



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

***Varroa destructor* EN MÉXICO: VARIACIÓN GENÉTICA, PATOGENICIDAD E INFLUENCIA EN LA REPLICACIÓN DE VIRUS EN ABEJAS MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.) AFRICANIZADAS.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:
KARLA MARIANA REYES QUINTANA**

TUTORA PRINCIPAL:

**LAURA GUADALUPE ESPINOSA MONTAÑO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

COMITÉ TUTORAL:

**ERNESTO GUZMÁN NOVOA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2015



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, María I. Quintana Hernández y Carlos A. Reyes Gutiérrez, gracias por el amor, el apoyo, los consejos y la comprensión. Los amo mucho. Cada logro, cada meta, cada sueño es por, y para ustedes.

A mi hermana Irma Gabriela Reyes Quintana, por siempre estar a mi lado y por tu apoyo incondicional. Eres un gran ejemplo de vida. Te amo.

A mi sobrino Leonardo Barros Reyes, eres la luz de mis días. Te amo mucho pequeñito.

A mis abuelos Liduvina Hernández de Alarcón y José Benito Quintana Ramírez, por siempre estar a mi lado, por todo su amor y apoyo incondicional. Los amo con todo mi corazón.

Dedicatoria especial

A la Dra. Laura Guadalupe Espinosa Montaña, quien además de fungir como mi asesora principal, es una entrañable amiga. Gracias a usted me inicié en el mundo de las abejas. Gracias a su apoyo, consejos y guía he alcanzado cada una de mis metas. Le dedico con mucho cariño este trabajo, y le agradezco el tiempo que le dedicó a este proyecto.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A mi tutora principal, Laura Guadalupe Espinosa Montaña, y a mi comité tutorial, Ernesto Guzmán Novoa y Rogelio A. Alonso Morales, por el apoyo durante la realización de este proyecto.

Al Departamento de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, y a todo su personal.

Al Centro de Educación Ambiental Acuexcomatl de la Ciudad de México por las instalaciones prestadas.

A los apicultores Don Nicolás, Valentín, Alberto Bonilla, Marco A. Muñoz, Ángel López, por las colmenas prestadas para la toma de muestras.

Al Centro de Investigación Apícola de la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá, y a su personal Paul Kelly y Nancy Bradbury por el apoyo incondicional.

Al Equipo de Transferencia de Tecnología de la Asociación de Apicultores de Ontario, Canadá, por el apoyo en la toma de muestras.

Al PhD. Paul Goodwin y al PhD. Tom Hsiang de la Universidad de Guelph, por el apoyo y las sugerencias.

Al PhD. Mollah Hamiduzzaman por el apoyo en el laboratorio de la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá.

Al M en C Daniel Prieto Merlos, por tu apoyo, por la amistad, por tu confianza y por los ánimos para seguir adelante.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Daniel Borges y Brenda Adriana Ríos por su colaboración.

A mis amigos Les Eccles, Raquel Mijares y David Stotesbury por su gran amistad y por el apoyo.

A Gün Köleoğlu por tu amistad, los consejos y la hospitalidad.

A mi entrañable amiga Ninnet E. Gómez Romero, por tu apoyo incondicional y por tu inmenso amor. Gracias por siempre estar.

Al personal del Posgrado de Producción Animal y de la Salud Animal, por el trato amable y el apoyo.

Resumen

El ectoparásito *Varroa destructor* es considerado uno de los principales factores que afecta la longevidad y salud de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) en el mundo, pero se especula que su patogenicidad y virulencia varía con el genotipo del parásito y el de la abeja. *V.destructor* también transmite virus a las abejas pero poco se sabe sobre cómo influye en su replicación en abejas de clima tropical y templado. Con el objetivo de analizar el impacto que tiene el ácaro en las abejas melíferas africanizadas en México, se realizaron tres estudios: 1) se identificaron las variantes genéticas de *V. destructor* presentes en dos regiones apícolas de México, tropical y templado, y se compararon con los de la provincia de Ontario en Canadá, mediante la determinación del haplotipo del ADN mitocondrial con *RFLPs*, así como por secuenciación de dos regiones del genoma mitocondrial. Además se evaluó la genotipificación de microsatélites. Sólo se encontró el haplotipo mitocondrial coreano en las abejas africanizadas y europeas en ambos países; 2) se evaluó el efecto del ácaro en la emergencia y supervivencia de crías y abejas obreras adultas, infestadas artificialmente en comparación con abejas no infestadas. El número de abejas obreras infestadas que lograron emerger fue significativamente menor en comparación con dos grupos testigos de abejas no infestadas. La mortalidad de la cría de abejas infestadas fue del 31% contra 15% y 4% de los grupos testigo de abejas no infestadas ($P < 0.0001$). Las obreras adultas parasitadas no vivieron más de 23 días, mientras que las abejas no infestadas lograron sobrevivir hasta 40 días *post* emergencia; 3) finalmente se realizó un análisis del papel que tiene *V. destructor* en la transmisión y replicación de diversos virus en la cría y abejas adultas africanizadas (México) y europeas (Canadá). Las abejas fueron inyectadas con homogenizado de varroas e infestadas artificialmente con ácaros, en comparación a un grupo testigo. Se extrajo el ARN total de las abejas de cada grupo experimental, se sintetizó el ADN complementario, y se realizaron PCR de transcripción reversa para detectar virus en los diferentes tratamientos, co-amplificando el gen doméstico *RpS5* de *A. mellifera* para realizar cuantificaciones relativas. Pruebas de *t* de *student* y análisis de covarianza mostraron que las abejas africanizadas y las abejas europeas manifestaron respuestas diferenciadas en cuanto a la replicación relativa de los virus analizados (virus de las alas deformes, virus de las celdas reales negras, virus Israelí de la parálisis aguda y virus de la cría ensacada), sugiriendo resistencia temporal relativa en abejas africanizadas.

Varroa destructor, abejas africanizadas, abejas europeas, haplotipos, supervivencia, mortalidad, virus, PCR cuantitativa relativa, *RFLPs*, microsatélites, ADN mitocondrial

Abstract

The ectoparasitic mite *Varroa destructor* is considered one of the main factors affecting the life span and health of honey bees (*Apis mellifera*) worldwide, but it is speculated that its pathogenicity and virulence varies depending on the genotype of the parasite and of the bee. *V. destructor* transmits viruses to bees but little is known about how it influences their replication in tropical and temperate bees. Three studies were conducted to analyze the impact the mite has on Africanized honey bees in Mexico: 1) genetic variants of *V. destructor* present in two regions of Mexico, tropical and temperate climate, were identified and compared with those of the province of Ontario, in Canada, by determining the haplotype of mitochondrial DNA using RFLPs and by sequencing two regions of the mitochondrial genome. In addition, microsatellite genotyping was performed. Only the Korean mitochondrial haplotype was found in Africanized and European bees in both countries; 2) the mite's effect on the emergency and survival of pupae and adult worker bees that were artificially infested was assessed and compared to non-infested bees. The number of infested workers that emerged was significantly lower compared to two control groups of non-infested bees. The mortality of infested brood was 31% versus 15% and 4% from two control groups of non-infested bees ($P < 0.0001$). Adult parasitized workers did not live more than 23 days, whereas non-infested bees survived up to 40 days post-emergence; 3) finally, an analysis of the role that *V. destructor* plays in the transmission and replication of various viruses in Africanized (Mexico) and European (Canada) brood and adult worker bees, was performed. The bees were injected with varroa homogenate and were artificially infested with varroa mites compared to a control group. Total RNA of bees from each experimental group was extracted, complementary DNA was synthesized, and relative RT-PCR were performed to detect viruses from the different treatments, co-amplifying the housekeeping gene *RpS5* of *A. mellifera* for relative quantifications. *Student's t* tests and analyses of covariance showed that Africanized and European bees differentially increased loads of some of the analyzed viruses (deformed wing virus, black queen cell virus, Israeli acute paralysis virus and sacbrood bee virus), suggesting temporal relative resistance in Africanized bees.

Varroa destructor, Africanized bees, European bees, haplotypes, survival, mortality, virus, RT-PCR, RFLPs, microsatellites, mtDNA

Tabla de contenido

Dedicatorias	I
Agradecimientos	III
Resumen	IV
<i>Abstract</i>	V
Lista de figuras	VIII
Lista de cuadros	X
Revisión de literatura	1
Problemas de salud en <i>Apis mellifera</i>	2
Justificación	8
Objetivos	9
Capítulo I. Variación genética del ácaro <i>Varroa destructor</i> A. basada en el análisis de RFLPs, microsatélites y secuenciación de dos regiones del ADN mitocondrial	10
Introducción	10
Marcadores moleculares	13
Microsatélites	14
<i>RFLPs</i>	16
Marcadores de ADN mitocondrial	17
Marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética de ácaros	17
Estudio de la variación genética de <i>Varroa destructor</i> A.	19
Hipótesis	24
Objetivo	24
Material y Métodos	25
Área de estudio	25
Obtención de ácaros	25
Extracción de ADN	27
Análisis con <i>RFLPs</i>	29
Amplificación de ADN por PCR	29
Iniciadores	30
Condiciones de la PCR	30
Enzima de restricción	30
Análisis con microsatélites	30
Amplificación de ADN por PCR	31
Electroforesis	32
Base de datos	32
Selección y amplificación de dos fragmentos del ADNmt de <i>V. destructor</i>	33
Iniciadores	35
Condiciones de la PCR	35
Electroforesis	36
Purificación ADN	36
Secuenciación	38
Análisis filogenético	39
Resultados	40
<i>RFLPS</i>	40
Microsatélites	40
Fragmentos amplificados del ADN mitocondrial	41
Discusión	47
Capítulo II. Efecto del ácaro parasitario <i>Varroa destructor</i> A. en el desarrollo y tiempo de vida de abejas melíferas africanizadas	57
Introducción	57
Hipótesis	63
Objetivo	63
Material y Métodos	64
Área de estudio	64
Colonias altamente infestadas de <i>V. destructor</i>	64

Colonias libres de <i>V. destructor</i>	64
Obtención de ácaros	65
Grupos experimentales	65
Panales con malla y jaulas	67
Análisis estadístico	70
Resultados	71
Efecto de <i>V. destructor</i> en la sobrevivencia de cría de abejas obreras	71
Efecto de <i>V. destructor</i> en la sobrevivencia de abejas obreras adultas	71
Efecto de <i>V. destructor</i> en las alas de abejas obreras adultas	74
Discusión	75
Capítulo III. Replicación viral en abejas melíferas (<i>Apis mellifera</i> L.) africanizadas y europeas en respuesta al parasitismo por <i>Varroa destructor</i> A. o a su transmisión mecánica	85
Introducción	85
Virus de las abejas melíferas	86
Virus de las alas deformes	87
Virus de las celdas reales negras	88
Virus de la cría ensacada	90
Virus Israelí de la parálisis aguda	91
Hipótesis	94
Objetivo	94
Material y Métodos	95
Área de estudio	95
Preparación de las colonias experimentales	95
Obtención de ácaros	96
Preparación de homogenizado	96
Tratamientos	97
Jaulas	98
Muestreo post tratamiento	99
Extracción de ARN	100
Bibliotecas de ADNc	101
Gen constitutivo e iniciadores	103
PCR cuantitativa relativa	104
Electroforesis y cuantificación de los productos de PCR	105
Análisis estadístico	106
Resultados	107
Virus de Cachemira y virus de la parálisis aguda	107
Virus de las alas deformes – abejas adultas	107
Virus de las alas deformes – cría de abejas	108
Virus de las celdas reales negras – abejas adultas	110
Virus de las celdas reales negras – cría de abejas	111
Virus de la cría ensacada – abejas adultas	113
Virus de la cría ensacada – cría de abejas	113
Virus Israelí de la parálisis aguda – abejas adultas	114
Virus Israelí de la parálisis aguda – cría de abejas	115
Discusión	117
Discusión general	125
Referencias	132
Lista de abreviaturas	144
Anexos	146

Lista de figuras.

