reales.

Los niveles de infección del virus variaron entre tipos de muestra en el clima templado, pero no en el clima tropical. La cría infestada con varroa tuvo títulos significativamente más altos del VAD que la cría no infestada y que las abejas adultas en clima templado ( $F_{2,123} = 5.0$ ,  $P < 0.01$ ). La interacción entre el tipo de muestra (abejas adultas, cría infestada o no) y el clima fue significativa ( $F_{2,123} = 3.0$ ,  $P < 0.05$ ; **(Figura 7)**).



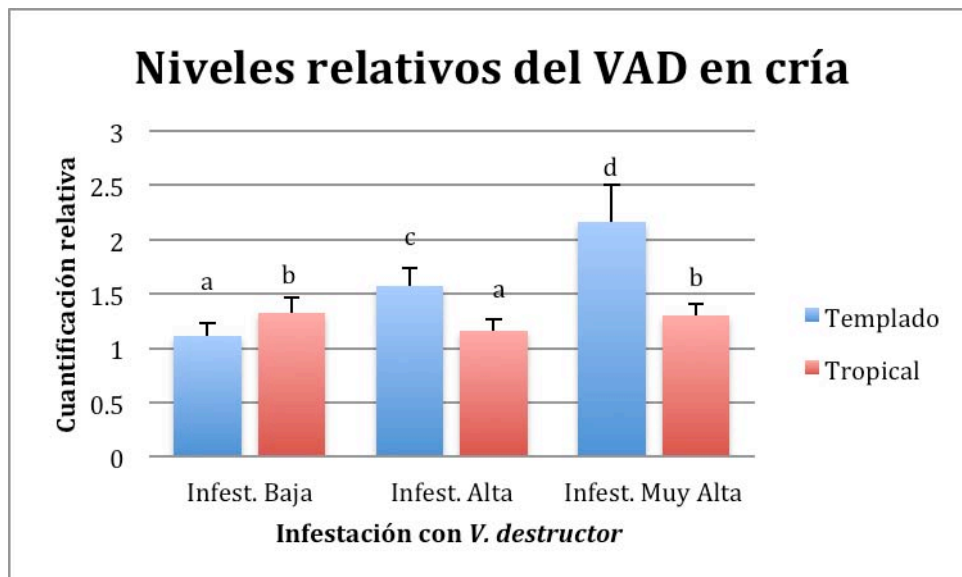
**Figura 7.** Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del VAD en abejas adultas, cría no infestada y cría infestada con *V. destructor*, en climas templado y tropical. Literales diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos de cada clima por separado, basadas en un ANDEVA y pruebas de Fisher LSD. Los datos se transformaron mediante la función de logaritmo antes de analizarse. La figura se representa con los valores reales.

Los niveles de infestación de varroa así como los tipos de clima también se relacionaron con la cuantificación del VAD. Los niveles de infestación de la cría no influyeron en los niveles del virus en el clima tropical, pero sí en el templado, donde se encontraron cantidades significativamente más altas del virus en colonias clasificadas con alto (5 a 10%) y muy alto (>10%) nivel de infestación,

esto en contraste con las de bajo nivel de infestación (< 3%). Los efectos de interacción entre el tipo de clima y el nivel de infestación con varroa también fueron evidentes ( $F= 3.5$   $P < 0.03$ ) (**Cuadro 1, Figura 8**).

**Cuadro 1.** Análisis de varianza para los niveles del VAD en la cría de las abejas de colonias clasificadas con bajo, alto y muy alto nivel de infestación de *Varroa destructor*, localizadas en climas tropical y templado. Los datos del virus fueron transformados mediante la función de logaritmo antes de analizarse.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Infestación con <i>V. destructor</i> (V. d. I)	2	5.3	2.7	3.4	0.04
Tipo de clima (C)	1	3.5	3.5	4.5	0.04
V. d. I x C	2	5.6	2.8	3.5	0.03
Error	122	97.1	0.8		



