



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Determinación de la presencia del virus de las alas deformes
(VAD) en colonias de abejas melíferas (*Apis
Mellifera* L.) en México**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

PONCE VÁZQUEZ JOSÉ ROBERTO

ASESORES:

MVZ. Ricardo Anguiano Baez

Dra. Laura G. Espinosa Montaña



México, DF

2013



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 Patrocinadores

A mis hijos *Polito y Werita*

A mi Aline

AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* y a la *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia* en donde obtuve mucho más que conocimientos, obtuve experiencias que marcaron mi vida y lecciones que difícilmente olvidaré.

Agradezco a cada uno de los integrantes del *Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos* quienes me ayudaron, enseñaron y motivaron en todo momento. Quisiera hacer inca pío en algunas de ellas. Gracias infinitas a la *Dra. Laura Espinoza*, por siempre tener la disponibilidad y paciencia para resolver mis dudas. Gracias *Richy* por siempre estar al pendiente de lo que hago y por ofrecerme tu amistad. Gracias *Dra. Correa* por darme siempre su confianza y también por todas las oportunidades brindadas. *Itzel Vázquez, Angélica Gris, Silvia Reyes, Ángel López*, toda mi admiración y profundo respeto.

Agradezco con el corazón a todas aquellas personas que aportaron algo en mi desarrollo personal y profesional, A mi familia que de alguna u otra manera patrocinó en gran medida mi sueño veterinario.

Eny soy todo lo que soy gracias a ti, *eres mi guía, mi Faro de Alejandría si me vez perdido, te miro y elimino la tristeza en un suspiro*, me acompañaste desde el inicio en mi carrera veterinaria, te agradezco infinitamente por ser mi amiga, por hacerme las tareas, por ayudarme cuando no podía solo, por comprenderme, por alegrarme la existencia, por ser el motivo principal por el cual quiero ser alguien en la vida, sigo agradeciéndole todos los días a los dioses el haber conspirado para que nuestros universos se alinearan.

Agradezco a todas las personas que estuvieron y que estarán a mi lado enseñándome cualquier cosa por “insignificante” que sea. Y finalmente a ti, tú que estás leyendo estas líneas... ¡Buen viaje!

*Si quieres llegar a la mesa puesta
nadie te la va a poner.
Lo que no hagas por ti mismo
nunca nadie lo va a hacer...*

CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE CUADROS.....	VI
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Antecedentes y distribución del VAD.....	6
Descripción del agente etiológico.....	8
Aspectos relevantes de la infección.....	9
Transmisión.....	9
Signos.....	10
Prevención, control y tratamiento.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	12
HIPÓTESIS.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
Localización del área de estudio, toma de muestras y acondicionamiento de muestras.....	13
Procedimiento de muestreo.....	14
Preparación de las muestras enviadas a la Universidad de Guelph en Canadá.....	15
Extracción del ARN, síntesis de cADN y reacciones de PCR.....	16
Análisis de datos.....	18
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	19
CUADROS.....	22
FIGURAS.....	23
REFERENCIAS.....	32

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1	Ácaro <i>Varroa destructor</i> sobre el tórax de una abeja obrera Adulta. 23
Fig. 2	Ácaro <i>Tropilaelaps Mercedesae</i> exótico en México. 23
Fig. 3	Fase adulta del parásito conocido como pequeño escarabajo de la colmena (<i>Aethina tumida</i>), presente en México. 24
Fig. 4	Vuelo de apareamiento entre una abeja reina y un zángano. 24
Fig. 5	Signos clínicos visibles de la infección por el virus de las alas deformes (VAD). 25
Fig. 6	Signos clínicos visibles en las puntas de las alas por la infección del virus de las alas deformes (VAD). 25
Fig. 7	Centro de Educación Ambiental (CEA) Ecoguardas. 26
Fig. 8	Preparación de las muestras, para su posterior análisis molecular. 26
Fig. 9	Fig. 9 Apiario “El Armadillo” propiedad del CEA-Ecoguardas. 27
Fig. 10	Recolección de las abejas adultas que se depositaron en frascos de boca ancha con capacidad de 120 mL. 27
Fig. 11	Fig. 11 Selección de abejas infestadas para luego retirarles ácaros <i>V. destructor</i> y depositarlos en tubos de centrifuga con capacidad de 1.5 mL. 28
Fig. 12	Los panales envueltos en papel se trasladaron en una hielera con refrigerantes al laboratorio del área de abejas del DMZAC y OA de la FMVZ-UNAM 28
Fig. 13	Inspección previa en todo el apiario con el propósito de identificar las colonias que tuvieran abejas con alas deformes y <i>V. destructor</i> . 29
Fig. 14	Solución estabilizadora RNA <i>later</i> TM 29
Fig. 15	Cada vial contó con cinco abejas adultas que se puncionaron para facilitar la penetración y fijación del RNA <i>Later</i> TM a los tejidos 30
Fig. 16	Se introdujeron cinco pupas por vial con la única excepción de que no se puncionaron. 30
Fig. 17	Termociclador <i>Mastercycler</i> TM que se utilizó para llevar a cabo las reacciones de PCR 31
Fig. 18	Patrón electroforético para la detección del VAD en México 31

LISTA DE CUADROS

		Pag.
Cuadro 1.	Virus que se presentan con más frecuencia en una infección y su presencia en México.	22
Cuadro 2.	Relación de colonias positivas (+) y negativas (-) al VAD y sus niveles de infestación con <i>Varroa destructor</i> (crías y abejas adultas), a partir de colonias muestreadas en la Delegación Tlalpan, México. La colonia A no presentó abejas adultas con signos de alas deformes.	22

Determinación de la presencia del virus de las alas deformes (VAD) en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en México

RESUMEN

PONCE VÁZQUEZ JOSÉ ROBERTO. Determinación de la presencia del virus de las alas deformes (VAD) en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en México (bajo la dirección de MVZ. Laura G. Espinosa Montaña y MVZ. Ricardo Anguiano Báez)

En México existe poca información sobre la presencia de enfermedades virales en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) y su asociación con ácaros de *Varroa destructor*. Aquí se reporta la primera investigación para demostrar la presencia de virus en abejas melíferas y ácaros de varroa de México, usando técnicas moleculares. Muestras de ácaros de varroa, pupas de obrera y abejas adultas, fueron colectadas de cinco colonias, cuatro de las cuales tenían una alta proporción de obreras con alas deformes. Los niveles de infestación de varroa fueron determinados en cría de obreras y en abejas adultas. Las muestras fueron analizadas por medio de PCR-transcripción en reversa (RT-PCR) para detectar una secuencia específica del virus de las alas deformes (VAD) el cual se pudo identificar en abeja adulta, en la cría de obreras y en los ácaros de varroa en México. Se discute la asociación del virus con *V. destructor*.