Figura 1. Alineamiento de las secuencias de dos fragmentos distintos del genoma mitocondrial de <i>Varroa destructor</i> A.	34
Figura 2. Perfil de restricción de una región de CO-I del genoma mitocondrial de Ácaros de <i>Varroa destructor</i> A.	40
Figura 3. Dendrograma para las muestras de ácaros de México y Canadá basado en los resultados obtenidos por medio del análisis de los microsatélites.	41
Figura 4. Relaciones filogenéticas, para el gen <i>cytb</i> , entre diferentes haplotipos de <i>Varroa destructor</i> colectados en México y Canadá y otros haplotipos, con <i>Ixodes ricinus</i> como grupo externo.	44
Figura 5. Relaciones filogenéticas, para el gen <i>cytb</i> , entre diferentes haplotipos de <i>Varroa destructor</i> colectados en México y Canadá, y otros haplotipos, con <i>Thitarodes gonggaensis</i> como grupo externo.	45
Figura 6. Relaciones filogenéticas, para el gen <i>cytII-ATP</i> , entre diferentes haplotipos de <i>Varroa destructor</i> colectados en México y Canadá, y otros haplotipos, con <i>Ixodes ricinus</i> como grupo externo.	46
Figura 7. Relaciones filogenéticas, para el gen <i>cytII-ATP</i> , entre diferentes haplotipos de <i>Varroa destructor</i> colectados en México y Canadá, y otros haplotipos, con <i>Thitarodes gonggaensis</i> como grupo externo.	46
Figura 8. Panal con celdas operculadas.	67
Figura 9. Panal con mallas que delimitan el área de celdas experimentales.	68
Figura 10. Jaula de encierro.	69
Figura 11. Porcentaje promedio de sobrevivencia abejas obreras.	73
Figura 12. Vida media en días de abejas emergidas de celdas infestadas con ácaros de <i>V. destructor</i> y de abejas testigo no infestadas.	73
Figura 13. Comparación en la morfología de dos abejas obreras africanizadas.	82
Figura 14. Abejas obreras adultas con daños morfológicos ocasionados por la parasitosis de <i>V. destructor</i> .	83
Figura 15. Amplificación del virus de las celdas reales negras en abejas adultas y el gen doméstico <i>Rps5</i> de <i>Apis mellifera</i> .	104
Figura 16. Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del virus de las alas deformes.	110

Figura 17. Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del virus de las celdas reales negras. 112

Figura 18. Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del virus de la cría ensacada. 114

Figura 19. Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del virus Israelí de la parálisis aguda. 116

Lista de cuadros.

Cuadro 1. Técnicas para medir polimorfismos genéticos en ácaros; ventajas y desventajas.	18
Cuadro 2. Procedencia e identificación de los ácaros de <i>V. destructor</i> colectados en dos regiones de México y tres localidades de Ontario, Canadá para su análisis genético	26
Cuadro 3. Características de los microsatélites utilizados en el análisis de la variación genética de <i>Varroa destructor</i> .	31
Cuadro 4. Números de acceso de las secuencias de referencia obtenidas a partir del <i>blastn</i> generado para los fragmentos amplificados del genoma mitocondrial de varroa	38
Cuadro 5. Número y proporción de abejas obreras emergidas de celdas infestadas y no infestadas con ácaros de <i>V. destructor</i> .	71
Cuadro 6. Número y proporción de abejas obreras emergidas de celdas infestadas y no infestadas con ácaros de <i>V. destructor</i> que tenían las alas deformes.	74

Revisión de literatura

Gracias a que México cuenta con una alta diversidad de flora, la apicultura es una de las principales actividades económicas ya que ubica al país dentro de los primeros 10 países productores y dentro de los primeros cinco países exportadores de miel en el mundo (FAOSTAT 2012). La historia del cultivo de la miel en el país comienza en la época prehispánica con las abejas meliponas (sin aguijón), siendo la Península de Yucatán la cuna de la meliponicultura. Posteriormente, *Apis mellifera* llegó a la Nueva España vía Norteamérica gracias a los colonos europeos, y así poco a poco se fue introduciendo a más territorios del continente. La llegada de la abeja melífera a Centroamérica y Sudamérica se da en Uruguay y Chile en los siglos XIX y XX; luego en Argentina, Bolivia y Yucatán. Así, la apicultura moderna en México inició a principios del siglo XX con la abeja europea, *Apis mellifera*, y el uso de la tecnología de colmenas con marcos móviles (Correa-Benítez 2004; Ortega y Ochoa 2004).

Actualmente en México, la producción nacional de miel alcanza las 58,602 toneladas anuales en promedio, lo que ubica al país como el octavo productor (FAOSTAT 2012) y el tercer exportador de miel en el mundo, con 26,888 toneladas (FAOSTAT 2012). Casi 40% de la miel es producida en los estados de la Península de Yucatán; mientras que el Distrito Federal y los estados de Chiapas, Baja California Sur, Guerrero, Colima, Jalisco, Nayarit, Chihuahua, Nuevo León y Veracruz complementan el esquema productivo del país. Esta actividad económica beneficia a más de 40,000 productores lo cuales de acuerdo a registros oficiales poseen 1,858,000 colmenas (FAOSTAT 2013). Esta situación ha permitido que la apicultura mexicana genere divisas por 56 millones de dólares anuales, ubicando a la actividad en la tercera posición dentro del subsector pecuario, como generadora de divisas. Según información del 2013 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México exporta casi el 47% de su producción principalmente a países europeos (FAOSTAT 2013).

Hay que destacar que la producción de miel y otros subproductos no son el beneficio más importante proporcionado por las abejas. La producción de alimentos a nivel mundial y la biodiversidad terrestre dependen en gran medida de la polinización, proceso natural que permite que se fecunden las flores para así obtener frutos y semillas. Las abejas, y otros insectos como mariposas y abejorros, son algunos de los responsables de este proceso. Alrededor del 90 % de la flora silvestre requiere de la polinización mediada por insectos polinizadores para reproducirse (Ollerton *et al.* 2011). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) calcula que, de unas 100 especies de cultivo que proporcionan el 90 % del alimento en el mundo, 71 se polinizan gracias a las abejas (UNEP 2010). El cálculo más reciente del beneficio económico global de la polinización asciende a un total de 265 mil millones de euros en productividad gracias a esta actividad (UNEP 2010). Es por esto que las abejas melíferas son consideradas una de las especies claves en los ecosistemas, ya que una tercera parte del alimento que consumen los seres humanos proviene directa o indirectamente de los servicios de polinización que éstas ofrecen, por lo que son de gran importancia a nivel agrícola y económico. Se considera que el estado de salud de las abejas da un indicio sobre la condición del medioambiente, por lo que las marcadas disminuciones o pérdidas en las poblaciones de abejas melíferas alrededor del mundo han tenido como consecuencia un cambio en el suministro y en la demanda de los servicios de polinización. Esto ha provocado un impacto tanto de tipo económico (con secuelas en la producción de cultivos agrícolas) como de tipo ecológico (con consecuencias en la biodiversidad de plantas), así como en la salud humana (Jones *et al.* 2008; Waage y Mumford 2008).

Problemas de salud en *Apis mellifera*

Desgraciadamente las poblaciones de abejas melíferas están disminuyendo en grandes cantidades y a una velocidad relativamente rápida en muchos países. En los Estados Unidos, por ejemplo, el Servicio Nacional de Estadística Agraria (NASS por sus siglas en inglés) reporta una disminución de 6 millones de colmenas en 1974 a 2.4 millones de colmenas en 2008; es decir, una reducción

del 60%. Estudios preliminares de la 8va encuesta nacional anual de la pérdida de colonias de abejas de los Estados Unidos, llevada a cabo por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (*USDA* por sus siglas en inglés) y por los Inspectores de Apiarios de América (*AIA* por sus siglas en inglés), indican que murieron 20% de todas las colonias de abejas que existieron entre abril y octubre del 2013. Los apicultores de dicho país reportaron la pérdida de 34.2% de las 670,568 colonias manejadas entre abril del 2013 y abril del 2014 (beeinformed.org) (página web consultada en mayo 2015).

Algunos de los factores que amenazan a estos polinizadores son la pérdida de hábitats, las prácticas de la agricultura industrializada como los monocultivos (menor disponibilidad y diversidad de alimento para estos insectos) (Brodschneider y Crailsheim 2010; Di Pasquale *et al.* 2013), el uso de plaguicidas, la presencia de parásitos y enfermedades, la existencia de especies vegetales y animales invasores a la redonda de los apiarios, y los impactos producidos por el cambio climático (Downey y Winston 2001; Martin 2001; Le Conte y Navajas, 2008; Alaux *et al.* 2010; Le Conte *et al.* 2010).

A inicios del otoño del 2006, la industria apícola norteamericana empezó a registrar una gran pérdida de colonias de abejas melíferas y la(s) causa(s) de esto se desconocía(n). Dicho fenómeno se denominó con el nombre de Síndrome del Colapso de las Colonias o SCC (*CCD* por sus siglas en inglés), el cual se caracteriza por la ausencia de abejas muertas dentro de la colmena o a sus alrededores, la presencia de cría abundante así como de miel y polen, y una evidente disminución en la población de abejas obreras adultas (Van Engelsdorp *et al.* 2007, 2008, 2011). Existen muchas hipótesis respecto a la(s) causa(s) de la disminución en las poblaciones de abejas. Se sabe que están involucrados factores naturales como parásitos (ácaros), patógenos (hongos, bacterias y virus), y factores antropogénicos como el aumento en la exposición a pesticidas e insecticidas en los cultivos, desequilibrios nutricionales y pérdida de hábitats, entre otros (Gifford 2011; USDA 2012).