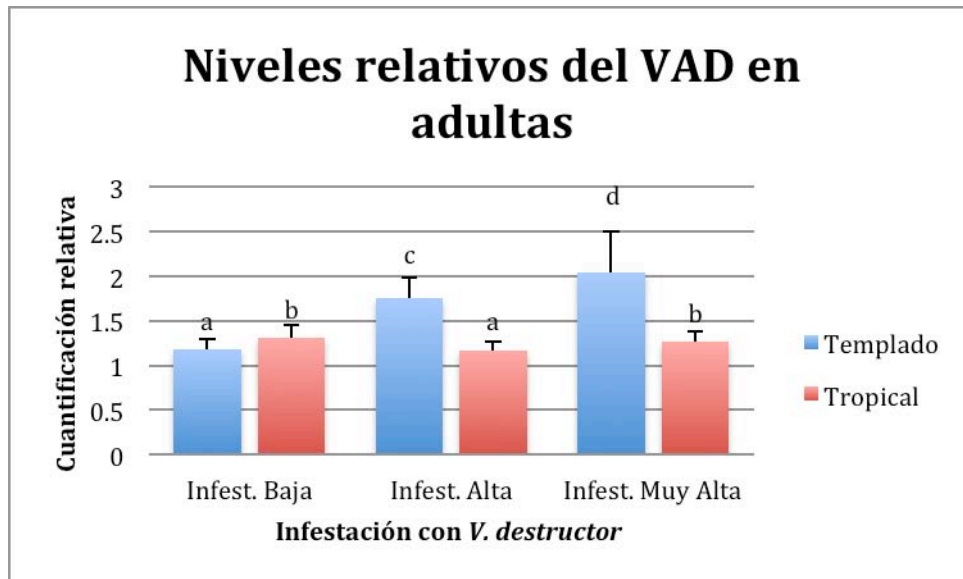
**Figura 8.** Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del VAD en cría de abejas clasificadas por presentar niveles bajos, altos y muy altos de infestación con *V. destructor* de climas templado y tropical. Literales diferentes muestran

diferencias significativas. Los datos se transformaron mediante la función de logaritmo antes de analizarse. La figura se representa con los valores reales.

Los niveles de infestación en abejas adultas no influyeron en los niveles del virus en el clima tropical, pero sí lo hicieron en el clima templado, donde se observaron cantidades significativamente más altas del virus en colonias con un nivel de infestación de *V. destructor* alto y muy alto en comparación con las colonias con bajo nivel de infestación del ácaro. No se detectaron efectos de interacción entre el tipo de clima y el nivel de infestación con el ácaro (**Cuadro 2, Figura 9**).

**Cuadro 2.** Análisis de varianza para los niveles del VAD en abejas adultas de colonias clasificadas con bajo, alto y muy alto nivel de infestación de *Varroa destructor*, localizadas en climas tropical y templado. Los datos del virus fueron transformados mediante la función de logaritmo antes de analizarse.

<b>Fuente de variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	
		<b>Cuadrados medios</b>			
Infestación con <i>V. destructor</i> ( <i>V. d. I</i> )	2	2.8	1.4	1.6	0.20
Tipo de clima (C)	1	4.4	4.4	5.1	0.02
<i>V. d. I</i> x C	2	3.9	2.0	2.3	0.10
Error	123	104.1	0.8		



**Figura 9.** Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del VAD en abejas adultas, clasificadas por presentar niveles bajos, altos y muy altos de infestación con *V. destructor* de climas templado y tropical. Literales diferentes muestran diferencias significativas. Los datos se transformaron mediante la función de logaritmo antes de analizarse. La figura se representa con los valores reales.

Sumado a lo anterior, el porcentaje de infestación de varroa en la cría se correlacionó significativamente con los niveles de infección del VAD en los dos tipos de climas, por ello los datos fueron conjuntados ( $r= 0.23$ ,  $n= 129$ ,  $P < 0.01$ ). El porcentaje de infestación de varroa en las abejas adultas no se correlacionó con los niveles de infección del VAD ( $P > 0.05$ ).

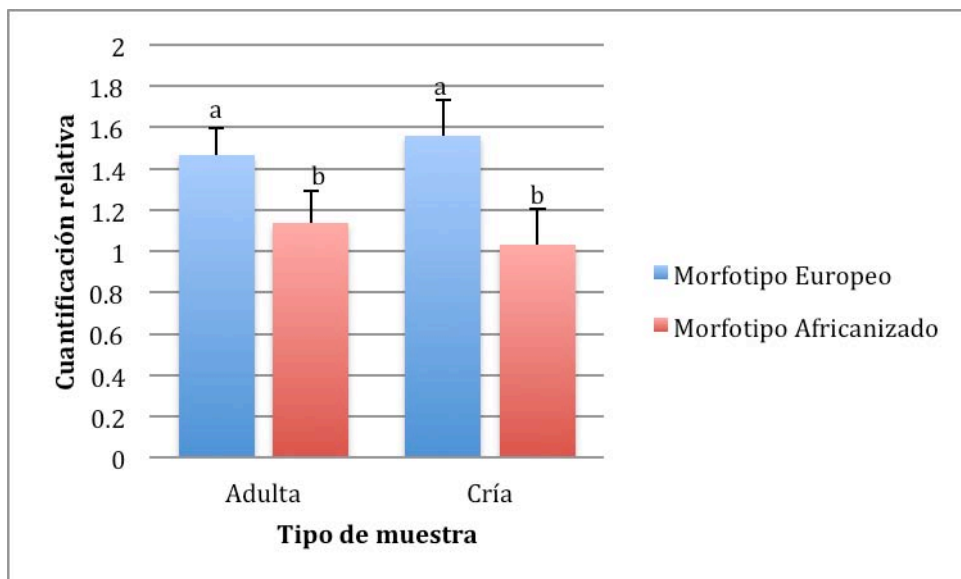
### **Efecto del morfotipo de abeja en los niveles relativos de infección del VAD**