Palabras claves: Virus de las abejas, *Apis mellifera* L, Virus de las alas deformes, *Varroa destructor* A, SCC, México

INTRODUCCIÓN

Antecedentes de la apicultura en México

La apicultura en México constituye una importante actividad pecuaria en términos económicos, sociales y biológicos. Desde el punto de vista económico, se ubica entre los tres primeros lugares como generadora de divisas conservando una posición preponderante en la captación para el sector pecuario, manteniéndose en el tercer lugar durante los últimos años, destacando lo captado en el 2008 que fue de 83.87 millones de dólares estadounidenses, ya que en virtud de que la miel que el país produce es de excelente calidad, se exporta principalmente a la Unión Europea (UE) y a los Estados Unidos de Norte América (EUA).^{1,2}

Por otro lado, desde el punto de vista social, la actividad genera empleos a nivel rural que favorecen a más de 42 mil productores y sus familias, quienes trabajan 1.9 millones de colmenas. No obstante estos beneficios, el principal valor de la apicultura radica en la polinización que realizan las abejas sobre plantas cultivadas y silvestres.^{3,4}

Desde el punto de vista biológico, se ha establecido que debido a la actividad polinizadora de las abejas, se incrementa el rendimiento y la calidad de diversos cultivos agrícolas. Los cultivos beneficiados por la polinización son principalmente pepino, berenjena, calabacita, sandía, melón, cártamo, manzana, fresa, aguacate y cítricos entre otros,⁵ lo que en México, permite generar ingresos adicionales a la venta de miel en aproximadamente 2,000 millones de dólares anuales.² Con respecto a la polinización que las abejas realizan sobre plantas silvestres, aunque no se tiene una cifra exacta sobre el valor económico de esta contribución, se ha comprobado su

importancia ecológica, ya que se mantiene la biodiversidad y el equilibrio de los ecosistemas.^{4,5}

A pesar de que las abejas (*Apis mellifera* L.) son indispensables para muchos ecosistemas agroecológicos y que de ellas se obtienen productos alimenticios, medicinales y algunos otros de uso industrial, no están exentas de enfermedades o plagas, lo que a la larga repercute en la rentabilidad no sólo de la apicultura, sino también de la agricultura. Entre los agentes patógenos de las abejas, los virus representan una de sus principales amenazas ya que no solo alteran su salud, sino que también influyen negativamente en su productividad.^{4,6}

Los virus se identificaron por primera vez como una nueva clase de agentes patógenos que infectan a las abejas *Apis mellifera* L., cuando un científico de los EUA, el Dr. White, descubrió que un agente filtrable afectaba a las larvas de abejas causándoles una enfermedad; nombrada desde entonces como “cría ensacada”.⁶ Es así que a partir de 1963 a la fecha se han identificado alrededor de 18 virus distintos de los cuales solo 6, presentados en el **Cuadro.1**, son los más comunes en infecciones y han sido objeto de estudios en el mundo, pero muy pocos en nuestro país; la mayoría de estos virus presentan un genoma tipo ácido ribonucleico (ARN).⁶

La mayoría de los virus han mantenido una larga relación coevolutiva con las abejas, persistiendo en niveles bajos o en forma inaparente, lo que dificulta su diagnóstico.^{7,8} Existen virus que afectan sólo a las crías o sólo a las abejas adultas, así como los que afectan ambas etapas de vida. Los signos de una infección viral, por lo general, no son específicos de un virus en particular y muchas veces se llegan a

observar cuando existe asociación con otros patógenos.⁶ Hoy en día se ha verificado que las infecciones virales se encuentran estrechamente correlacionadas con la nosemosis (parasitosis infecciosa del tracto digestivo de las abejas adultas causada por dos especies de hongos de la clase Microsporidia) y la varroasis (parasitosis externa y contagiosa causada por ácaros del género *Varroa*, que afecta tanto a la cría como a las abejas adultas), ambas presentes y reconocidas oficialmente en México y que son diagnosticadas y reportadas ante los laboratorios oficiales del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Durante el proceso de infección por el microsporidio *Nosema* sp o a través de los hábitos de alimentación del ácaro *Varroa destructor* A., se crea una vía para el ingreso de los virus, por lo que bajo estas circunstancias, las infecciones virales pueden ser letales, ya que las partículas virales son capaces de replicarse y dispersarse con mayor rapidez.⁹ Otros factores que tienden a incrementar el impacto de los virus sobre las abejas corresponden al estrés nutricional y ambiental. Desafortunadamente, los virus son difíciles de evidenciar a nivel de campo y quizás por ello poco se evalúan sus efectos sobre las abejas.⁸

Una de las grandes debilidades que en materia apícola enfrenta México, tiene que ver con la falta de información sobre la situación epizootiológica de algunas de las enfermedades de las abejas, así como de métodos para tratarlas y controlarlas,¹⁰ especialmente en cuanto a los virus y su asociación con el ácaro *Varroa destructor*. Sólo se tiene información no oficial de la presencia en el país, del virus de la parálisis crónica y el de la cría ensacada;¹¹ el primero diagnosticado mediante pruebas de inmunodifusión¹² y el segundo a través de pruebas inmunológicas como inmunolectroforesis o de microscopía electrónica.

No obstante, el diagnóstico de la cría ensacada puede hacerse con relativa facilidad en el campo, basándose en el cuadro clínico.¹³ La problemática de realizar diagnósticos definitivos de enfermedades en abejas probablemente se debe a que no se cuenta con suficientes laboratorios que realicen pruebas específicas para abejas, sobre todo, las que resultan más confiables (basadas en técnicas moleculares); lo cual conlleva a que existan muy pocas publicaciones científicas al respecto.

No obstante, a finales de 2006, se despertó un mayor interés en los patógenos de las abejas *Apis mellifera* L., en virtud de que en ese año surgió un problema conocido como el “Síndrome del Colapso de las Colonias” (SCC o *Colony Collapse Disorder-CCD* por sus siglas en inglés).^{14,15,16} El cual, aparentemente existe en México pero se necesita más información al respecto. Dicho síndrome se encuentra afectando de manera alarmante a la apicultura de EUA, Canadá y de algunos países Europeos y se caracteriza por una evasión abrupta de las abejas en las colmenas, con la consecuente pérdida de estos valiosos insectos polinizadores, así como la disminución drástica de la producción de miel y la de otros productos de la colmena.^{16,17} Las causas de este fenómeno son múltiples; sin embargo, algunos estudios sugieren que se exacerba por la presencia de otros patógenos como *Varroa destructor* A., *Nosema ceranae* (ambos presentes en el país) y del virus de la parálisis aguda israelí (aparentemente presente).^{14,15,17,18} Otro de los virus que se encuentra estrechamente asociado al colapso de las colonias, máxime cuando *V. destructor* se encuentra infestándolas y que hasta cierto punto causa lesiones aparentes en las abejas, es el virus de las alas deformes (VAD).^{19,20}

Antecedentes y distribución del VAD

El virus de las alas deformes (VAD), conocido en inglés como *Deformed Wing Virus* (DWV) que afecta a la abeja melífera (*Apis mellifera* L.),²¹ se identificó por primera vez como virus egipcio de las abejas (VEA), ya que en 1977 fue aislado de abejas adultas en Egipto.²² Posteriormente en 1982, en Japón, se aisló un virus a partir de abejas que presentaban alas deformes, y el cual mediante pruebas serológicas (ELISA, *Western blot*), mostró una estrecha relación con el VEA. Este virus fue llamado virus Japonés, antes de ser designado como virus de las alas deformes.