Los insecticidas parecen ser el riesgo más directo para los polinizadores ya que se trata de sustancias químicas diseñadas para matar insectos. Son aplicados ampliamente en el medio ambiente, en torno a los cultivos y en altas concentraciones en los sistemas de agricultura intensiva, lo cual ocasiona claros efectos negativos en la salud de los polinizadores, tanto a nivel individual como a nivel de colonia (Mullin *et al.* 2010; Gifford 2011; Gill *et al.* 2012). Los efectos subletales observados en dosis bajas de insecticidas en las abejas son varios y diversos. Se pueden clasificar en: 1) efectos fisiológicos de distintos niveles que se han medido en términos de tasas de desarrollo (el tiempo requerido para alcanzar la edad adulta) y malformaciones (alteraciones morfológicas de las crías que se encuentran en desarrollo en el interior de las celdas de los panales), 2) alteración del patrón de pecoreo con efectos evidentes en el aprendizaje y la orientación de las abejas, 3) interferencias en el comportamiento de alimentación con efectos como su inhibición o la reducción de la capacidad olfativa, 4) impacto de los plaguicidas neurotóxicos en los procesos de aprendizaje que se han constatado al observar problemas en el reconocimiento de flores y colmenas, así como en la orientación espacial (Decourtye *et al.* 2005; Mullin *et al.* 2010; Henry *et al.* 2012).

Existen estudios recientes que señalan a los insecticidas, principalmente los que pertenecen a la familia de los neonicotinoides (Alux *et al.* 2010; Blacquiere *et al.* 2012; Van der Sluijs *et al.* 2013; Laurino *et al.* 2013), y al sinergismo entre el ácaro *Varroa destructor* A. con una gama de virus que aquejan a las abejas melíferas, así como a los microsporidios (*Nosema* spp.) como los principales factores del SCC (Higes *et al.* 2007; Cox-Foster *et al.* 2007; Van Engelsdorp *et al.* 2009; Belzunces *et al.* 2012; Henry *et al.* 2012; Van der Sluijs *et al.* 2013). Algunos de los virus involucrados en el SCC son el virus de las alas deformes, el virus Israelí de la parálisis aguda, el virus de la cría ensacada y el virus de Cachemira; (VAD, VIPA, VCE y VC, respectivamente). Cox-Foster *et al.* (2007) compararon la microflora de colonias de abejas melíferas diagnosticadas con el SCC y de colonias aparentemente sanas, evaluando diversos patógenos que se relacionan con dicho síndrome, y demostraron la presencia del virus de Cachemira, el virus

de las alas deformes y dos especies de *Nosema*. De acuerdo a los resultados obtenidos concluyeron que la alta prevalencia de múltiples patógenos involucrados en el SCC sugiere que el sistema inmune de las abejas se ve comprometido, haciendo de este síndrome un problema multifactorial.

Las abejas cuentan con diferentes mecanismos de defensa que les permiten desarrollar resistencia a las enfermedades, como a la ectoparasitosis por varroa, y limitar su impacto. Las vías clásicas de resistencia a patógenos involucran procesos de tipo mecánico (cutícula del insecto y epitelios), fisiológicos (cambios de pH), inmunológicos (hemocitos y péptidos antimicrobianos) (Lavine y Strand 2002; Evans *et al.* 2006; Evans y Spivak 2010; Evans y Schwarz 2011), así como factores conductuales como el comportamiento higiénico (Rothenbuhler 1964) y el comportamiento de acicalamiento (Büchler *et al.* 1992; Flores *et al.* 1998).

Un elemento de tipo medioambiental en la regulación del impacto del ácaro *V. destructor* sobre las abejas melíferas es el clima. En climas templados las abejas melíferas llegan a alcanzar niveles de infestación más altos en comparación a climas tropicales, como en Brasil donde el ácaro alcanza niveles bajos de infestación y no causa daños serios a las colonias de abejas (Ritter y de Jong 1984; De Jong *et al.* 1984; Moretto *et al.* 1991). Otro factor que influye en la resistencia a la varroasis es la raza (Camazine 1986) y especie de abeja afectada, la cual parece influenciar en la dinámica de la población del ácaro. Peng *et al.* (1987) demostraron que al infestar artificialmente a abejas obreras de *Apis cerana*, el 99.6% de las obreras fueron capaces de identificar y remover al ácaro de sus cuerpos. También se han reportado diferencias genéticas en la tolerancia de las abejas al ácaro. Es bien sabido que las abejas africanizadas son significativamente menos susceptibles a ser infestadas que las abejas europeas pero no está totalmente claro a qué se debe ésta resistencia (Guzman-Novoa 1996; Arechavaleta y Guzmán-Novoa 2001; Mondragón *et al.* 2005). Moretto *et al.* (1993) observaron que abejas obreras italianas (europeas) fueron menos efectivas

en remover al ácaro de sus cuerpos en comparación a abejas africanizadas, las cuales fueron siete veces más eficientes.

Otro de los factores que pudiera influir en el impacto del ácaro *V. destructor* sobre las colonias de abejas melíferas es el genotipo del ácaro. Existen diversos estudios que evidencian el alto impacto que tiene este ácaro en la pérdida de colonias de abejas en Europa, Norteamérica, Sudamérica, África y Asia (Dahle 2010; Genersch *et al.* 2010; Guzmán-Novoa *et al.* 2010; Topolska *et al.* 2010, Van Engelsdorp *et al.* 2011). Actualmente se sabe que existe una alta diversidad de especies y linajes de varroas que son específicas a una determinada raza de abejas (Rosenkranz *et al.* 2010). Las asociaciones que se han descrito entre huésped-parásito se pueden deber a factores biogeográficos o a diferencias en la habilidad de los ácaros de reproducirse en diferentes especies, linajes y castas de abejas melíferas (Anderson y Trueman 2000; Warrit *et al.* 2006; Navajas *et al.* 2010).

Mediante varios estudios basados en marcadores moleculares se han identificado dos haplotipos de *V. destructor* que parasitan exitosamente a la abeja melífera occidental (Anderson y Trueman 2000), el japonés y el coreano, siendo este último el que aparentemente manifiesta un mayor grado de virulencia hacia las abejas melíferas (Delfinado-Baker 1988; de Guzman y Rinderer 1999a; de Guzman *et al.* 1999b; Oldroyd 1999; Vetharanim y Barlow 2006; Rosenkranz *et al.* 2010). Los ácaros de *V. destructor* que pertenecen al haplotipo coreano parasitan *A. mellifera* a nivel mundial y están aislados reproductivamente de los haplotipos de *V. jacobsoni* (Anderson y Trueman 2000). El haplotipo japonés de *V. destructor* también parasita a *A. mellifera* pero su presencia se ha reportado sólo en Japón, Tailandia, Norteamérica y Sudamérica (Anderson y Trueman 2000; de Guzman *et al.* 1998; Muñoz *et al.* 2008, Rosenkranz *et al.* 2010).

Por otro lado, visto desde el punto de vista co-evolutivo, se podría decir que *V. destructor* es un parásito, relativamente nuevo, que afecta a *A. mellifera* y la

pérdida de colonias de abejas se cree que se debe a que el huésped no está bien adaptado a este. En contraste, *A. cerana* que es el huésped original de *V. destructor*, sí está adaptado al ácaro gracias a una larga co-existencia de ambos (Oldroyd 1999; Anderson y Trueman 2000) por lo que la abeja de oriente se ve menos afectada por la presencia del ácaro.

Como se mencionó anteriormente, los daños provocados por *V. destructor* cursan junto con otros padecimientos patológicos. Aunado a todos los daños a nivel morfológico y fisiológico que provoca este parásito en las abejas melíferas, existen muy pocos estudios sobre la patogenicidad de los genotipos del ácaro y de su efecto sobre el desarrollo, sobrevivencia y longevidad de las abejas, en particular de las africanizadas. Además, se desconoce si las abejas africanizadas son o no más resistentes que las europeas a infecciones virales transmitidas por el parásito. Por eso, se requieren estudios que evidencien el genotipo e impacto de *V. destructor* en el desarrollo, supervivencia, longevidad y resistencia a virus de las abejas melíferas africanizadas.

JUSTIFICACIÓN

A la fecha, se desconocen los genotipos de *V. destructor* que existen en colonias de abejas melíferas en México. La determinación de estos genotipos presentes en regiones apícolas, tropicales y templadas, en México, podría explicar por qué algunas colonias de abejas melíferas son más susceptibles al parasitismo del ácaro que otras.

Debido a que en México existen abejas africanizadas y a que hay pocos estudios sobre el impacto de *V. destructor* en el desarrollo y tiempo de vida de este tipo de abejas, es importante investigar el efecto de su parasitismo en la supervivencia de las crías y en la longevidad de las abejas africanizadas.

Se sabe que las abejas africanizadas son más resistentes que las europeas a la infestación por *V. destructor*, pero no se sabe si también son más resistentes a las infecciones virales que el ácaro transmite. Un factor desconocido de la asociación *V. destructor*-virus-abeja, es si el ácaro influye en la replicación viral de manera diferente entre abejas africanizadas y abejas europeas.

Por lo anterior se realizó la presente investigación que se dividió por capítulos para facilitar su lectura.

Objetivos

Objetivo general

Determinar qué genotipo(s) del ácaro *Varroa destructor* existe(n) en dos regiones de importancia apícola en México, así como el efecto de su parasitismo en el tiempo de vida, y en la replicación de virus de abejas melíferas africanizadas.

Objetivos particulares

1. Determinar qué genotipo(s) de *Varroa destructor* existe(n) en dos regiones apícolas de México, una tropical y una templada, y compararlos con los encontrados en la provincia de Ontario, Canadá.
2. Investigar el efecto del parasitismo de *Varroa destructor* sobre el desarrollo y tiempo de vida de abejas melíferas africanizadas en México.
3. Establecer si el ácaro *Varroa destructor* favorece la replicación diferenciada de virus en abejas melíferas africanizadas en comparación con abejas europeas.

CAPÍTULO I

Variación genética del ácaro *Varroa destructor* A. basada en la secuenciación de dos regiones del ADN mitocondrial, análisis de RFLP's, y evaluación de microsatélites a partir de abejas africanizadas y europeas.