Debido al insuficiente tamaño de muestra, el efecto del morfotipo de abeja en los niveles del VAD no pudo analizarse separadamente para el clima tropical y templado, pero cuando los datos de los dos tipos de clima fueron agrupados, sí fue posible realizarlo. La cría y abejas adultas de colonias clasificadas con morfotipo europeo por la longitud de sus alas, tuvieron niveles significativamente más altos del VAD en comparación con la cría y abejas

adultas clasificadas con morfotipo africanizado. No se encontraron efectos de interacción entre el morfotipo y las etapas de desarrollo de las abejas (**Cuadro 3, Figura 10**).

**Cuadro 3.** Análisis de varianza para los niveles del VAD en crías y abejas adultas de colonias clasificadas morfométricamente como europeas o africanizadas. Los datos de cuantificación viral fueron transformados mediante la función de logaritmo antes de analizarse.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Morfotipo (M)	1	0.60	0.60	7.1	0.008
Estado de desarrollo de la abeja (EA)	1	0.03	0.03	0.4	0.55
M x EA	1	0.03	0.03	0.4	0.55
Error	125	10.3	0.08		



**Figura 10.** Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del VAD en crías y abejas adultas de colonias clasificadas morfométricamente como europeas o africanizadas. Literales diferentes sobre las barras indican diferencias significativas basadas en un ANDEVA y pruebas de Fisher LSD, con datos transformados mediante la función de logaritmo antes de analizarse. La figura se representa con los valores reales.

## Discusión

### **Asociación del clima y *Varroa destructor* en la prevalencia del VAD en cría y abejas adultas**

Este es el primer estudio que compara la dinámica y epizootiología del VAD entre colonias de abejas establecidas en un clima tropical y colonias establecidas en un clima templado. Los resultados mostraron una mayor prevalencia del VAD en abejas adultas de ambos climas, similar a lo encontrado por Tentcheva *et al.* (2004), donde el VAD mostró mayor prevalencia en abejas adultas (97%) que en cría (94%), aunque en ese estudio no se especificó si la cría estaba infestada o no con varroa. Este resultado podría deberse, al menos en parte, a que las abejas adultas son los miembros de la colonia que pasan mayor tiempo expuestos a las diferentes vías de transmisión del virus. A su vez y como era de esperarse, se observó mayor prevalencia del virus en cría infestada con varroa que en la no infestada, independientemente del clima, lo cual concuerda con diversos estudios donde se ha observado una mayor prevalencia del VAD en pupas parasitadas por varroa con respecto a pupas no parasitadas (Shen *et al.* 2005; Tentcheva *et al.* 2006). Estos resultados nos permiten comprobar el papel preponderante que puede tener *V. destructor* en la transmisión y dinámica del VAD.

Por otra parte, también se pudo observar una mayor prevalencia del VAD en abejas de colonias de clima templado con respecto a las ubicadas en clima tropical; este es el primer estudio que realiza una comparación de prevalencia del VAD entre colonias de abejas en estos tipos de climas. Aunque no existen estudios previos que comparen la prevalencia del virus en ambos climas, los resultados obtenidos para el clima templado corresponden a lo reportado en diferentes estudios realizados en climas templados y fríos donde la prevalencia del VAD va del 70 al 100% (Tentcheva *et al.* 2004; Yue y Genersch 2005; Antúñez *et al.* 2006; Berényi *et al.* 2006; Welch *et al.* 2009), en contraste con lo

reportado de zonas cálidas de Brasil, donde la prevalencia del VAD apenas alcanzó un 20% (Teixeira *et al.* 2008).