Actualmente, se tiene conocimiento que el VAD cuenta con un patrón de variación estacional y se ha que se ha identificado en colonias de abejas de Europa, África, Asia, Norteamérica, Centroamérica, Sudamérica y Medio Oriente. En China, se ha encontrado afectando a las abejas *Apis cerana*^{6,23,24} y a los abejorros de las especies *Bombus terrestris* y *Bombus pascuorum*.²⁵ De entre todos los virus que afectan a las abejas, el VAD es el que se ha identificado con mayor frecuencia en *A. mellifera* L., causando brotes considerables que lo convierten en una importante causa de infección para las abejas.⁶

Por otro lado, antes de la propagación de la varroosis en diferentes países, en México este virus era totalmente desconocido.^{23,26} Estudios recientes han confirmado una estrecha asociación entre el VAD y *V. destructor* (**Figura 1**), parásito que actúa como vector.^{6,19,27,28} Sin embargo, los niveles de infestación de varroa, la falta de alimento y el clima no apto para la apicultura, son otros factores que también pueden influir en la susceptibilidad de las abejas a la infección y replicación de éste y otros virus.^{29,30}

Debido al papel de la varroosis en la infección del VAD, la distribución estacional del virus se encuentra ligada al desarrollo poblacional de varroa, con un crecimiento en la prevalencia y en los títulos virales conforme se incrementan los niveles de infestación;²⁸ o por el contrario, decreciendo conforme disminuyen sus niveles de infestación, sobre todo cuando se implementa un control efectivo contra el parásito.³¹

Se ha documentado la existencia de otros vectores del VAD, como *Tropilaelaps mercedesae*, un ácaro ectoparásito exótico en México que al igual que *V. destructor* se alimenta de hemolinfa de las abejas^{32,33} **(Figura 2)**. Lo mismo ocurre con *Aethina tumida* **(Figura 3)**, conocido como el pequeño escarabajo de las colmenas (presente en México), el cual, al constituir una plaga que se interna en las colmenas pobladas, puede distribuir partículas virales causando un fuerte impacto en la producción de miel, máxime cuando las colonias están débiles.³⁴ Incluso, se ha verificado que los ácaros vectores del VAD llegan a presentar títulos virales más altos que las mismas abejas,^{27,35} por lo que el ácaro *V. destructor* se ha asociado con una alta mortalidad de colonias de *Apis mellifera* L.^{25,36}

En México, Chihu *et al.*³⁷ detectaron la presencia de *V. jacobsoni* en 1992 en el estado de Veracruz, por lo que a partir de entonces el ácaro comenzó a dispersarse por todo el país, causando pérdidas por mortalidad de colonias que fluctuaron entre un 5% hasta un 80%, lo que en consecuencia contribuyó a que descendiera la producción de miel de las colonias infestadas.^{38,39} Martin *et al.*³⁰ proponen que es posible que gran parte de los daños en las abejas, incluyendo su mortalidad y descenso en la producción, pudieran haber sido causados por la interacción entre *V. destructor* y el VAD.³⁰

Descripción del agente etiológico

De acuerdo con el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) el VAD pertenece al orden *Picornavirales* del género *Iflavirus* de la familia *Iflaviridae*. Su morfología corresponde a un virus icosaédrico de 30 nm que posee una sola cadena simple de genoma ARN de sentido positivo.²³ Originalmente fue clasificado como semejante a los Picornavirus, en donde se encuentra la mayoría de los virus de insectos.⁴⁰ El VAD presenta en la capa exterior de su cápside 60 protómeros repetidos; cada uno compuesto de una sola molécula de tres subunidades VP1, VP2 y VP3. Además de estas tres subunidades, hay una cuarta proteína más pequeña, la VP4, que está presente en los viriones de otros virus como el virus de las celdas reales negras BQCV (*Black Queen Cell Virus* por sus siglas en inglés) y el virus de la parálisis aguda ABPV (*Acute Bee Paralysis Virus* por sus siglas en inglés).⁴¹ Las proteínas de la cápside juegan un papel importante en la protección del ARN viral de las actividades de las ARNasas que se encuentren en el ambiente.⁶ Actualmente el genoma del VAD ya se encuentra completamente secuenciado (*GenBank Accession* No. NC-00483),^{42,43} y se estima que su tamaño asciende a 10,140 pb.⁶

Investigaciones previas, que se han realizado en diferentes países, han trabajado solo con una fracción corta de aproximadamente 642pb que va desde las regiones 6255 a la 6897pb, esto es porque se logró identificar dentro de esa fracción características específicas al VAD, que hacen que se diferencie de otros virus y que hagan que se manifiesten los signos clínicos de las alas deformes.¹⁹

Aspectos relevantes de la infección

Aparte de que el VAD se encuentra infectando a las abejas adultas, también se le puede detectar en sus estados de desarrollo como en los huevos, larvas y pupas. Lo mismo ocurre entre las diferentes castas de abejas y en diferentes órganos, tejidos y secreciones, como ovarios, espermateca,^{44, 45} semen⁴⁶ y tejido del canal alimentario.⁴⁷ En el caso de las pupas, el virus difícilmente les causa mortalidad, por lo que se ha observado que las deformidades y la muerte ocurren cuando las abejas están a punto de emerger.^{6, 44}

Transmisión

El VAD puede transmitirse por vía horizontal y vertical. En el primer caso existe evidencia de que las abejas pueden infectar directamente a las crías a través del alimento que les suministran (papilla de polen y miel), ya que se han encontrado virus en estos alimentos; incluso, se ha detectado este virus en las heces de abejas obreras y de abejas reinas, por lo que la transmisión fecal-oral también es posible. Esta situación se favorece en ambientes bajo condiciones de fuerte hacinamiento.⁶

Igualmente, tal como se mencionó anteriormente, se ha corroborado la transmisión horizontal indirecta realizada a través de *V. destructor* y de otros vectores.⁴² La diseminación del virus por parte de *V. destructor* se realiza cuando el ácaro adquiere el virus de abejas infectadas y lo transmite a través de sus hábitos de alimentación a las no infectadas, las cuales, desarrollan las deformidades de las alas y el abdomen, o mueren después de que los ácaros se alimentan por algún tiempo de su hemolinfa.⁶ Al parecer, algunas proteínas contenidas en la saliva de varroa, cuyos componentes bioquímicos aún no se han caracterizado, actúan suprimiendo tanto la respuesta

humoral como la celular de las abejas; probablemente al deprimir los genes relacionados con la expresión inmune.^{48, 49} Del mismo modo, el supuesto efecto inmunosupresor de la saliva del ácaro, puede contribuir a la activación del virus. La combinación de ácaros y el VAD incrementa la susceptibilidad hacia otros patógenos oportunistas, conduciendo a una reducción progresiva en el desarrollo y productividad de las colonias.²⁵

La adquisición y transmisión del VAD, después de la activación de la replicación viral y el establecimiento de una infección viral sistémica dentro de la población, se facilita por el libre movimiento de los ácaros que infestan a diferentes individuos adultos y a sus crías.²⁵ De acuerdo con Chen *et al*⁴² el virus puede diseminarse entre los mismos ácaros a través de una abeja infectada que actúa como intermediaria.