Introducción

La diversidad genética se refiere a la variación de los genes en las especies, ya sea entre especies, entre poblaciones de una especie en particular o dentro de una población de la misma especie. La diversidad genética permite mantener un reservorio de variaciones que pueden interactuar con el medio para favorecer o no, la adaptación y supervivencia de los organismos. Aquellos genes que se encargan del control de los procesos bioquímicos que son fundamentales para la vida serán conservados y experimentarán muy poca variación al paso del tiempo. Sin embargo, la variación que pudieran presentar es capaz de provocar un fuerte impacto sobre la viabilidad de un organismo. En cambio, aquellos genes cuya función no es de vital importancia, la variación de mutaciones será mayor en número y frecuencia (Lewin 2003; Griffiths *et al.* 2008).

Las variaciones genéticas que se van manifestando en un organismo provienen de mutaciones que se expresan en sus genes y cromosomas. Éstas se pueden heredar en aquellos organismos que se reproducen sexualmente, por medio de la recombinación genética, aunque también se heredan en organismos asexuados. La importancia de la variación genética recae en el hecho de que mediante ésta se permiten cambios evolutivos que están basados en la reproducción selectiva. Su importancia radica en el hecho de que a través de la selección natural o por medio de programas de crianza selectiva artificial, aumenta la frecuencia de aquellas características que permiten a los organismos ser más aptos en el medio en que se desarrollan, lo que se manifiesta por medio de una

mayor adaptación, reproducción, productividad, resistencia a enfermedades, etc. (Lewin 2003; Griffiths *et al.* 2008).

La deriva genética es una fuerza evolutiva que, junto con la selección natural, cambia las características de las especies en un periodo de tiempo largo. Altera la frecuencia de los alelos y la predominancia de los caracteres sobre los individuos de una población, resultando en un cambio de la diversidad genética. Tiende a formar poblaciones homocigóticas debido a que en cada población los alelos que se pierden o se fijan pueden ser diferentes; es así como dos o más poblaciones de una misma especie pudieran llegar a diferenciarse genéticamente. Cuando la deriva genética se presenta, un alelo podría ser eliminado de una población sin importar si es de carácter benéfico o perjudicial, disminuyendo su frecuencia debido a que el alelo puede actuar en favor o en contra de la selección. Su importancia se ve reflejada en lo que se conoce como efecto de cuello de botella y el efecto fundador. El cuello de botella se presenta cuando una población se reduce a la presencia de pocos individuos, sin relación alguna con la selección natural, debido a fluctuaciones del ambiente. Se da una pérdida de la variabilidad genética de las poblaciones si en éstas se llega a reducir el número de sus individuos. Por otro lado, el efecto fundador se da cuando de una población grande, ubicada en una determinada zona geográfica, se separa una población de menor tamaño y sólo pocos fundadores colonizan una nueva región. Las frecuencias alélicas en la nueva población van a ser muy distintas de las que se presentaban en la población original y la composición genética cambiará conforme la población vaya aumentando de tamaño, pero siempre será diferente de la población original (Hamilton 2009).

Otro factor que influye en el intercambio de genes entre poblaciones es la migración de individuos. Cuando dos poblaciones difieren en la frecuencia de los alelos de algunos genes, el intercambio de individuos entre poblaciones provocará un cambio en las frecuencias de los genes de cada población. Cuando dos poblaciones o especies se separan, el número de variantes genéticas que las

separan es proporcional al tiempo que transcurrió desde que divergieron las dos especies o poblaciones. El número de variantes que se presentan entre un conjunto de secuencias que corresponden a distintas especies se puede usar como “reloj molecular” lo que permitirá establecer los tiempos relativos a la divergencia entre especies y de la ramificación de su evolución (Hamilton 2009).

La evolución ocurre gracias a la variación genética y la fuente de esta variación son las mutaciones. Las mutaciones son cambios heredables en las bases del ADN de los organismos que resultan en un incremento de la diversidad genética. Las mutaciones provocan que se presenten alteraciones en la secuencia del ADN, lo que tiene como consecuencia la manifestación de nuevas variantes que pueden mantenerse en los organismos o que, por lo general, son eliminadas. Cuando la tasa de mutación es alta se puede decir que el potencial de adaptación al ambiente es mayor, ya que se presentan más variantes genéticas, lo que tiene como consecuencia que aquellas sean más apropiadas se adapten a los retos ambientales y permanezcan en la población. Sin embargo, un alto número de mutaciones puede ser nocivo o inducir deleciones en los organismos, provocando que su adaptación no sea eficiente y se extingan. Debido a que las mutaciones son cambios al azar, es decir que no hay nada que las “dirija” hacia un fenotipo u otro, pueden provocar que los genes pierdan su función, por lo que la mayoría de éstas son de tipo deletéreas. No obstante, estos cambios también pueden provocar que se manifiesten nuevas funciones. La tasa de mutación de cada especie es propia de ella y es modulada por la selección natural, la cual permite que las especies puedan hacerle frente eficientemente a aquellos retos o cambios impuestos por el ambiente que los rodea (Lewin 2003).

Las fuentes de variación en una población se deben a: a) diferencias en el genotipo (ADN) y pueden ser heredables, b) diferencias en el ambiente (afectadas por condiciones ambientales; pueden mantenerse o eliminarse durante la vida de un organismo), c) efectos de interacción genotipo-medioambiente, d) efectos

maternos (determinados por la fisiología y comportamiento de la madre durante la gestación o crianza, o por el medio ambiente) (Schleif 1993; Hamilton 2009).

Los tipos de mutaciones pueden ser:

- 1) Mutaciones puntuales; pueden provocar errores al azar durante la síntesis de ADN o errores al reparar daños en el ADN por radiación de alta frecuencia o químicos mutagénicos, y su importancia recae en que se crean nuevos alelos. Pueden presentarse por:
 - a. sustitución de una base de ADN ya sea por reemplazo (no sinónimas) o silenciosas (sinónimas).
 - b. cambio de marco por inserción o eliminación.
- 2) Mutaciones en el cromosoma por:
 - a. inversión: una sección del cromosoma se da “vuelta” y puede tener efecto de nuevos genes reguladores o promotores.
 - b. entrecruzamiento intragénico; el gen queda inactivo.
 - c. entrecruzamiento en sitios no homólogos; provoca la duplicación del gen y la segunda copia puede mutar y generar una nueva función.
 - d. translocación; se presenta cuando dos cromosomas no homólogos intercambian segmentos y se generan gametos no viables.
 - e. fisión y fusión; cuando dos cromosomas no homólogos se unen o uno de ellos se divide y se crean polimorfismos.
- 3) Poliploidía: cuando se adiciona un set completo de cromosomas en el genoma y como consecuencia se da la formación de gametos sin reducción del número diploide de cromosomas por lo que se podría formar una nueva especie por aislamiento reproductivo.

Marcadores moleculares

Un marcador molecular es un fragmento de ADN que se encuentra en un sitio (locus) o región identificable dentro de un cromosoma y puede ser parte de un gen o una región del ADN no codificante; es decir, sin función conocida. Los tipos de marcadores se distinguen por su capacidad para detectar polimorfismos en loci

únicos o múltiples y pueden ser de carácter dominante o co-dominante. Los polimorfismos detectados en el ADN se deben a diferencias en el número de determinadas regiones que se encuentran dispersas en el genoma (regiones repetidas) o a mutaciones puntuales. Con base en esto hay dos métodos de detección de polimorfismos:

- 1) Marcadores asociados a variaciones debido al número de repeticiones en su secuencia; se conoce que una gran proporción del genoma eucariota está compuesto por secuencias repetitivas de ADN que difieren en el número y composición de los nucleótidos:
 - a. ADN satélite
 - b. Minisatélites
 - c. Microsatélites
- 2) Técnicas que pueden detectar cambios puntuales en el genoma:
 - a. *RFLPs*
 - b. *AFLPs*
 - c. *RAPDs*
 - d. *SNP's*

Microsatélites

Se encuentran diseminados por todo el genoma de los eucariotas. También conocidos como repeticiones de secuencias únicas o repeticiones simples en tandem (SSR y STR por sus siglas en inglés, respectivamente); consisten en segmentos o unidades cortas (motivos o repetidos) de ADN de unos cuantos nucleótidos de longitud (uno a seis pares de bases) y que se repiten varias veces en un alto número. Cada secuencia o unidad está definida por el tipo de repetido; es decir, pueden ser di, tri, tetra, penta o hexa nucleótidos. Son secuencias altamente variables entre y dentro de individuos, variación que se manifiesta como diferencias en la longitud entre los distintos alelos del mismo locus; es decir, existe un número diferente de repeticiones del motivo. Debido a que son de naturaleza co-dominante permiten la distinción de individuos homocigotos y heterocigotos. Su alta tasa de mutación y grado de polimorfismo se deben a la acumulación de

errores que se producen durante el deslizamiento de la polimerasa en el proceso de replicación del ADN. La detección de estos marcadores se basa en la amplificación por PCR de la región que los contiene, mediante el uso de iniciadores complementarios en las regiones flanqueantes, y su posterior visualización por la diferencia de tamaño de los amplicones. Existen distintos tipos de microsatélites: a) microsatélites perfectos: repeticiones en un número mínimo de unidades sin interrupción y sin repeticiones adyacentes (i.e. $(CA)_5$, b) microsatélites compuestos: dos o más repeticiones con un número mínimo de unidades repetidas ininterrumpidas (i.e. $(CA)_6(GA)_9$) y c) microsatélites interrumpidos: repeticiones ininterrumpidas con un número mínimo de repeticiones y separadas por un máximo de cuatro pares de bases $(CA)_8TTT(CA)_7$ (Ellengren 2004, Kantartzi 2013).

La separación y visualización de los microsatélites puede llevarse a cabo con distintas metodologías: a) electroforesis en geles de agarosa; ciertos alelos con una diferencia de tamaño muy marcada pueden ser visualizados mediante un simple gel de agarosa con una concentración óptima del dos al tres por ciento y con tinción de bromuro de etidio; b) electroforesis en geles de poliacrilamida que son geles con mayor capacidad de resolución y que necesitan de una tinción con sales de plata. También se pueden emplear iniciadores marcados con radioactividad o con fluoróforos para su visualización en un analizador de fragmentos; c) electroforesis capilar con secuenciadores automatizados: se emplean diferentes fluorocromos para marcar a los iniciadores y permitir la detección por emisión de fluorescencia de varios productos de PCR (varios marcadores al mismo tiempo). Con el método de amplificación múltiple se amplifican varios loci SSR simultáneamente al seleccionar iniciadores que no interactúen entre sí, con similar temperatura alineamiento y con alelos en diferentes rangos de tamaño; y d) análisis de alta resolución de fusión (*HRM* por sus siglas en inglés) utilizada para genotipado de marcadores tipo polimorfismo de sitio único y microsatélites. El método se basa en la desnaturalización gradual de los amplicones y la detección de pequeños cambios en la fluorescencia emitida

por el uso de fluoróforos de unión a ADN de doble cadena. Mediante el preciso control de la temperatura se permite que se detecten ligeras variaciones de secuencia entre las muestras por las diferencias en las curvas de fusión. La curva de fusión se logra mediante la desnaturalización lenta de los amplicones. La fluorescencia es alta al principio, cuando todo el DNA está en forma de doble cadena y el fluoróforo está intercalado y va disminuyendo durante la desnaturalización, al aumentar la temperatura, debido a que el fluoróforo que está intercalado se libera pasando a la solución. Esta curva de fusión y temperatura de fusión (temperatura en la que el 50% de las moléculas de ADN se encuentran como cadena doble) es característica de cada producto de PCR y varía con la secuencia de las bases, el contenido de guanina-citocina (GC) y la longitud del amplicón (Ellengren 2004, Kantartzi 2013).