### **Asociación del clima y *Varroa destructor* en los niveles del VAD en cría y abejas adultas**

En este estudio se encontró que en el clima templado las abejas adultas de colonias positivas al VAD presentaron mayores niveles de infestación del ácaro *V. destructor* que las de colonias donde no se detectó la presencia del virus. Esta situación no se presentó en las colonias de clima tropical, donde no hubo diferencias significativas en infestación con varroa entre colonias positivas y negativas al VAD. Adicionalmente, en las colonias en clima templado, la cría infestada con *V. destructor* mostró niveles significativamente más altos del VAD que la cría no infestada, y de igual forma que en las abejas adultas, esta situación no se presentó en colonias de clima tropical.

Por otra parte, los niveles de infestación del ácaro en abejas adultas mostraron correlación con los niveles de infección del VAD, sólo en las colonias de clima templado, pero no en las de clima tropical, lo cual concuerda con lo observado durante el muestreo, donde en 25% de las colonias del clima templado se detectaron abejas con signos de infección evidente del VAD (abejas con alas deformes); incluso en abejas de estas colonias con infecciones evidentes se observaron niveles significativamente más altos del VAD que en colonias con infecciones encubiertas en el mismo clima templado.

Estudios previos demostraron que el VAD es el agente causal de la presencia de abejas adultas con alas deformes, al ser transmitido a las abejas en etapa de pupa por el ácaro *V. destructor* (Möckel *et al.* 2011). En esos estudios también se encontró que no todas las pupas infestadas desarrollan los signos de alas deformes, lo cual aparentemente se debe a que la replicación del VAD en el ácaro debe alcanzar más de  $10^{10}$  equivalentes genómicos virales para desencadenar una infección evidente del virus (Yue y Genersch 2005; Gisder *et al.* 2009). Por lo tanto, parecen existir factores que favorecen la replicación

del VAD en el ácaro y el clima podría ser uno de esos factores. Se ha observado que en condiciones de laboratorio, una disminución de tres grados centígrados (33 a 30 °C) en la temperatura de incubación de la cría, ocasiona un incremento significativo en los títulos del VAD (Di Prisco *et al.* 2011).

Los resultados anteriores sugieren que existe una interacción entre el clima y la infestación de las abejas con *V. destructor*, lo que lleva a una mayor prevalencia y niveles de infección del VAD en colonias de abejas establecidas en climas más fríos, como el templado, que en colonias establecidas en climas más cálidos, como los tropicales. Pudiera ser que en condiciones ambientales más frías, *V. destructor* muestre una mayor eficiencia como vector y activador de la replicación del VAD, lo cual podría explicar parte de lo observado por De Jong *et al.* (1984), quienes concluyeron que *V. destructor* causa mayor daño en colonias ubicadas en climas fríos que en climas cálidos.

Estudios realizados en climas templados y fríos han reportado que tanto la prevalencia como los títulos del VAD se incrementan con la infestación de *V. destructor* (Tentcheva *et al.* 2006; de Miranda y Genersch 2010; Di Prisco *et al.* 2011). Dichas observaciones concuerdan con los resultados de este trabajo, donde se pudo apreciar la relación entre la presencia del ácaro y el incremento en la prevalencia y los niveles del VAD.

Los niveles del VAD en colonias de abejas melíferas podrían estar relacionados con la estacionalidad que muestra el virus en climas templados. Estudios donde se monitorea la prevalencia y títulos virales del VAD durante por lo menos un año, muestran que existe una mayor prevalencia y un incremento significativo de las cargas virales (de hasta un 30%), en la época del año en que comienza a disminuir la temperatura (otoño), y a su vez este virus muestra sus niveles más bajos en la época más calurosa (primavera) (Tentcheva *et al.* 2004; Highfield *et al.* 2009). En países de climas fríos, el VAD es considerado como una de las principales causas de pérdidas de colonias durante la época invernal (Highfield *et al.* 2009; Berthoud *et al.* 2010; Genersch *et al.* 2010; Topolska *et al.* 2010; Dainat *et al.* 2012; Dainat y Neuman 2013).



Dainat y Neumann observaron que las colonias que mueren durante el invierno son aquellas que durante el otoño mostraron mayor proporción de abejas con alas deformes e incluso encontraron que existe una correlación positiva entre los niveles de infestación con *V. destructor* y la presencia de abejas con alas deformes y cargas del VAD. Estos investigadores concluyeron que altos niveles de infestación del ácaro y la presencia de abejas con alas deformes son marcadores predictivos para la pérdida de colonias en invierno (Dainat y Neumann, 2013).