Por lo que respecta a la transmisión vertical, ésta se realiza a través de las reinas infectadas que transmiten el virus a su descendencia.⁴² Las abejas reinas pueden adquirir el virus a través de copular con zánganos que porten el virus en el semen⁴⁶ **(Figura 4).**

Signos

El VAD es uno de los pocos virus que llega a desencadenar signos bien definidos en las abejas infectadas. Los signos típicos incluyen alas encogidas, arrugadas o vestigios de ellas **(Figura 5 y 6)**. En las abejas adultas suele observarse una reducción en el tamaño corporal así como decoloración, abultamiento y acortamiento del abdomen, parálisis y muerte prematura; no obstante, el mecanismo por el cual el VAD causa dichas

deformaciones aún no se ha podido aclarar.⁵⁰ Por otro lado, las abejas adultas que no muestran signos, pero que están infectadas, presentan una menor longevidad.^{6,47}

Prevención, control y tratamiento

En virtud de que no existen tratamientos contra las enfermedades virales en esta especie animal, se ha recomendado seguir algunos procedimientos para prevenirlas y controlarlas, tal es el caso de establecer un control eficaz contra *V. destructor*, tales como aceites esenciales (timol) o sustancias químicas (flumetrina, fluvalinato, cumafos o amitraz). Mantener buenas prácticas de higiene en el manejo de las colonias, alimentar a las abejas con suficiente cantidad y calidad de alimento (sobre todo con jarabe de azúcar concentrado), reemplazar los panales en mal estado, mantener el reemplazo anual de abejas reinas y en caso de los criadores de reinas, evitar la consanguinidad, son medidas de manejo que se han recomendado para enfrentar al parásito.^{51,52} Se mencionan también ciertos métodos de manejo de temperaturas, pero no resultan del todo indicados, ya que a menor o mayor temperatura, se compromete la vida y desarrollo de las abejas, por lo que resulta ineficaz. Asimismo, aunque alcanzable a largo plazo, se ha propuesto como una alternativa de control promisoria, la selección de abejas resistentes tanto a virus como a los vectores de los virus, específicamente, enfocada a la resistencia hacia *V. destructor*.⁵³

OBJETIVO GENERAL

Diagnosticar la presencia del virus de las alas deformes (VAD) en México

OBJETIVO ESPECÍFICO

Diagnosticar el virus de las alas deformes en muestras de abejas adultas, pupas y ácaros de *V. destructor*, recolectadas de colmenas ubicadas en un apiario del Distrito Federal, México, mediante la técnica molecular RT-PCR. Identificando el fragmento específico de 642pb.

HIPÓTESIS

El virus de las alas deformes se encuentra presente en abejas adultas, pupas y en los ácaros *V. destructor* de las colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) muestreadas en México, Distrito Federal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del área de estudio, toma de muestras y acondicionamiento de muestras

Se obtuvieron muestras de colonias de abejas ubicadas en el Centro de Educación Ambiental “Ecoguardas” (CEA-E), que se localiza en el kilómetro 5.5 de la Carretera Panorámica Picacho-Ajusco, Col. Ampliación Miguel Hidalgo, Delegación Tlalpan. México, Distrito Federal. El CEA-E se ubica en las coordenadas extremas 19° 19' 39" latitud Norte y 99° 19' 47" longitud Oeste (**Figura 7**). La zona de estudio cuenta con un clima templado y lluvioso con lluvias en verano (Cw) y con una temperatura media de 13°C con variaciones que van de los 26°C a los -3°C. Su vegetación y fauna silvestre es representativa de la zona del Pedregal de San Angel, motivo por el cual se ha establecido oficialmente que el CEA-E se encuentra asentado en una “área natural protegida”^{54,55} Las abejas del centro no están bajo tratamiento alguno y es frecuente encontrar abejas con varroa, nosema e incluso acariosis, al realizarles pruebas en laboratorio.

La preparación de las muestras, para su posterior análisis molecular, se realizó en el laboratorio del área apícola del Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos (DMZACyOA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Ciudad Universitaria, D.F. (**Figura 8**). Por otro lado, en la Universidad de Guelph, Ontario Canadá,[†] se realizó la prueba molecular: Retrotranscripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR = *Reverse Transcription-Polymerase Chain*

[†]El análisis molecular estuvo a cargo del PhD Ernesto Guzmán Novoa, ex-catedrático de la FMVZ-UNAM. Actualmente investigador en la Universidad de Guelph Canadá en el *Environmental Biology Department*.

Reaction); prueba que permite un análisis rápido de un gran número de muestras manteniendo un alto grado de sensibilidad y especificidad.^{28,56}

Procedimiento de muestreo

Se muestrearon cinco colonias ubicadas en el apiario llamado “Armadillo” del CEA-E, las cuales con fines experimentales, se han mantenido sin tratamiento contra *V. destructor* (**Figura 9**). Las razones que justificaron realizar el muestreo en colonias del CEA-E, obedece a que frecuentemente se presentan abejas con alas deformes.[‡] Como institución perteneciente al Gobierno del Distrito Federal (GDF), sí se tienen los reportes correspondientes ante las autoridades sanitarias. El muestreo consistió en recolectar, a partir de cada una de cuatro colonias, 60 individuos (20 abejas adultas **sin** signos de alas deformes, 20 abejas adultas **con** signos de alas deformes y 20 pupas). Una de las colonias, que figuró como testigo, se obtuvieron 40 individuos (20 abejas **sin** signos de alas deformes y 20 pupas). Asimismo, de cada una de las cinco colonias se recolectaron 240 ácaros *V. destructor*. Todas las muestras se conservaron en una hielera con refrigerantes para transportarlas a la FMVZ-UNAM.

Al momento de recolectarlas, las abejas adultas se depositaron en frascos de boca ancha con capacidad de 120 mL (**Figura 10**). Los ácaros se recolectaron, con un pincel (un pincel para cada colmena a muestrear para evitar contaminación cruzada), directamente del cuerpo de abejas adultas, para luego depositarse en tubos de centrífuga con capacidad de 1.5 mL (**Figura 11**). Por otro lado, las pupas se recolectaron de panales conteniendo cría operculada de obreras. Los panales se

[‡] Comunicación personal del MVZ Rodrigo Medellín Pico (responsable de los apiarios del CEA-E) y del MVZ Ricardo Anguiano Baez, ambos profesores del Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos de la FMVZ-UNAM que dirigen prácticas apícolas en dicho Centro.

trasladaron en una hielera con refrigerantes al laboratorio del área de abejas del DMZAC y OA de la FMVZ-UNAM (**Figura 12**).

Una semana antes de la toma de muestras, se realizó una inspección en todo el apiario del CEA-E con el propósito de identificar las colonias que tuvieran abejas con alas deformes así como *V. destructor* (**Figura 13**). Una vez tomada cada muestra, se identificó con el número de colonia de la que procedió, la fecha de colecta y se especificó el contenido (tipo de individuo recolectado). Posteriormente, las muestras se introdujeron a un ultracongelador donde se mantuvieron a una temperatura de -70°C durante 2 días, hasta que se prepararon para enviarse a la Universidad de Guelph, donde se realizó el análisis de RT-PCR.

Preparación de las muestras enviadas a la Universidad de Guelph en Canadá

Las abejas y los ácaros se enviaron al Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de Guelph, Canadá en viales (tubos de centrifuga con capacidad de 1.5 mL) con 1.2 mL de RNALater™[§] para su conservación (**Figura 14**). Cada vial contó con cinco abejas que se puncionaron para facilitar la penetración y fijación del RNA/Later™ a los tejidos (**Figura 15**). Igualmente, se introdujeron cinco pupas por vial, con la única excepción de que no se puncionaron debido a su blanda estructura anatómica (**Figura 16**). Cada vial se identificó por dentro y por fuera con una etiqueta que indicó el número de colonia y contenido. Los ácaros se transportaron en **seis lotes** de 40 individuos por vial= 240 ácaros, **por las 5 colonias = 1200 ácaros**.

[§] RNALater™: RNA Stabilization Solution, Ambion Inc. Austin, TX. USA. Sustancia que estabiliza dicho ácido nucléico para evitar su destrucción por enzimas que se encuentran comúnmente en el ambiente.