La frecuencia y tipo de repetición de los microsatélites varía en los genomas de distintas especies; son muy abundantes en peces, insectos himenópteros (hormigas, abejas, abejorros y avispas) y mamíferos, y menos frecuentes en el genoma de aves, plantas y lepidópteros (mariposas y polillas). Por todas las características antes mencionadas han sido, hasta hace poco, los marcadores de elección para estudios de diversidad, para análisis de parentesco y para el cartografiado de loci de caracteres cuantitativos (QTL por sus siglas en inglés) (Ellengren 2004, Kantartzi 2013).

Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)

Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica son un tipo de marcadores moleculares en donde el polimorfismo detectado es producto de la variación en la secuencia del ADN que se reconoce mediante el uso de enzimas de restricción. Estas enzimas son bacterianas y tienen como función cortar moléculas de ADN únicamente en puntos o sitios precisos. Se pueden amplificar por *Southern Blot* (técnica que detecta la presencia de una secuencia de ADN por digestión con endonucleasas y en la que se separan fragmentos de este ácido de acuerdo a su longitud que posteriormente se transfieren a una membrana para su

hibridación con una sonda radioactiva y que finalmente son detectados por autorradiografía), o en combinación con la técnica reacción en cadena de la polimerasa (*PCR* por sus siglas en inglés) para detectar alelos que difieren en secuencia en un sitio de restricción concreto (Navajas y Fenton 2000).

Marcadores de ADN mitocondrial

Son utilizados ampliamente en estudios de análisis filogenético y de diversidad genética. El ADN mitocondrial haploide no sufre de recombinación, se transmite a través de la madre; es decir, que los individuos, por lo general, sólo lo heredan de la madre y no del padre, y tiene una alta tasa de mutación. Estas características permiten que se reconstruyan relaciones evolutivas dentro de una especie y entre distintas especies así como la detección de hibridación entre especies o subespecies (Navajas y Fenton 2000).

Marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética de ácaros

Una amplia gama de técnicas moleculares permite entender cómo es que los ácaros se dispersan, se pueden calcular las distancias promedio para su esparcimiento y los factores que influyen en esto.

La diversidad genética es difícil de describir y cuantificar. A lo largo de la historia se han utilizado principalmente métodos de descripción morfológica que involucran la observación directa de diferencias fenotípicas entre los organismos. Diversos investigadores han empleado el estudio de diferencias morfológicas para el estudio de ácaros en las abejas (Delfinado-Baker y Houck 1989; Anderson y Morgan 2007; Maggi *et al.* 2009; Akinwande *et al.* 2013). Por otro lado, el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la investigación del ADN a nivel molecular, lo cual proporciona una manera más directa y certera de medir y cuantificar la variación genética entre y dentro de diversas especies. La variedad de técnicas y metodologías para el estudio y detección de polimorfismos genéticos

es bastante amplia. El Cuadro 1 resume las técnicas, así como sus ventajas y desventajas.

Cuadro 1. Técnicas para medir polimorfismos genéticos en ácaros; ventajas y desventajas.

Estudio	Técnica	Ventajas	Desventajas
Relaciones filogenéticas (familia, género)	Secuenciación ADN ribosomal (ADNr) (genes)	Genes de copia múltiple Secuencias conservadas	Poco informativos para conocer divergencias recientes
	Secuenciación ADN mitocondrial	Regiones conservadas facilitan el diseño de iniciadores para PCR Múltiples copias en cada célula	Saturación de mutaciones debido a una alta tasa evolutiva
Relaciones filogenéticas (especies, poblaciones)	Secuenciación ADNr (espaciadores transcritos internos)	Pequeñas regiones que se encuentran entre genes conservados útiles para iniciadores de PCR Altamente variables	Dificultad para alinear secuencias Homogenización incompleta puede significar que hay variación intra individuo produciendo secuencias ambiguas
	Secuenciación ADN mitocondrial	Herencia estrictamente materna No hay recombinación La estructura de población se puede definir a nivel geográfico	Sólo se rastrean líneas maternas Ideal utilizar tanto ADNr como mitocondrial
Estudios de poblaciones (poblaciones, individuos)	PCR-RFLPs	Relativamente barato y simple También para diagnóstico de especies	Poca variación
	Microsatélites	Altamente polimórficos Fácil registro de loci Para mapeo de genes	Caro y técnicamente difícil de aislar Por lo general loci específicos de especie

	DALPs	Marcadores codominantes Sólo se aíslan loci polimórficos Número de marcadores ilimitados No requiere de información genética previa	Loci específico de especie
	AFLPs	No requiere de información genética previa Número de marcadores ilimitados Para mapeo de genes	Marcador dominante No hay detección de heterocigotos
	RAPDs	Baratos y simples No requiere de información genética previa Número de marcadores ilimitados	Marcador dominante No hay detección de heterocigotos Se requiere de mucho cuidado para que sean repetibles
	Alloenzimas	Barato y simple Protocolos accesibles para detección de muchas enzimas	Baja variación Se requiere mucho material Bajo número de loci detectados en pequeños animales

Cuadro tomado de Navajas y Fenton 2000

Estudio de la variación genética de *Varroa destructor*

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores más importantes involucrado en la gran pérdida de colonias de abejas melíferas es la ectoparasitosis causada por el ácaro *Varroa destructor* (Ácaros: Mesostigmata/Varroidae). Dicho ácaro se ha dispersado ampliamente desde que cambió de su huésped original (*Apis cerana*) alrededor de hace 50 años (Matheson 1996). En un principio, *Varroa jacobsoni*, descubierto por Oudemans en 1904 en la isla de Java en Indonesia, parasitaba a la abeja de oriente o asiática, *Apis cerana*. La interacción entre el ácaro y la abeja de occidente (*Apis mellifera*

L.) comenzó cuando ésta fue introducida en Asia en 1877, provocando que ambas especies de abejas establecieran una relación de simpatria (Ruttner y Maul 1983). Posteriormente se reportó la presencia de varroa por primera vez en *Apis mellifera* en 1957 en las islas Filipinas (Delfinado 1963) y de ahí, la invasión progresiva en esta especie de abeja se debe a la participación del ser humano por su introducción en Asia. Se cree que existen dos rutas de invasión del ácaro a otros continentes: 1) de Japón a Paraguay en 1971; a Brasil en 1972 y después a Norteamérica en 1987, y 2) del este al oeste de la Unión Soviética, y de ahí a Bulgaria en 1972, y a Alemania en 1977 continuando por el resto de Europa y a los Estados Unidos de América, donde los dos orígenes de las vías de invasión, antes mencionadas, se encuentran. Varroa se detectó por primera vez en Estados Unidos en 1987 en el estado de Wisconsin y a partir de ahí se esparció por toda Norteamérica (Navajas 2010; Rosenkranz *et al.* 2010).

Este cambio de huésped es el que ha provocado que varroa sea un parásito cosmopolita en *Apis mellifera*. Es por esto que actualmente se le considera una de las principales amenazas para las abejas melíferas debido al alto impacto que tiene sobre ellas (Sammataro *et al.* 2000). En contraste, sobre su huésped original, *Apis cerana*, no provoca mayores daños ya que han co-evolucionado y se han adaptado uno al otro, al grado de que existe una cierta resistencia por parte de las abejas sobre el ácaro gracias al comportamiento higiénico altamente desarrollado y al comportamiento de acicalamiento de las abejas de oriente (Rath 1999). Otros factores que influyen en dicho equilibrio de simpatria es la predilección del ácaro de introducirse en las celdas de zánganos para reproducirse, los cuales están presentes por un corto periodo de tiempo en las colonias de abejas, ello durante la época reproductiva. Por lo mismo, cuando no existe cría de zánganos, las varroas que se encuentran infestando a las abejas obreras se encuentra en su fase forética, sin poder reproducirse y por lo tanto la dinámica poblacional de varroa es de bajo impacto (Fuchs 1990; Boot *et al.* 1995; Calderón *et al.* 2007).

Antes se creía que *Varroa jacobsoni* era el responsable de los efectos detrimentales sobre las abejas melíferas de occidente. Sin embargo, actualmente se sabe con certeza que esta especie sólo parasita a la abeja de oriente, *Apis cerana*. En estudios previos basados en características morfológicas (Grobov *et al.* 1980; Delfinado-Baker y Houck 1989), en aloenzimas (Issa 1989; Biasiolo 1992) y en hidrocarburos cuticulares (Nation *et al.* 1992), se logró determinar que existen ciertas diferencias entre varroas que colonizan a diferentes especies de abejas. También se han empleado técnicas de escala más fina como lo son los marcadores moleculares. Uno de los primeros marcadores moleculares empleados para esclarecer las diferencias entre varroas fue la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*RAPDs* por sus siglas en inglés) (Kraus y Hunt 1995; Guerra *et al.* 2010). Mediante esta técnica se pudieron distinguir dos haplotipos de varroa: el ruso (también denominado coreano) que correspondía a ácaros de Estados Unidos, Rusia, Marruecos, Alemania, Italia, España y Portugal; y el japonés que corresponde a poblaciones de Japón, Brasil y Puerto Rico. Cabe señalar que actualmente, la presencia de ambos haplotipos se ha reportado en los Estados Unidos (De Guzman *et al.* 1999).