### **Interacción del clima y *Varroa destructor* en la prevalencia y niveles del VAD de las abejas**

Este es el primer estudio que compara las relaciones *V. destructor*-VAD entre abejas de colonias ubicadas en climas tropical y templado, por lo que no hay otros estudios con los cuales comparar los resultados obtenidos en clima tropical con relación al templado. Para poder explicar por qué en el clima tropical se encontró menor incidencia y menores cargas virales del VAD en las abejas, se podrían mencionar varias hipótesis. Por ejemplo, se ha reportado que colonias con bajas infestaciones de *V. destructor* presentan una menor prevalencia y títulos virales no solo del VAD, sino de varios otros virus que afectan a las abejas (Emsen *et al.* 2015). También podría plantearse que los resultados observados en este estudio fueron circunstanciales o se deben simplemente a que de forma natural la prevalencia del virus en primavera es mayor en el clima templado que en la tropical pero no así en otras temporadas; esto se podría aclarar realizando un estudio que monitoreara colonias de ambos climas de manera frecuente durante un año.

Se podría plantear también que las cepas de los virus del VAD encontrados en clima tropical y templado podrían ser diferentes y que por lo tanto podría variar su virulencia. Para despejar esa duda, se examinaron las secuencias obtenidas de los productos de PCR de ambos climas, las cuales corresponden a secciones del gen que codifica para la helicasa del ARN, y se compararon con las secuencias correspondientes de 10 lugares diferentes publicadas

previamente, las cuales fueron básicamente clones, sin presentar agrupamientos por región geográfica (Berényi *et al.* 2007). Las secuencias del VAD obtenidas en este estudio fueron muy similares entre sí y con cepas obtenidas en Canadá, Asia y Europa, por lo cual no se podría considerar que fueran atípicas respecto a las observadas a nivel mundial ni entre ellas.

Una hipótesis que podría explicar al menos en parte los resultados obtenidos en este trabajo es la de la variación genotípica de las abejas, ya que se ha encontrado en diferentes estudios que las abejas africanizadas en México presentan una resistencia relativa a la infestación y al crecimiento poblacional de varroa (Guzman-Novoa *et al.* 1996, 1999; Arechavaleta-Velasco y Guzman-Novoa 2001; Medina Flores *et al.* 2014) y que esta resistencia podría estar ligada a resistencia a los virus (Hamiduzzaman *et al.* 2014). Estos efectos genotípicos también se han observado en colonias de abejas europeas (Locke *et al.* 2014; Emsen *et al.* 2015). Los anteriores estudios están en concordancia con los resultados de este trabajo. Al analizar el total de las muestras con respecto a su morfotipo se encontró que la cría y abejas adultas de colonias con morfotipo europeo mostraron niveles más altos del VAD que aquellas de morfotipo africanizado, lo cual también concuerda con la baja prevalencia del VAD en abejas africanizadas en Brasil que fue de solo 20.3% (Teixeira *et al.* 2008). Esta prevalencia es considerada baja en relación a la prevalencia del VAD en Europa (Tentcheva *et al.* 2004; Berényi *et al.* 2006; Nielsen *et al.* 2008). De igual forma, en un estudio realizado en 2013 en Sudáfrica, en colonias de *Apis mellifera scutellata*, se encontró que a pesar de que las colonias muestreadas presentaron un 100% de prevalencia del ácaro *V. destructor*, no fue posible encontrar una muestra positiva al VAD (Strauss *et al.* 2013). Todo lo anterior, aunque circunstancial, es evidencia que sugiere cierto grado de resistencia de las abejas de genotipo africano al VAD, lo cual apoya los resultados de este estudio.

Tomando en cuenta todo lo anterior en conjunto con los datos obtenidos en este estudio, se podría explicar al menos en parte, por qué los niveles y la prevalencia del VAD fueron mayores en el clima templado que en el tropical. Es

posible que la transmisión y multiplicación del VAD se vea favorecida por abejas de genotipo europeo en colmenas ubicadas en condiciones más frías y secas, como las que se presentan en los climas templados, que en abejas más africanizadas de colmenas ubicadas en condiciones de mayor humedad y temperatura, características de los climas tropicales. De hecho, lo anterior se ha observado en algunos virus que afectan a mamíferos, cuya transmisión y multiplicación se ve favorecida en climas fríos y secos (Lowen *et al.* 2007). Cabe mencionar, sin embargo, que tendrían que llevarse a cabo estudios para elucidar como las condiciones climáticas pueden afectar la transmisión y replicación del VAD estando dentro del cuerpo de las abejas y en una colonia con temperatura regulada. Es posible que existan diferencias en la temperatura y humedad del nido de cría de colonias de abejas ubicadas en diferentes climas. Hasta donde se pudo corroborar, no existen estudios comparativos sobre estos parámetros entre colonias ubicadas en el trópico y colonias ubicadas en climas templados. Evidentemente, se requieren investigaciones que despejen esta duda, lo cual posiblemente podría ayudar a entender los resultados de este estudio.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio sugieren de forma consistente la relación entre el clima y las infestaciones de *V. destructor*, lo cual afecta la prevalencia, los niveles relativos y el desarrollo de infecciones evidentes del VAD en dos diferentes ambientes; principalmente que la interacción entre el clima y *V. destructor* en climas templados puede jugar un papel fundamental en la prevalencia, niveles relativos y la observación de infecciones evidentes (abejas con alas deformes) en las colonias de abejas melíferas.

## CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en comparar la prevalencia y títulos virales del virus de las alas deformes (VAD) entre colonias de abejas melíferas ubicadas en climas tropical y templado. Se pudo observar que su prevalencia y cargas virales fueron significativamente más altas en abejas de colonias del clima templado que en las del clima tropical; se encontraron interacciones significativas entre el tipo de muestra y el clima, con los niveles más altos del VAD en cría parasitada con varroa en el clima templado. Adicionalmente, sólo se pudieron observar infecciones evidentes del VAD en colonias de clima templado, en las cuales tanto los niveles de infestación de varroa como los niveles relativos del VAD fueron más altos que en las colonias con infecciones encubiertas.

Estos resultados sugieren que la interacción entre el clima y *V. destructor*, principalmente en climas templados, puede jugar un papel importante en la prevalencia y niveles relativos del VAD e incluso en la observación de infecciones evidentes en colonias de abejas melíferas. Además de todo lo anterior, se pudo determinar que factores como el morfotipo de las abejas pueden tener un efecto en dicha relación, alterando la prevalencia e infectividad del virus y tal vez de esta forma aminorar o agravar las infestaciones por *V. destructor* en colonias de abejas melíferas. Los resultados de este estudio podrían ayudarnos a entender como es que problemáticas globales como el Síndrome del Colapso de las Colmenas, fenómeno que desde 2006 ha ocasionado pérdidas masivas de colonias de abejas principalmente en Europa y Norteamérica y para el cual varroa y el VAD son mencionados como dos de las principales causas, aparentemente no han afectado en gran medida a la apicultura del país, así como la de otros países de climas cálidos.

A través de estos resultados surge la necesidad de continuar con investigaciones sobre la relación clima-parásitos en abejas, para poder en primera instancia corroborar lo encontrado, y para tratar de determinar los mecanismos específicos a través de los cuales se presenta esta aparente resistencia o susceptibilidad al VAD en las abejas, tanto por efectos del clima, como por efectos del genotipo. También sería importante investigar además si

se presentan efectos similares con otros virus para los cuales *V. destructor* funciona como vector, pues entre mayor entendimiento tengamos de los patógenos que afectan la actividad apícola y sus interacciones con el medio ambiente, más capacitados estaremos para evitarlos o controlarlos adecuadamente.

## REFERENCIAS

Amdam G V, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? J Econ Entomol. 2004;97(3):741-747.

Anderson DL, Trueman JWH. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp Appl Acarol. 2000;24:165-189.

Annoscia D, Del Piccolo F, Nazzi F. How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. J Insect Physiol. diciembre de 2012;58:1548-1555.

Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P. Honeybee viruses in Uruguay. J Invertebr Pathol. 2006;93:67-70.

Arechavaleta-Velasco ME, Guzmán-Novoa E. Producción de miel de colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) tratadas y no tratadas contra *Varroa Jacobsoni* Oudemans en Valle de Bravo, Estado de México. Vet México. 2000;31(4):381-384.

Arechavaleta-Velasco, M. E.; Guzman-Novoa, E. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Apidologie 2001, 32, 157–174.

Aubert M, Ball B, Fries I, Moritz R, Milani N, Bernardinelli I, et al. "Virology and the honey bee". Aubert M, Ball B, Fries I, Moritz R, Milani N, Bernardinelli I, editores. Belgium: European Commission; 2008.

Bacandritsos N, Roinioti E, Papanastasiou I. The important honey bee viruses: a short descriptive review enhanced with recent data. Bees. 2012.

Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2414-2420.

Berényi, O.; Bakonyi, T.; Derakhshifar, I.; Köglberger, H.; Topolska, G.; Ritter, W.; Pechhacker, H.; Nowotny, N. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 3605–3611

Berthoud H, Imdorf A, Haueter M, Radloff S, Neumann P. Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *J Apic Res.* 2010;49(1):60-65.

Boncristiani HF, Di Prisco G, Pettis JS, Hamilton M, Chen YP. Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee, *Apis mellifera*. *Virology*. 2009;6.