Extracción del ARN, síntesis de cADN y reacciones de PCR

Previo a la extracción del ARN, las muestras se mantuvieron en un ultracongelador a -70°C en la Universidad de Guelph. El ARN total se extrajo a partir de dos muestras obtenidas por colonia, homogeneizando cinco abejas (pupas o adultas) y 100 ácaros por muestra.⁵⁷ Antes de realizar el procedimiento de extracción, todo el material utilizado se lavó y esterilizó en autoclave. Los homogeneizados se extractaron dos veces con cloroformo y el ARN se precipitó usando LiCl. La cantidad total de ARN extraído se determinó con un espectrofotómetro (Nanovue GE Healthcare, Cambridge, UK).⁵⁸ Para la síntesis de cDNA, se retro-transcribieron 2 µg de ARN total usando Oligo (dT) y M.MuLV RT con el Kit de síntesis de cDNA, RevertAid™ H *Minus First Strand* (Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontario), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La region del genoma del virus que se amplificó para su identificación fue desde la 6255bp a la 6897bp.

La secuencia del oligonucleótido iniciador de ida, utilizada para detectar el VAD, fue (ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA) la misma que se utilizó en Chen *et al* 2005a,²⁹ mientras que el oligonucleótido iniciador de reversa (CATAGATATCAGTCAACGGAGC) se diseñó en el Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de Guelph. Este oligonucleótido iniciador se diseñó con el fin de obtener un producto de PCR más corto, 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 *loops* o anillos que dificultarían la identificación de 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.

Todas las reacciones de PCR se hicieron con un termociclador *Mastercycler™* (Eppendorf, Mississauga, Ontario). **(Figura 17)**. Cada 15 µl de reacción se preparó con 1.5 µl de un buffer 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 H₂O. 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 que 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.

Análisis de datos

Se realizó un análisis cualitativo a través de establecer el resultado positivo o negativo de las muestras analizadas. Asimismo, se estimó el nivel de infestación con el ácaro *V. destructor* en crías [número de celdas positivas/total de analizadas] x100 y abejas adultas utilizando la técnica de De Jong [número de ácaros/número de abejas] x100. La presencia del virus en los ácaros sirvió como prueba sugerente de la relación de varroa como vector del virus.

RESULTADOS

El VAD se detectó en las abejas adultas con y sin signos de alas deformes, en las pupas y en los ácaros varroa de todas las colonias experimentales; incluyendo las pupas obtenidas de la colonia testigo de la cual se habían recolectado abejas sin signos de alas deformes. **(Figura 18)**.

Para verificar la especificidad, las secuencias se compararon con secuencias virales publicadas en el *GenBank* (NCBI) y todas ellas mostraron una identidad mayor o igual a 96%. Dichas evidencias no fueron autorizadas por el investigador líder, para ser publicadas en el presente trabajo.** Por lo anterior, estos resultados faltarían ser confirmados oficialmente por el gobierno de México en laboratorios del SENASICA.

Los niveles de infestación de *V. destructor* registrados en las colonias experimentales estuvieron en un rango del 4 al 30% en las crías y entre el 3 al 9% en las abejas adultas. Los niveles de infestación por colonia se presentan en el **Cuadro 2**.

** Comunicación personal del PhD Ernesto Guzmán Novoa. Autor de las pruebas realizadas y responsable de los resultados expuestos en el presente trabajo.

DISCUSIÓN

En diferentes países se han publicado informes sobre la presencia de distintos virus en las abejas, algunos de ellos antes de la propagación de *Varroa destructor* en Europa o América, excluyendo a México y otros países latinoamericanos. La mayoría de los diagnósticos se basaron en las abejas que presentaron signos de infección o en abejas muertas que se recolectaron de las colmenas (algunas de las cuales procedieron de colonias que colapsaron). Por otro lado, gran parte de los datos se llegaban a obtener de muestras que no eran representativas de la ocurrencia natural de infecciones virales. Asimismo, tradicionalmente, las técnicas utilizadas para la detección de virus se basaban esencialmente, en técnicas de ELISA y/o *Western blot*, estos métodos, que no se han aplicado en México, no permiten detectar niveles bajos de partículas virales, por lo cual muchas veces, aunque pudieran llegar a ser infecciones persistentes, muy bien pudieron pasar inadvertidas.⁵⁹

A diferencia de lo que anteriormente ocurría, hoy en día se dispone de técnicas más sensibles para la detección de cargas virales en muestras de abejas u órganos obtenidos de ellas, por lo que la importancia del presente trabajo estriba en que por primera vez y mediante el empleo de una técnica molecular como la RT-PCR, se identifica el VAD en muestras de abejas adultas, pupas y en ácaros varroa, recolectados de un apiario ubicado al sur de la Ciudad de México, lo cual confirma su presencia en el país.

A pesar del reducido tamaño de muestra, los resultados sugieren que existe una relación entre los ácaros varroa y el virus de las alas deformes, ya que este último se encontró en todas las muestras de ácaros obtenidas de las cinco colonias

experimentales. Este hallazgo es relevante, porque el VAD se ha relacionado con la pérdida de numerosas colonias de abejas^{9, 60} y soporta la noción de que *V. destructor* contribuye en dichas pérdidas al comportarse como vector y transmisor del virus. Algunos estudios han demostrado que el incremento en la virulencia, adquirida al paso del tiempo por diversos virus llamese virus de las alas deformes, cría ensacada, parálisis crónica etc., puede deberse a la relación que éstos tienen con el ácaro, ya que posiblemente varroa actúa activando la replicación viral.²¹

En el presente trabajo no se observó que los bajos niveles de infestación influyeran para que el virus estuviera ausente. Es posible que esto haya sucedido al seleccionar algunas abejas que aunque si fueron portadoras del virus de las alas deformes, la carga viral no fue la suficiente para que expresaran los signos clínicos de la enfermedad. Otra posible explicación sería que las abejas fueron contagiadas recientemente y aunque pudieran tener la carga viral necesaria para desarrollar los signos clínicos, al momento de la toma de muestra aun no los habrían desarrollado y por eso se tomaron como abejas clínicamente sanas, por lo que se requeriría en futuros estudios determinar los títulos o cargas virales con relación a los niveles de infestación. En este sentido, Di Prisco *et al* 2011,⁶¹ demostraron que la severidad de la infección motivada por el VAD, se correlacionó positivamente con el nivel de infestación con varroa en las abejas que estudiaron.

Los resultados de este estudio, así como la presencia de signos clínicos evidentes y específicos para el VAD (abdomenes deformes, alas deformes, pérdida de velloidades) sugieren la necesidad de realizar un monitoreo más amplio que incluya las diferentes regiones apícolas de México, de tal manera que se evalúe su distribución

y relación con *V. destructor* y haciendo las pruebas necesarias determinar su papel como probable causante de mortalidad de colonias de abejas. Asimismo a futuro, una vez montadas las técnicas moleculares PCR, RT-PCR, se podrán desarrollar proyectos en los que se estime el efecto de éste y otros virus en la producción de miel así como su impacto económico.

La utilidad de este trabajo de tesis estriba en que se demuestra la presencia del virus de las alas deformes en el país, situación que se deberá confirmar por las autoridades competentes para que se reconozca oficialmente la enfermedad en el país y con ello se proponga de manera conjunta, involucrando a toda la gente que interviene en esta problemática, tales como, apicultores, investigadores, autoridades e instituciones de educación un acuerdo, norma o programa que contemple el estudio y prevención de estas enfermedades en las abejas.