Como se mencionó anteriormente, *V. jacobsoni* fue descrito por primera vez por Oudemans en 1904 y no fue sino hasta inicios del siglo XXI que Anderson y Trueman (2000) reclasificaron al ácaro que parasita a *Apis mellifera* como una especie separada de *Varroa jacobsoni*, y lo designaron como *Varroa destructor*. La reclasificación se basó en un análisis, de marcadores moleculares en el ADN mitocondrial del ácaro. Actualmente se sabe que el género *Varroa* está compuesto por cuatro especies: *Varroa jacobsoni*, *Varroa underwoodi*, *Varroa rindereri*, y *Varroa destructor* (Rosenkranz *et al.* 2010). A pesar de que estas especies tienen semejanzas morfológicas entre ellas, su virulencia hacia una determinada especie de abeja no es la misma. Por ejemplo, *Varroa jacobsoni* carece de habilidad para reproducirse en *Apis mellifera* pero sí logra reproducirse en la abeja asiática *Apis cerana* (Rosenkranz *et al.* 2010).

Los análisis genéticos basados en el ADN mitocondrial de varroa han sido de suma importancia para establecer la taxonomía y la dispersión del ácaro. Se han llevado a cabo estudios con marcadores genéticos para establecer diferencias en los ácaros de diferentes regiones geográficas y para conocer su distribución en las abejas (Anderson y Fuchs 1998). Para esto se han hecho análisis para determinar la variación en secuencias de nucleótidos de una sección dentro del genoma mitocondrial que corresponde al gen citocromo oxidasa I (CO-I). Anderson y Trueman (2000) analizaron dicho fragmento y demostraron que existen al menos dos especies de varroa: *Varroa jacobsoni* y *Varroa destructor*; asimismo, determinaron que existe una variación considerable en las secuencias de dicho fragmento (~5%) entre especies de varroa (*V. underwoodi*, *V. rindereri*, *V. jacobsoni* y *V. destructor*) pero poca o casi nula variación dentro de una misma especie (<0.5%).

La especie *Varroa destructor* está conformada por varios haplotipos o clados que se presume tienen un grado de virulencia diferente (Anderson y Fuchs 1998) hacia la abeja melífera de occidente en comparación con la abeja de oriente. Con base en esto, se han identificado dos haplotipos que pertenecen a *Varroa destructor* y que son los únicos que pueden reproducirse en colonias de *Apis mellifera* por lo que son de importancia económica debido a su grado de virulencia; el coreano (antes referido como ruso) y el japonés/tailandés (Solignac *et al.* 2005; Cornuet *et al.* 2006). El haplotipo coreano parasita a *A. mellifera* casi a nivel mundial mientras que el haplotipo japonés se encuentra distribuido en Japón, Tailandia y parte de América. Se cree que el haplotipo coreano es altamente patogénico en las poblaciones de abejas *Apis mellifera*, mientras que el Japonés es menos dañino (Delfinado-Baker 1988).

Varroa destructor es un ácaro que presenta una genética haplo-diploide por lo que se reproduce a través de apareamientos hermano-hermana lo que favorece la fijación de nuevas mutaciones (Cornuet *et al.* 2006). Esas mutaciones son las

responsables de que se puedan presentar variaciones en el genoma que permiten diferenciar variantes genéticas.

Los microsatélites se han empleado para establecer los patrones de dispersión y de flujo genético en una amplia variedad de taxa de ácaros como es el caso del ácaro Mesostigmata *Varroa destructor* y otros ácaros. Con base en esto, Evans (2000) y Solignac *et al.* (2003, 2005) usaron marcadores moleculares microsatélites (*Single Sequence Repeat* o *SSR* por sus siglas en inglés) para determinar los distintos haplotipos de varroa presentes en diferentes países y tener un mejor entendimiento de la dispersión de las poblaciones del ácaro en el mundo, así como de la variación en su genética. Por otro lado, Navajas *et al.* (2010) utilizaron marcadores genéticos mitocondriales como lo son los genes *COI*, *COIII*, *ATP6* y *cytb* en ácaros colectados tanto de abejas del oriente (*Apis cerana*) como del occidente (*Apis mellifera*) para conocer más a fondo sobre la variación que existe entre *Varroa jacobsoni* y *Varroa destructor*, así como de la variación que existe entre y dentro de los haplotipos de cada especie, dependiendo de la región geográfica en la que se localizan y de la especie de huésped que parasitan. De esta manera, descubrieron en Asia 18 haplotipos, 11 en *A. cerana* y 7 en *A. mellifera*, así como dos nuevas variantes del haplotipo coreano y dos del haplotipo japonés en *A. mellifera*, que denominaron de acuerdo a su país de origen.

En México no existe ninguna investigación publicada que haya determinado, el(los) haplotipo(s) de varroa presente(s) ni ningún estudio de variación genética de éstos ácaros. Sólo existe una referencia que menciona, a nivel comunicación personal, que el haplotipo encontrado en una muestra de abejas africanizadas de México era el coreano. Por lo anterior, se llevó a cabo un estudio un estudio para determinar cuál o cuales de estos genotipos existen en México, ya que uno de ellos es considerado altamente patógeno a las abejas.

Hipótesis

El haplotipo del ADN mitocondrial del ácaro *Varroa destructor* es diferente en dos diferentes regiones apícolas de México.

Objetivo

Determinar qué haplotipo(s) del ADN mitocondrial de *V. destructor* existen en dos regiones apícolas de México, una tropical y una templada.

Materiales y métodos

Área de estudio

Se colectaron ácaros de dos colmenas por apiario en seis diferentes apiarios de dos regiones apícolas de México. Una región correspondió al clima tropical, en el municipio de Ahuacatlán en el estado de Nayarit, y la otra al clima templado en las delegaciones de Xochimilco y Milpa Alta en el Distrito Federal. En Canadá se obtuvieron ácaros provenientes de las regiones de Guelph, de Niágara y de Milton en la provincia de Ontario. Estos ácaros se usaron como referencia del haplotipo que predomina en EUA y Canadá, que es el haplotipo coreano.

Obtención de ácaros

Se obtuvieron muestras de aproximadamente 100 ácaros por colmena de dos colmenas altamente infestadas, en seis apiarios diferentes por cada una de las dos regiones apícolas de México previamente mencionadas. Para la obtención de los ácaros se utilizó una cubeta plástica de 19 L con malla de criba de cuatro mm, 20 cm por encima de su fondo. Entre el fondo del contenedor y la malla se colocó un círculo de cartulina blanca y sobre ésta un frasco con algodón remojado con 30 mL de éter al 95%. Se sacudieron bastidores con abejas obreras adultas dentro de la cubeta y después ésta se cerró por un periodo de 15 a 20 minutos para anestesiar a las abejas y permitir que los ácaros se desprendieran del cuerpo de ellas (Arechavaleta-Velasco y Guzman-Novoa 2001). Finalmente se colectaron los ácaros que cayeron sobre el pedazo de cartulina utilizando un pincel de cerdas finas y se introdujeron en un vial de 2 mL con alcohol etílico puro y se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su utilización. Cabe señalar que cuando fue posible se realizó un pre-muestreo con lavados de abejas según la técnica de lavado con alcohol (De Jong *et al.* 1982) para identificar las dos colonias más infestadas en cada apiario y así asegurar que se obtendría la cantidad necesaria de ácaros.

Los ácaros colectados en Canadá fueron proporcionados por el equipo del Programa de Transferencia de Tecnología de la Asociación de Apicultores de

Ontario (Technology Transfer Program of the Ontario Beekeeping Association) que ellos mismos colectaron de los apiarios del condado de Welland y se conservaron en alcohol etílico puro hasta su utilización. Por otro lado, también se colectaron ácaros de las colmenas del Centro de Investigación Apícola de la Universidad de Guelph en el condado de Wellington (Cuadro 2).

Cuadro 2. Procedencia e identificación de los ácaros de *V. destructor* colectados en dos regiones de México y tres localidades de Ontario, Canadá, para su análisis genético. Los ácaros se obtuvieron de una colmena por apiario con un nivel de infestación alto (>5%).

Identificación	Localidad	País	Apiario	Año de colecta
VdMxHp1	D.F.-San Juan Tepenahuac	México	El Grande	2013
VdMxHp2	D.F.-San Juan Tepenahuac	México	Nopalera	2013
VdMxHp3	D.F.-Milpa Alta	México	Los Encinos	2013
VdMxHp4	D.F.-Tecómitl	México	Las Trojes	2013
VdMxHp5	D.F.-Tres Marías	México	Tres Marías	2013
VdMxHp6	D.F.-San Luis Tlaxialtemalco	México	El Chico	2013
VdMxTr1	Nayarit-Ahuacatlán	México	Chilo 1	2013
VdMxTr2	Nayarit-Ahuacatlán	México	Chilo 2	2013
VdMxTr3	Nayarit-Ahuacatlán	México	Pancho	2013
VdMxTr4	Nayarit-Ahuacatlán	México	La puerta	2013
VdMxTr5	Nayarit-Ahuacatlán	México	Los Tamarindos	2013
VdMxTr6	Nayarit-Ahuacatlán	México	El Criadero	2013
VdOnNa1	Ontario-Niagara	Canadá		2013
VdOnNa2	Ontario-Niagara	Canadá		2013
VdOnNa3	Ontario-Niagara	Canadá		2013

VdOnNa4	Ontario-Niagara	Canadá		2013
VdOnTh1	Ontario-Guelph	Canadá	Townsend House	2013
VdOnTh2	Ontario- Guelph	Canadá	Townsend House	2013
VdOnTh3	Ontario- Guelph	Canadá	Townsend House	2013
VdOnTh4	Ontario- Guelph	Canadá	Townsend House	2013
VdOnMn1	Ontario-Milton	Canadá		2013
VdOnMn2	Ontario-Milton	Canadá		2013
VdOnMn3	Ontario-Milton	Canadá		2013
VdOnMn4	Ontario-Milton	Canadá		2013

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total de los ácaros, macerando cada uno por separado en un vial de 1.5 mL con un poco de arena estéril y con un micropistilo de plástico estéril. El protocolo para la homogenización y lisis del ácaro fue el siguiente (modificado de Hunt *et al.* 1995).

a) Homogenización y proteólisis de ácaros

1. Se sacaron las muestras del congelador mantenidas a -80°C y conservadas en alcohol puro.
2. Se colocó un ácaro sobre una toalla de papel para permitir la evaporación del alcohol.
3. Se colocó un ácaro por vial de 1.5 mL con un poco de arena estéril
4. Se añadió 150 μL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (*CTAB* por sus siglas en inglés).
5. Se añadió 1.5 μL de proteinasa K 10 mM (mantenida en hielo).
6. Se maceró con un micro pistilo de plástico estéril hasta la pulverización total del ácaro.
7. Se colocó la muestra en baño María a 60°C durante 1 hora.