Carneiro FE, Torres RR, Strapazzon R, Ramírez SA, Guerra JC V, Kolling DF, *et al.* Changes in the reproductive ability of the mite *Varroa destructor* (Anderson e Trueman) in africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in southern Brazil. *Neotrop Entomol.* 2007;36(6):949-952.

Carreck NL, Ball B V, Martin SJ. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J Apic Res.* 2010;49(1):93-4.

Chen GYJ, Jin S, Goodwin PH. An Improved Method for the Isolation of Total RNA from *Malva pusilla* Tissues Infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Phytopatology.* 2000;148(5):57-60.

Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(1):606-11.

Chen YP, Siede R. Honey Bee Viruses. *Adv Virus Res.* 2007;70(07):33-80.

Chihu-Amparán D, Rojas-Avalos LM, Rodríguez-Dehaibes SR. Presencia en Veracruz, México del ácaro *Varroa jacobsoni*, causante de la varroasis de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.). *Técnica Pecu en México.* 1992;30(2):133-135.

Le Conte Y, Ellis M, Ritter W. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie.* 2010; 41(3): 353-363.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One.* 2012;7(2):e32151.

Dainat B, Neumann P. Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *J Invertebr Pathol.* 2013;112:278-280.

Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T. Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. *Plant Mol Biol Report.* 2002;20(4):347-356.

Duay P, De Jong D, Engels W. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genet Mol Res.* 2002;1(3):227-232.

Emsen, B.; Hamiduzzaman, M. M.; Goodwin, P. H.; Guzman-Novoa, E. Lower virus infections in *Varroa destructor*-infested and uninfested brood and adult honey bees (*Apis mellifera*) of a low mite population growth colony compared to a high mite population growth colony. *PLoS One* 2015, 10, e0118885.



Fievet J, Tentcheva D, Gauthier L, de Miranda J, Cousserans F, Colin ME, *et al.* Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology*. 2006;3(16).

Francis RM, Nielsen SL, Kryger P. Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS One*. 2013;8(3):e57540.

Genersch E, Von Der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, *et al.* The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*. 2010;41(3).

Gisder S, Aumeier P, Genersch E. Deformed wing virus: Replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol*. 2009;90:463-467.

Gregory PG, Evans JD, Rinderer T, de Guzman L. Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by Varroa mites. *J Insect Sci*. 2005;5(7).

Guzman-Novoa, E.; Sanchez, A.; Page, R. E.; García, T. Susceptibility of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera* L) and their hybrids to *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 1996, 27, 93–103.

Guzman-Novoa, E.; Vandame, R.; Arechavaleta, M. E. Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apidologie* 1999, 30, 173–182.

Guzmán-Novoa E, Correa-Benítez A, Zozaya-Rubio A, Espinosa-Montaña LG, Prieto-Merlos D, Reyes-Cuayahuitl MS, *et al.* Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas. Guzmán-Novoa E, Correa-Benítez A, editores. México, D.F.: Imagen Editorial Yire; 2012.

Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Correa-Benítez A, Espinosa-Montaña LG, Uribe-Rubio JL. A scientific note on the first detection of black queen cell virus in honey bees (*Apis mellifera*) in México. *Apidologie*. 2013;44(4):382-384.

Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Espinosa-Montaña LG, Correa-Benítez A, Anguiano-Baez R, Ponce-Vázquez R. First detection of four viruses in honey bee (*Apis mellifera*) workers with and without deformed wings and *Varroa destructor* in México. J Apic Res. 2012;51(4):342-346.

Hamiduzzaman, M. M.; Guzman-Novoa, E.; Goodwin, P. H.; Reyes-Quintana, M.; Koleoglu, G.; Correa-Benítez, A.; Petukhova, T. Differential responses of Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) to viral replication following mechanical transmission or *Varroa destructor* parasitism. J. Invertebr. Pathol. 2014, 126, 12–20.

Highfield AC, El Nagar A, Mackinder LCM, Noël LMLJ, Hall MJ, Martin SJ, *et al.* Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. Appl Environ Microbiol. 2009;75(22):7212-7220.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) [Internet]. México en cifras. 2015 [citado 1 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: [URL:http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/](http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/)

De Jong D. Mites: varroa and other parasites of brood. En: Morse RA, Kim F, editores. Honey Bee Pests, Predators, Dis. Third. Ohio, U.S.A.: A.I. ROOT COMPANY; 1997. p. 278-327.

De Jong D, De Andrea Roma D, Gonçalves LS. A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. Apidologie. 1982;13(3):297-306.