CUADROS

Cuadro 1. Virus que se presentan con más frecuencia en una infección y su presencia en México.

Virus	Orden	Familia	Genero	Evidencia en México
Virus de las alas deformes	Picornavirales	Iflaviridae	Iflavirus	Presente, no oficial
Virus de la celda real negra	Picornavirales	Dicistroviridae	Cripavirus	Presente, no oficial
Virus de la cría ensacada	Picornavirales	Iflaviridae	Iflavirus	Presente, no oficial
Virus de la parálisis aguda	Picornavirales	Dicistroviridae	Aparavirus	Presente, no oficial
Virus de la parálisis aguda israelí	Picornavirales	Dicistroviridae	Aparavirus	Presente, no oficial
Virus de la parálisis crónica	Picornavirales	Dicistroviridae	Aparavirus	Presente, no oficial

Fuente: Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas. SAGARPA, OIRSA, FMVZ, CONASA. MEXICO 2012

Cuadro 2. Relación de colonias positivas (+) y negativas (-) al VAD y sus niveles de infestación con *Varroa destructor* (crías y abejas adultas), a partir de colonias muestreadas en la Delegación Tlalpan, México. La colonia A no presentó abejas adultas con signos de alas deformes.

Colonia	Muestra	VAD	% Infestación con <i>V. destructor</i>	Alas Deformes
Colonia A	Crías (20)	+	30	
	Abejas Adultas (20)	+	9	NO
	Varroas (240)	+	-	
Colonia B	Crías (20)	+	11	
	Abeja Adultas (40)	+	4	SI
	Varroas (240)	+	-	
Colonia C	Crías (20)	+	4	
	Abeja Adultas (40)	+	4	SI
	Varroas (240)	+	-	
Colonia D	Crías (20)	-	8	
	Abeja Adultas (40)	+	3	SI
	Varroas (240)	+	-	
Colonia E	Crías (20)	-	16	
	Abeja Adultas (40)	+	0	SI
	Varroas (240)	+	-	

FIGURAS



Fig. 1 Ácaro *Varroa destructor* sobre el tórax de una abeja obrera Adulta.



Fig. 2 Ácaro *Tropilaelaps Mercedesae* exótico en México.



Fig. 3 Fase adulta del parásito conocido como pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*), presente en México.



Fig. 4 Vuelo de apareamiento entre una abeja reina y un zángano.



Anguiano-Baez Ricardo

Fig. 5 Signos clínicos visibles de la infección por el virus de las alas deformes (VAD).



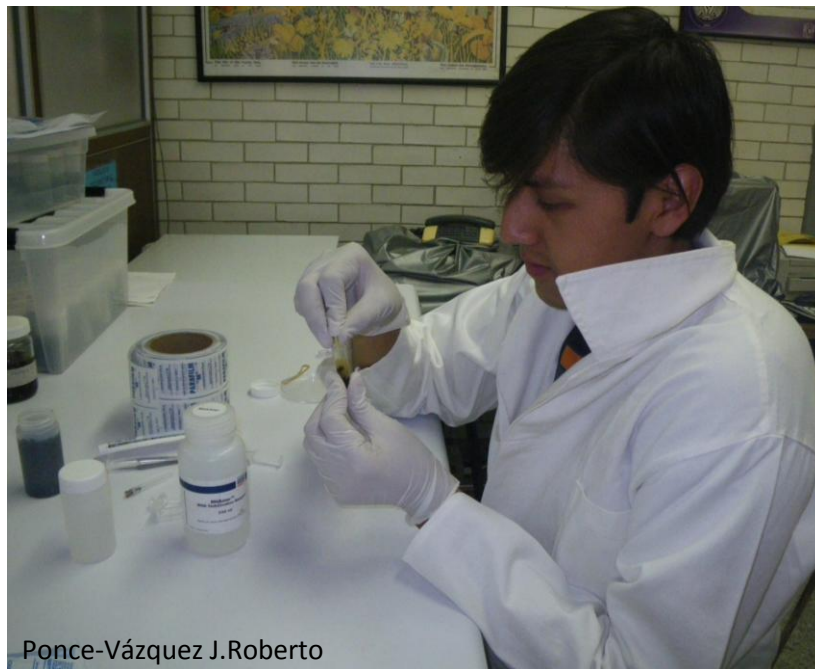
Anguiano-Baez Ricardo

Fig. 6 Signos clínicos visibles en las puntas de las alas por la infección del virus de las alas deformes (VAD).



Ponce-Vázquez J.Roberto

Fig. 7 Centro de Educación Ambiental (CEA) Ecoguardas.



Ponce-Vázquez J.Roberto

Fig. 8 Preparación de las muestras, para su posterior análisis molecular.



Ponce-Vázquez J.Roberto

Fig. 9 Apiario “El Armadillo” propiedad del CEA-Ecoguardas.



Fig. 10 Recolección de las abejas adultas que se depositaron en frascos de boca ancha con capacidad de 120 mL.



Fig. 11 Selección de abejas infestadas para luego retirarles ácaros *V. destructor* y depositarlos en tubos de centrifuga con capacidad de 1.5 mL.



Fig. 12 Los panales envueltos en papel se trasladaron en una hielera con refrigerantes al laboratorio del área de abejas del DMZAC y OA de la FMVZ-UNAM



Fig. 13. Inspección previa en todo el apiario con el propósito de identificar las colonias que tuvieran abejas con alas deformes y *V. destructor*.

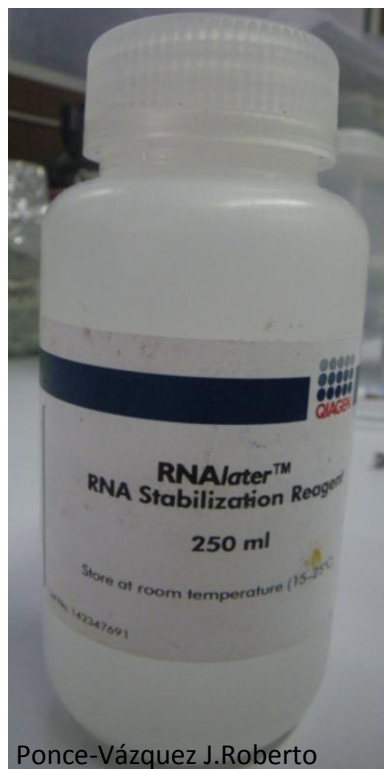


Fig. 14 Solución estabilizadora RNAlater™



Ponce-Vázquez J.Roberto

Fig. 15 Cada vial contó con cinco abejas adultas que se puncionaron para facilitar la penetración y fijación del RNALater™ a los tejidos



Ponce-Vázquez J.Roberto

Fig. 16 Se introdujeron cinco pupas por vial con la única excepción de que no se puncionaron.