8. Se retiró del baño María.
9. Se almacenó la muestra a -20°C o se usó inmediatamente para la extracción de ADN.

b) Extracción con fenol:cloroformo y purificación

1. Se dejó que la muestra se descongelara, si es que se almacenó a -20°C , o de lo contrario se utilizó inmediatamente después de retirarla del baño María.
2. Se añadió la misma cantidad de fenol:cloroformo (1:1) que la añadida de CTAB (150 μL).
3. Se mezcló lentamente 15 veces por inversión manual.
4. Se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 15 minutos.
5. Se colectó el sobrenadante con micropipeta, tomando nota de la cantidad colectada, y se transfirió a un nuevo vial de 1.5 μL .
6. Se añadió la misma cantidad de fenol:cloroformo (1:1) que el sobrenadante obtenido en el paso anterior.
7. Se mezcló lentamente 15 veces por inversión manual.
8. Se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 15 minutos.
9. Se colectó el sobrenadante con micropipeta, tomando nota de la cantidad colectada, y se transfirió a un nuevo vial de 1.5 μL .
10. Se añadió la misma cantidad de cloroformo que del sobrenadante obtenido en el paso anterior (1:1) para eliminar los residuos de fenol
11. Se mezcló lentamente 15 veces por inversión manual.
12. Se centrifugó a 13,000 rpm durante cinco minutos.
13. Se colectó el sobrenadante con micropipeta, tomando nota de la cantidad obtenida, y se transfirió a un vial nuevo.
14. Se añadió el 10% de oxaloacetato de sodio 3 M (NaOAc) y el doble del volumen de etanol frío al 100% de la cantidad de sobrenadante obtenido en el paso anterior.
15. Se mezcló lentamente siete veces por inversión manual.

16. Se colocaron las muestras en congelación a -20°C durante al menos tres horas o por una noche preferentemente.
17. Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente.
18. Se descartó el etanol por decantación o con micropipeta, teniendo cuidado de no disolver o perder el pellet.
19. Se centrifugó el vial a 10,000 rpm durante tres minutos.
20. Se descartaron los residuos de etanol con micropipeta teniendo cuidado de no disolver o coleccionar el pellet.
21. Se colocó el tubo con la tapa abierta en la cámara de flujo laminar durante 10 -15 minutos para secar el pellet.
22. Se añadieron 20 μL de dH_2O (agua destilada) estéril.
23. Se incubaron las muestras en baño María a 65°C durante 10 minutos.
24. Se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante 10 segundos.
25. Se almacenó el ADN a -20°C o -80°C hasta su uso.

❖ **Análisis con RFLPs (*Restriction fragment length polymorphisms*)**

Amplificación de ADN por PCR

El protocolo para la amplificación del fragmento del gen mitocondrial *CO-I* fue el siguiente (Volumen final de cada reacción 15 μL):

- 1.5 μL de solución amortiguadora Taq 10x (con MgCl_2) (New England Biolabs[®], Pickering, ON).
- 0.5 μL de desoxinucleótidos trifosfatados 10 mM (*dNTPs*).
- 1.0 μL de iniciador sentido COIVd-F 10 mM.
- 1.0 μL de iniciador antisentido COIVd-R 10 mM.
- 8.8 μL de agua destilada estéril.
- 0.2 μL de Taq ADN polimerasa (5U/ μL) (New England Biolabs[®], Pickering, ON).
- 2.0 μL de ADN.

Iniciadores

Se emplearon los iniciadores diseñados y reportados por Solignac *et al.* (2005). Iniciador sentido: 5'-TACAAAGAGGGGAAGAAGCAGCC-3' e iniciador antisentido: 5'-GCCCTATTCTTAATACATAGTGAAAATG-3'.

Condiciones de la PCR

El fragmento del gen mitocondrial CO-I (de 376bp) se amplificó utilizando un termociclador AG22331 Mastercycler® EP Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, DE) con las siguientes condiciones: desnaturalización a 92°C durante cuatro minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 92°C durante un minuto, alineación a 52°C por 1.30 min y extensión a 72°C.

Enzima de restricción

El fragmento de CO-I se sometió a digestión mediante el uso de la enzima de restricción *SacI* (2.5 U), la cual reconoce la secuencia 5'...GAGCT▼C...3' y 3'...C▲TCGAG...5', para el análisis del haplotipo presente en las muestras de ácaros colectados en México y Canadá. La digestión generó dos fragmentos para el haplotipo japonés (128/124 y 252/256 bp) y el fragmento de gen quedó sin digerir en el caso del haplotipo coreano (376pb).

❖ Análisis con microsatélites

Se seleccionaron cuatro microsatélites a partir de un juego de estos marcadores moleculares empleados con anterioridad y reportados por Solignac *et al.* (2003, 2005) y Evans (2000). Dichos microsatélites se eligieron basándose en que fueran de ayuda diagnóstica para la distinción entre el haplotipo japonés y el coreano. Los cuatro microsatélites fueron VD016, VD119, VD112 y VD146 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de los microsatélites utilizados en el análisis de la variación genética de *Varroa destructor*.

ID SSR	No. Acceso	Repetido	Tamaño pb	Iniciador sentido	Iniciador antisentido
VD016	AJ558166	(TC) ₇ GC(TC) ₅	268	TCATGCACTACGACGAAGGC	AGCTTTATGCATGCACAAATACG
VD119	AJ558171	(AT) ₆ (TG) ₉	116	CACTGTTACGTTAACAATTAAGCACG	TCTTGATCCCAAATGTAATTAGAGG
VD112	AJ558168	(TC) ₁₆ (AC) ₈ (TC) ₄	142	TACTATGGCCTAGCGACGG	CGTCGCTCATTATGGAACG
VD146	AJ558179	(AC) ₁₀	174	TGGCTCATGCATTATCGTTG	AGCGTTTGGAGAGTGAGAAATAC

Amplificación de ADN por PCR

Los microsatélites se amplificaron por medio de la técnica de PCR. El protocolo para la amplificación de ADN fue el siguiente:

Volumen final de cada reacción: 15 µL

- 1.5 µL de solución amortiguadora Taq 10x (incluye MgCl₂) (New England Biolabs, Pickering, ON).
- 0.5 µL de desoxinucléotidos trifosfatados 10 mM (dNTPs por sus siglas en inglés).
- 1.0 µL de iniciador sentido 10 mM.
- 1.0 µL de iniciador antisentido 10 mM.
- 8.8 µL de agua destilada estéril.
- 0.2 µL de Taq ADN polimerasa (5U/ µL) (New England Biolabs[®], Pickering, ON).
- 2.0 µL de ADN.

Los microsatélites se amplificaron en un termociclador AG22331 Mastercycler[®] EP Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, DE) con las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización 94°C durante tres min, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Se analizó el ADN de un total de 180 ácaros; 48 ácaros de la región templada, 48 de la región tropical de México, así como 48 de Niágara, 12 de Guelph y 24 de Milton en Canadá, para cada juego de microsatélites (VD112, VD119, VD146 y VD016).

Electroforesis

A los productos de la PCR se les añadió 2.0 µL de colorante de carga (Loading dye Fermentas[®] 6x TricTrack DNA) y se depositaron en gel de agarosa (Agarose A Bio Basic[®] Canada INC.) al 1.2% (1.2 gr de agarosa con 100 mL de amortiguador TAE 1x) el cual se tiñó con 2.2 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). El gel se corrió en un tanque de electroforesis con amortiguador TAE 1x junto con un marcador molecular de ADN de 100 pb (Bio Basic[®] Canada INC.). Los productos de la electroforesis se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta con cámara BioDoc-It Imaging System[®] (UVP, Mississauga, ON). En total se analizó el ADN de 180 ácaros de las dos regiones apícolas de México y de las tres regiones de la provincia de Ontario.

Base de datos

Una vez amplificados los fragmentos de los microsatélites se hizo una base de datos en formato *.txt* en la cual se registró la presencia/ausencia DEL microsatélite, asignándole un 0 para ausencia y un 1 para presencia de marcador. Esta base de datos se corrió con el programa *WINDIST* y posteriormente se corrió el archivo de salida en el programa *PHYLYP* para crear una matriz de distancias para los resultados de cada uno de los cuatro microsatélites empleados en el análisis de los ácaros muestreados. Finalmente el archivo de salida de *PHYLYP* se analizó con el programa *TREVIEW* para obtener un dendrograma que permitió analizar si existía alguna diferencia entre las muestras de ácaros de las distintas regiones y para obtener los valores “*bootstrap*”.

❖ Selección y análisis de dos fragmentos del ADN mitocondrial de *Varroa destructor*

Se realizó un análisis del ADN mitocondrial de *Varroa destructor* para identificar sitios polimórficos al comparar las dos secuencias del genoma mitocondrial completo de este ácaro reportadas por Navajas *et al.* (2002) (número de acceso AJ49312), y por Evans y Lopez (2002) (número de acceso AY163547) que se encuentran en la sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Esas secuencias se alinearon y compararon utilizando el programa Clone Manager 9 Ink[®] para identificar dos regiones que presentaban la mayor cantidad de polimorfismos y así poder utilizar dichos fragmentos para su análisis con el ADN de los ácaros muestreados en México y Canadá. Debido a que las regiones seleccionadas abarcaban la secuencia de un gen completo, de medio gen, o contenían a una región no codificante, no se les denominó con el nombre de un determinado gen sino que se les asignó una identificación propia: el primer fragmento de 679 pb se nombró *cytII-ATP*, y abarca la parte final del gen citocromo oxidasa c subunidad II hasta una región no codificante posterior al gen ATP8 (a partir de la posición 3262 y hasta la posición 3940 de la secuencia del genoma mitocondrial completo de varroa reportado por Navajas *et. al* 2002). El segundo fragmento de 706 pb, se denominó *cytb*, y abarca, casi por completo, al gen citocromo b (*cytb*) (de la posición 9830 hasta la posición 10535 de la secuencia del genoma mitocondrial completo de varroa reportado por Navajas *et. al* (2002). En la Figura 1 se muestran los dos fragmentos que se seleccionaron para amplificar así como los sitios polimórficos que se identificaron, al comparar las dos secuencias del genoma mitocondrial completo de *Varroa destructor*, reportadas previamente por Evans y Lopez (2002) y Navajas *et al.* (2002).

Iniciadores

Los iniciadores para amplificar los fragmentos arriba mencionados se diseñaron con el programa Clone Manager®, y fueron los siguientes: *cytII-ATP* sentido ‘GGTTGATGCTATTCCAGGG’ y antisentido ‘CCTTATGTATTTACACCAACAAGAC’ y; para el *cytb*, sentido ‘TGCAGCTTTAGTGGATTTACC’ y antisentido ‘CCCGCTAATATAATGGTTACAC’, los cuales se sintetizaron en el Laboratorio de Servicios de la Universidad de Guelph (Ontario, CA).