De Jong D, Gonçalves LS, Morse RA. Dependence on climate of the virulence of *Varroa Jacobsoni*. Bee World. 1984;65(3):117-121.

Kralj J, Fuchs S. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. Apidologie. 2006;37:577-587.

Locke, B.; Forsgren, E.; de Miranda, J. R. Increased tolerance and resistance to virus infections: A possible factor in the survival of *Varroa destructor*-resistant honey bees (*Apis mellifera*). PLoS One 2014, 9, e99998

Lowen, A. C.; Mubareka, S.; Steel, J.; Palese, P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. PLoS Pathog. 2007, 3, e151.

Martin SJ. The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. J Appl Ecol. 2001;38(5):1082-1093.

Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, *et al.* Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. Science (80- ). 2012;336:1304-1306.

Medina-Flores CA, Guzmán-Novoa E, Aréchiga-Flores CF, Aguilera-Soto JI, Gutiérrez-Piña FJ. Effect of *Varroa destructor* infestations on honey yields of *Apis mellifera* colonies in Mexico's semiarid high plateau. Rev Mex Ciencias Pecu. 2011;2(3):313-317.

Medina-Flores, C. A.; Guzman-Novoa, E.; Hamiduzzaman, M. M.; Aréchiga-Flores, C. F.; López-Carlos, M. A. Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in Mexico. Genet. Mol. Res. 2014, 13, 7282–7293.

De Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus. J Invertebr Pathol. Elsevier Inc.; 2010;103:S48-61.

Möckel N, Gisder S, Genersch E. Horizontal transmission of deformed wing virus: Pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. J Gen Virol. 2011;92:370-377.

Moretto G, Gonçalves LS, De Jong D, Bichuette MZ. The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud infestations in Brazil. *Apidologie*. 1991;22:197-203.

Navajas M, Migeon A, Alaux C, Martin-Magniette M, Robinson GE, Evans JD, *et al.* Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics*. 2008;9(301).

Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, *et al.* Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002735.

Nguyen BK, Ribière M, vanEngelsdorp D, Snoeck C, Saegerman C, Kalkstein AL, *et al.* Effects of honey bee virus prevalence, *Varroa destructor* load and queen condition on honey bee colony survival over the winter in Belgium. *J Apic Res*. 2011;50(3):195-202.

Nielsen SL, Nicolaisen M, Kryger P. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*. 2008;39:310-314.

Di Prisco G, Zhang X, Pennacchio F, Caprio E, Li J, Evans JD, *et al.* Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees, *Apis mellifera*. *Viruses*. 2011;3:2425-2441.

Richards EH, Jones B, Bowman A. Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology*. 2011;138:602-608.

Ritter W, De Jong D. Reproduction of *Varroa jacobsoni* O. in Europe, the Middle East and tropical South America. *Zeitschrift für Angew Entomol*. 1984;98:55-57.

Rosenkranz P. Honey bee ( *Apis mellifera* L .) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie*. 1999;30:159-172.

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol*. Elsevier Inc.; 2010;103:96-119.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.

Santibáñez-Colmenares MC. Comparación de dos métodos para evaluar el nivel de africanización de abejas (*Apis mellifera* L.) a través de la medición de la longitud del ala anterior. Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.

Shen M, Yang X, Cox-Foster D, Cui L. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*. 2005;342:141-149.

Sumpter DJT, Martin S. The dynamics of virus epidemics in *Varroa* -infested honey bee colonies. *J Anim Ecol*. 2004;73:51-63.

Sylvester A, Rinderer TE. Fast Africanized Bee Identification. *Am Bee J*. 1987;127(7):511-6.

Teixeira EW, Chen Y, Message D, Pettis J, Evans JD. Virus infections in Brazilian honey bees. *J Invertebr Pathol*. 2008;99(1):117-9.

Tentcheva D, Gauthier L, Bagny L, Fievet J, Dainat B, Cousserans F, *et al*. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*. 2006;37:41-50.

Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, *et al*. Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L . and

*Varroa destructor* Mite Populations in France. Appl Environ Microbiol. 2004;70(12):7185-191.

Topolska G, Gajda A, Pohorecka K, Bober A, Kasprzak S, Skubida M, *et al.* Winter colony losses in Poland. J Apic Res. 2010;49(1):126-128.

Welch, a. *et al.*, 2009. Presence and Prevalence of Viruses in Local and Migratory Honeybees (*Apis mellifera*) in Massachusetts. Applied and Environmental Microbiology, 75(24), pp.7862–7865.

Yang X, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(21):7470-7475.

Yue C, Genersch E. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). J Gen Virol. 2005;86:3419-3424.