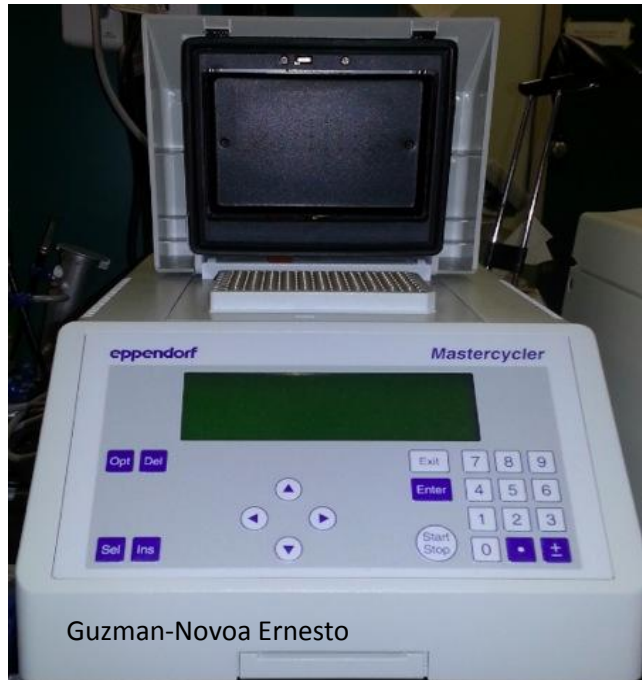


Fig. 17 Termociclador Mastercycler™ que se utilizó para llevar a cabo las reacciones de PCR

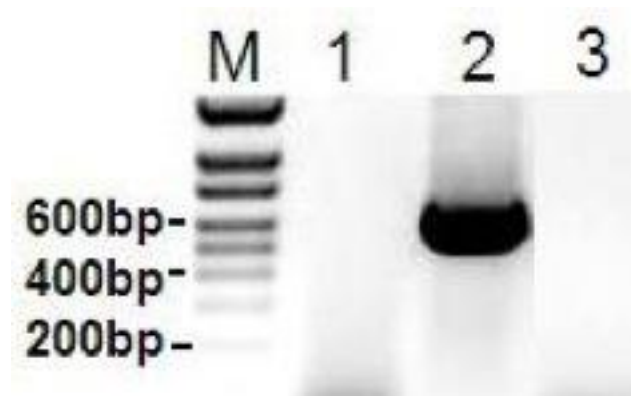


Fig. 18 Patrón electroforético para la detección del VAD en México México: Carril M= Marcador de ADN (se muestra el peso molecular de las bandas), Carril 1= abejas negativas al VAD, muestra de abejas proporcionada por el laboratorio en Guelph, Canadá. (sin signos aparentes de infección, sin alas deformes), Carril2= Banda de una muestra positiva al VAD 642pb (con signos de alas deformes), Carril 3= testigo negativo, que funciona para evitar contaminación, se utilizan los mismos reactivos sin macerados para comprobar que los reactivos no están contaminados y alteren los resultados.

REFERENCIAS

1. SAGARPAa. Mantiene México liderazgo en exportación de miel. Comunicado de la Coordinación General de Comunicación Social B231. Sala de prensa del gobierno federal. México, mayo 2010. Disponible en: <http://www.presidencia.gob.mx/2010/05/mantiene-mexico-liderazgo-en-exportacion-de-miel/> Citado el 10/10/12.
2. SAGARPAb. Situación actual y perspectivas de la apicultura en México. Claridades Agropecuarias. Marzo 2010; No. 199:3-34. Disponible en: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/199/ca199-3.pdf>
3. AUBERT MFA, BALL BV, BERNARDINELLI I, BROWN MJF, BROWN M, CARTER MJ *et. al.* 2008. Virology and the honey bee. In: Aubert M, Ball B, Fries I, Moritz R, Milani N, Bernardinelli I (eds.). European Communities. Luxembourg Cited in: 9/01/12. Available on: http://ec.europa.eu/research/agriculture/pdf/virology_and_the_honey_bee.pdf
4. GISDER S, AUMEIER P, GENERSCH E. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). J Gen Virol. 2009; 90:463-467.
5. FAO. Los polinizadores: su biodiversidad poco apreciada, pero importante para la alimentación y la agricultura. Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura 2008; Tratado IT/GB-3/09/Inf10. FAO. Febrero 2008. Disponible en: <http://www.planttreaty.org/sites/default/files/gb3i10s.pdf> Citado el: 10/10/12.

6. CHEN YP, SIEDE R. Honey Bee Viruses, *Advances in Virus Research*. 2007; 70:33-79.
7. CHEN YP, ZHAO Y, HAMMOND J, HSU H, EVANS J, FELDLAUFER M. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J Invertbr Pathol*. 2004c; 87:84-93.
8. SOMERVILLE D. Viruses of honey bees. *Primefacts* 2010; 997. Industry & Investment NSW. Citado en 11/01/12. Available on URL http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0020/321680/viruses-of-honey-bees.pdf and <http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/livestock/honey-bees/pests-diseases/viruses> www.INDUSTRY.NSW.GOV.AU
9. BALL BV, BAILEY L. Viruses. In: MORSE R, BLOTTUM K (Eds.) *Honey bee pests, predators and diseases*. 3rd Edition. Al Root; Medina Ohio, USA. 1997; 13-31.
10. ORGANIZACIÓN NACIONAL DE APICULTORES. Presentación del plan rector de la apicultura nacional. 2006 Organización Nacional de Apicultores (ONA). Citado el 16/02/12. Disponible en: http://www.funprover.org/formatos/normatividad/Planes%20Rectores/Apicultura/plan_final.pdf
11. ELLIS JD, MUNN P. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*. 2005; 86(4):88-101.

12. BAILEY L. The incidence of virus diseases in the honey bee. *Ann Appl Biol* 1967; 60: 43-48.
13. WILSON WT, NUNAMAKER RA, MAKI D. The occurrence of brood diseases and absence of the Varroa mite in honey bees from Mexico. *Am Bee J.* 1984; 124:51-53.
14. COX-FOSTER DL *et al.* A metagenomic survey of microbes in honey bee Colony Collapse Disorder. *Science* 2007; 318:283-287. Cited in: 17/9/12. Available on: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1146498>
15. HIGES M, MARTÍN-HERNÁNDEZ R, BOTÍAS C, GARRIDO BE, GONZÁLEZ-PORTO AV, BARRIOS L. *et al.* How naturally infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environm Microb.* 2008; Available on http://www.honeybee.org.au/pdf/Nosema_Ceranae_Environmental_Microbiology_2008.pdf Cited in: 13/10/12.
16. VANENGELSDORP D, SPEYBROECK N, EVANS JD, KIM BN, MULLIN C, FRAZIER M, *et al.* Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J Econ Entomol.* 2010; 103(5):1517-1523. Available on: <http://dx.doi.org/10.1603/EC09429> Citado el:15/11/12.
17. MAORI E, PALDI N, SHAFIR S, KALEV H, TSUR E, GLICK E, SELA I. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol Biol.* 2009; 18:55-60. Available on:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2583.2009.00847.x/pdf> Cited in:
25/10/12.

18. GUZMÁN-NOVOA E, HAMIDUZZAMAN MM, ARECHAVALETA VME, KOLEOGLU G, VALIZADEH P, CORREA-BENITEZ A. *Nosema ceranae* has parasitized Africanized honey bees in Mexico since at least 2004. *J Apic Res*. 2011; 50:167-169.
19. DE MIRANDA JR, GENERSCH E. Deformed wing virus. *J Invertbr Pathol* 2010; 103:S48-S61.
20. SANTILLÁN-GALICIA MT, BALL BV, CLARK SJ, ALDERSON PG. Transmission of deformed wing virus and slow paralysis virus to adult bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. *J Apic Res* 2010; 49:141-148. Available on: <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.01> Cited in: 12/11/12.
21. GENERSCH E, AUBERT M. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet Res* 2010; 41:54-74.
22. BAILEY L, CARPENTER JM, WOODS RD. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J Gen Virol* 1979; 43:641-647.
23. BAILEY L, BALL B. Honey bee pathology, 2nd ed. London: Academic Press, 1991.
24. CHEN YP, PETTIS JS, FELDLAUFER MF. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J Invertebr Patho* 2005b; 90:118–121.

25. RIBIÈRE M, BALL BV, AUBERT M. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In: Aubert, M. *et al.* (Eds.), *Virology and the Honey Bee*. European Communities. Luxembourg. 2008;15-84.
26. BALL BV. The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. *Exp Appl Acarol* 1983; 19: 607–613.
27. BOWEN-WALKER PL, MARTIN SJ, GUNN A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol.* 1999; 73: 101–106.
28. GAUTHIER L, TENTCHEVA D, TOURNAIRE M, DAINAT B, COUSSERANS F, COLIN ME, BERGOIN M. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 2007; 38:426-435.
29. CHEN YP, HIGGINS JA, FELDLAUFER MF. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol.* 2005a; 71:436-441.
30. MARTIN SJ, BALL B, CARRECK N. Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J Apic Res* 49; 2010: 72-79.
31. SUMPTER DJT, MARTIN SJ. The dynamics of virus epidemics in *Varroa* infested honey bee colonies. *J Anim Ecol* 2004; 73:51-63.

32. DAINAT B, KEN T, BERTHOUD H, NEUMANN P. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of honeybee viruses. *Insect Soc.* 2009; 56:40-43.
33. FORSGREN E, DE MIRANDA JR, ISAKSSON M, WEI S, FRIES I. Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Exp Appl Acarol.* 2009; pp:47, 87–97.
34. EYER M, CHEN YP, SCHÄFER, MO, PETTIS J, NEUMANN P. Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honeybee viruses. *Apidologie* 2008; 40:419-428. DOI:10.1051/apido:2008051.
35. NORDSTRÖM S. Virus infections and varroa mite infestations in honey bee colonies. Department of Entomology. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 2000; pp:1-74.
36. AUBERT MFA. Impact of virus infections in honey bees. In: Aubert, M. *et al.* (Eds.), *Virology and the Honey Bee*. European Communities, Luxembourg 2008; pp. 233–253.
37. CHIHU AD, ROJAS LM, RODRIGUEZ SR. Primer reporte en México del ácaro *Varroa jacobsoni* causante de la varroosis de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.). *Memorias del VI Seminario Americano de Apicultura*; 1992 septiembre 4-6; Oaxtepec (Morelos). México (D.F.) UNA, 1992; 9-11.
38. VÁZQUEZ CR. Resultados y perspectivas de la campaña nacional contra la varroosis de las abejas. *Memorias del XI Seminario Americano de Apicultura*;

- 1997 agosto 7-10; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Unión Nacional de Apicultores, 1997:83-90.
39. MEDINA ML. Frequency and infestation levels of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in managed honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Yucatan, Mexico. Am Bee J 1998;138:125-127.
40. MOORE NF, ELEY S M. Picornaviridae: picornaviruses of invertebrates, pp:371-386. In J. R. Adams and J. R. Bonami (eds.), Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton, Fla. International Committee on Taxonomy of Viruses. 1991. Available on: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>
41. GOVAN VA, LEAT N, ALLSOPP M, DAVISON S. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect infecting RNA viruses. Virology 2000; 277:457-463.
42. CHEN YP, EVANS JD, FELDLAUFER MF. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. J Invertebr Pathol 2006a; 92:152-159.
43. CARTER M, GENERSCH E. Molecular characterisation of honey bee viruses. In: Aubert, M. *et al.* (Eds.), Virology and the Honey Bee. European Communities. Luxembourg, 2008; 85-119.
44. CHEN YP, PETTIS JS, COLLINS A, FELDLAUFER MF. Prevalence and transmission of honey bee viruses. Appl Environ Microbiol. 2006b; 72:606-611.

45. FIEVET J, TENTCHEVA D, GAUTHIER L, DE MIRANDA J, COUSSERANS F, COLIN ME, BERGOIN M. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology J* 2006; 3:16.
46. YUE C, SCHRÖDER M, BIENEFELD K, GENERSCH E. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J Invertebr Pathol.* 2006; 92:93-96.
47. DE MIRANDA J. Diagnostic techniques for virus detection in honey bees. In: Aubert, M. *et al.* (Eds.), *Virology and the Honey Bee*. European Communities, Luxembourg. 2008; pp:121-232.
48. GREGORY PG, EVANS JD, RINDERER T, DE GUZMAN L. Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *J Insect Sci.* 2005; 5:1-5.
49. YANG X, COX-FOSTER D. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence of host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005; 102:7470-7475.
50. TENTCHEVA D, GAUTHIER L, JOUVE S, CANABADY-ROCHELLE L, DAINAT B, COUSSERANTS F, COLIN ME, BALL BV, BERGOIN M. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie.* 2004a; 35:431-439.

51. MUTINELLI F. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2011; 30:257-271.
52. CORREA-BENÍTEZ A, GRIS-VALLE AG. Enfermedades virales de las abejas adultas. En: Guzmán-Novoa E, Correa-Benítez A (Eds.). *Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas.* OIRSA-CONASA. Imagen Editorial Yire, México, DF. 2012.
53. MORITZ FA, EVANS JD. Honey bee genomics and breeding for resistance to virus infections. In: Aubert, M. *et al.* (Eds.), *Virology and the Honey Bee.* European Communities, 2008. Luxembourg, pp:347-370.
54. Gobierno del Distrito Federal. Decreto por el que se establece como área natural protegida, con categoría de zona de conservación ecológica, el área conocida con el nombre de "ECOGUARDAS". Gobierno del DF. *Gaceta Oficial del Distrito Federal.* 29 de noviembre de 2006; L:6-21. Citado el 5/10/12. Disponible en: http://www.sma.df.gob.mx/corena/descargas/conservacion_restauracion_recursos_naturales/anp/decretos/DECRETO_ANP_ZCE_ECOGUARDAS.pdf
55. SECRETARÍA DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. Áreas naturales protegidas. SEMARNAT 2010. Disponible en: http://www.semarnat.gob.mx/temas/ordenamientoecologico/Documents/bitacora_cuenca_valle_mexico/diagnostico_final%2022_marzo_3.pdf Citado el: 5/10/12.
56. HOLLAND PM, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'3' exonuclease

- activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88:7276-7280.
57. CHEN CYJ, JIN S, GOODWIN PH. An improved method for the isolation of total RNA from *Malva pusilla* tissues infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. J Phyto 2000; 148:57-60.
58. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning: A laboratory Manual (2nd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA. 2000.
59. TENTCHEVA D, GAUTHIER L, ZAPPULLA N, DAINAT B, COUSSERANS F, COLIN ME, BERGOIN M. Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France. Applied and environmental microbiology, 2004b; pp:7185-7191.
60. 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: 93-94. Available on: <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.13>
61. DI PRISCO G, ZHANG X, PENNACCHIO F, CAPRIO E, LI J, EVANS JD, DEGRANDI-HOFFMAN G, HAMILTON M, CHEN YP. Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees *Apis mellifera*. Viruses 2011; 3:2425-2441. Available on: <http://dx.doi.org/10.3390/v3122425> Citado el 20/11/12.