A partir del ADN extraído de cada ácaro de las diferentes regiones antes mencionadas, se llevó a cabo la técnica de PCR para amplificar las dos regiones del genoma mitocondrial de varroa, para el análisis de polimorfismos.

Condiciones de la PCR

La amplificación del ADN se efectuó con el siguiente protocolo (volumen final de cada reacción 15 µL):

- 1.5 µL de solución amortiguadora Taq 10x (incluye MgCl₂)
- 0.5 µL de dNTPs 10 mM
- 1.0 µL de iniciador sentido a la 10 mM
- 1.0 µL de iniciador antisentido a la 10 mM
- 8.8 µL de agua destilada estéril.
- 0.2 µL de Taq ADN polimerasa (5U/ µL) (New England Biolabs®, Pickering, ON)
- 2.0 µL de ADN

Los fragmentos del ADN mitocondrial se amplificaron en un termociclador AG22331 Mastercycler® EP Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, DE) con las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización 94°C durante tres min, 35 ciclos de 94°C durante 30 seg, alineamiento a 58°C para *cytII-ATP* y a 60°C

para *cytb* durante 30 seg, extensión a 72°C durante 30 seg, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Electroforesis

A los productos de la PCR se les añadió 2.0 µL de colorante de carga (Loading dye Fermentas® 6x TricTrack DNA) y se depositaron en gel de agarosa (Agarose A Bio Basic® Canada INC.) al 1.2% (1.2 gr de agarosa con 100 mL de solución amortiguadora TAE 1x) el cual se tiñó con 2.2 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). El gel se corrió en un tanque de electroforesis con solución amortiguadora TAE 1x junto con un marcador molecular de ADN de 100 pb (Bio Basic® Canada INC.). Los productos de la electroforesis se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta con cámara BioDoc-It Imaging System® (UVP, Mississauga, ON).

Purificación ADN

Se colectaron los fragmentos de ADN de los geles de agarosa cortando el gel en un transiluminador de luz ultravioleta. Cada banda recortada se introdujo en un vial de 1.5 mL y se identificó con los datos correspondientes (fragmento amplificado, nombre del iniciador, identificación de la muestra) y finalmente cada muestra se pesó en una balanza electrónica para seguir el protocolo de purificación de acuerdo al peso del fragmento de gel.

Para la purificación de los fragmentos de ADN amplificados se utilizó el *kit EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction* (Bio Basic® INC) con ciertas modificaciones en el protocolo provisto por el laboratorio, debido a que en pruebas preliminares propias se observó que con dichas modificaciones se obtenía una mayor cantidad de ADN purificado así como de mejor calidad. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Se cortó el fragmento de ADN del gel de agarosa con un escalpelo limpio y filoso.
2. Se colocó el pedazo de gel en un vial de 1.5 mL.
3. Se pesó el vial para obtener el peso neto del gel (previamente se taró la balanza con el peso de un vial vacío).
4. Se añadieron 400 μ L de solución amortiguadora de unión II (*Binding Buffer II*) por cada 100 mg del peso del gel.
5. Se incubó a 60°C durante 10 minutos en baño María y se agitó ocasionalmente hasta que el gel de agarosa se disolviera por completo.
6. Se retiró del baño maría y se verificó que el color de la mezcla fuera amarillo lo cual indicaba que se obtuvo un grado de pH óptimo.
7. Se añadió la mezcla a la columna EZ-10 y se dejó sin tocar durante dos minutos.
8. Se centrifugó a 10,000 rpm durante dos minutos.
9. Se descartó el líquido por decantación.
10. Se añadieron 375 μ L de solución de lavado.
11. Se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto.
12. Se descartó el líquido del fondo del tubo por decantación.
13. Se añadieron 375 μ L de solución de lavado.
14. Se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto.
15. Se descartó el líquido del fondo del tubo por decantación.
16. Se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto.
17. Se descartó cualquier residuo de la solución de lavado, así como el tubo.
18. Se colocó la columna en un vial estéril de 1.5 μ L previamente marcado con su respectiva identificación.
19. Se añadieron 30 μ L de amortiguador de elución al centro de la columna.
20. Se incubó a temperatura ambiente por dos minutos.
21. Se centrifugó a 10,000 rpm durante dos minutos para eluir el ADN.

Nota: siguiendo las indicaciones del proveedor, el amortiguador de elución se incubó a 60°C previo a su uso durante 15 min.

Secuenciación

Finalmente los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Servicios de la Universidad de Guelph (Ontario, CA), en una sola dirección utilizando el iniciador sentido. A partir de la secuencias obtenidas se realizó un *blastn*® en la página web del NCBI, de cada una de las secuencias obtenidas. En el caso del fragmento *cytb*, se seleccionaron 13 resultados correspondientes a las secuencias, del mismo gen, de aislados de varroa reportados previamente (Gajic *et al.* 2013; Navajas *et al.* 2010). En el caso del fragmento *cytlI-ATP*, los únicos resultados, con los que se podían comparar las secuencias obtenidas en esta investigación, correspondían a las dos secuencias del genoma mitocondrial completo reportadas previamente por Navajas *et al.* (2002) y Evans y Lopez (2002). A continuación se presenta un cuadro de los resultados que se seleccionaron como secuencias referencia para los alineamientos.

Cuadro 4. Números de acceso de los resultados obtenidos a partir del *blastn* generado para las secuencias obtenidas, de los fragmentos amplificados del genoma mitocondrial de *V. destructor*.

Gen	Secuencias referencia	No. de acceso	Referencia
cytb	<i>V. destructor</i> isolate Peshier1-Suvi Do	JX970945.1	Gajic <i>et al.</i> 2013
	<i>V. destructor</i> isolate AmK1-1Korea-Seoul	GQ379094.1	Navajas <i>et al.</i> 2010
	<i>V. destructor</i> isolate AcJ1-4Japan-Shikoku	GQ319110.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AcJ1-3Japan-Machida	GQ379109.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AmJ1-6Japan-Tokyo	GQ379112.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AcJ1-2Japan-Tokyo-TamagawaiUni	GQ379108.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AcC3-1China-Dayao	GQ379106.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AcV1-3Thailand-ChiangMai	GQ379101.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AmJ1-1Taiwa-Taichung	GQ379107.1	

	<i>V. destructor</i> isolate AcV1-1Vietnam-Hanoi	GQ379099.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AcV1-4Thailand-BangChangtay	GQ379102.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AcC2-1China-Kunming	GQ379105.1	
	<i>V. destructor</i> isolate AcV1-2China-Xishuanbanna	GQ379100.1	
	<i>V. destructor</i> complete mitochondrial genome	AJ493124.2	Navajas <i>et al.</i> 2002
	<i>V. destructor</i> mitochondrion, complete genome	AY163547.1	Evans y Lopez 2002
cytlI-ATP	<i>V. destructor</i> complete mitochondrial genome	AJ493124.2	Navajas <i>et al.</i> 2002
	<i>V. destructor</i> mitochondrion, complete genome	AY163547.1	Evans y Lopez 2002

Análisis filogenético

Se seleccionó el genoma mitocondrial completo de *Thitarodes gonggaensis* con No. de acceso KP718817.1 y el de *Ixodes ricinus* aislado IR_3 con No. de acceso KF197133.1, como grupos externos, para generar un árbol filogenético. De acuerdo al *blastn* generado a partir de los resultados de nuestras secuencias, *Thitarodes gonggaensis* mostró mejores valores de cobertura e identidad para ser empleado como grupo externo. Sin embargo, también se seleccionó a *Ixodes ricinus*, como grupo externo por ser un organismo taxonómicamente más cercano a *V. destructor*. Los alineamiento de las secuencias se llevaron a cabo con MUSCLE® (Edgar 2004) en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), y los resultados se editaron con BioEdit Alignment Editor®. Una vez editado el alineamiento, el formato de salida se convirtió a formato .meg para ser visualizado en MEGA6® (Tamura *et al.* 2013), en donde se generó una reconstrucción filogenética en base al método de *Neighbor-Joining* con 1000 bootstraps.

Resultados

RFLPs

Se corrieron 30 muestras de ADN de ácaros provenientes de ambas regiones de México y todas mostraron el haplotipo coreano (fragmento de 376 pb del producto de PCR sin digerir por la enzima *SacI*). También se analizaron 30 muestras de ADN de ácaros provenientes del apiario del Centro de Investigación Apícola de la Universidad de Guelph, en Ontario, Canadá y de igual manera, todas pertenecieron al haplotipo coreano (Figura 2).

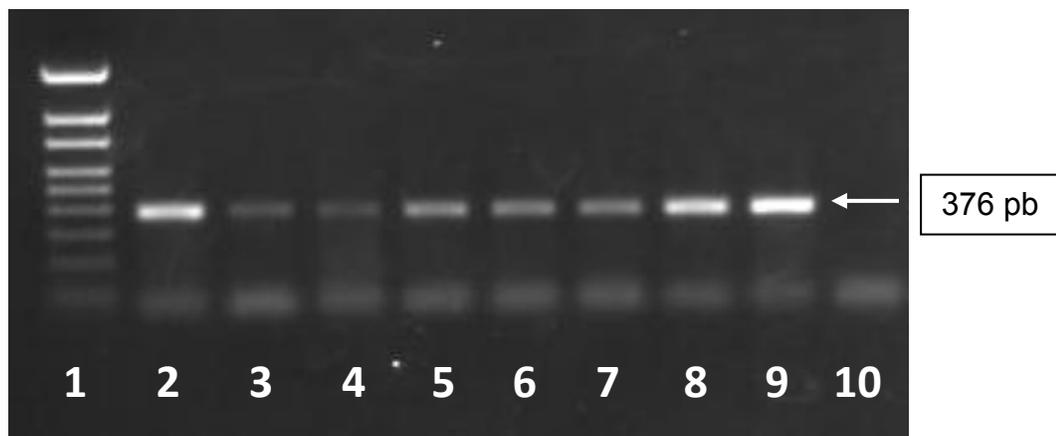


Figura 2. Perfil de restricción de una región de CO-I del genoma mitocondrial de ácaros de *Varroa destructor* colectados en México donde el ADNmt se digirió con la endonucleasa *SacI*. Carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 100 pb, carril 2 a 9 corresponden a muestras de ácaros de México (sin digerir) y carril 10 corresponde al control negativo.

Microsatélites

Se analizó el ADN de un total de 180 ácaros; 48 ácaros de la región templada, 48 de la región tropical, 48 de Niagara, 12 de Guelph y 24 de Milton para cada juego de microsatélites (VD112, VD119, VD146 y VD016). En todas las muestras se lograron amplificar los microsatélites seleccionados. El dendrograma obtenido se muestra en la Figura 3.

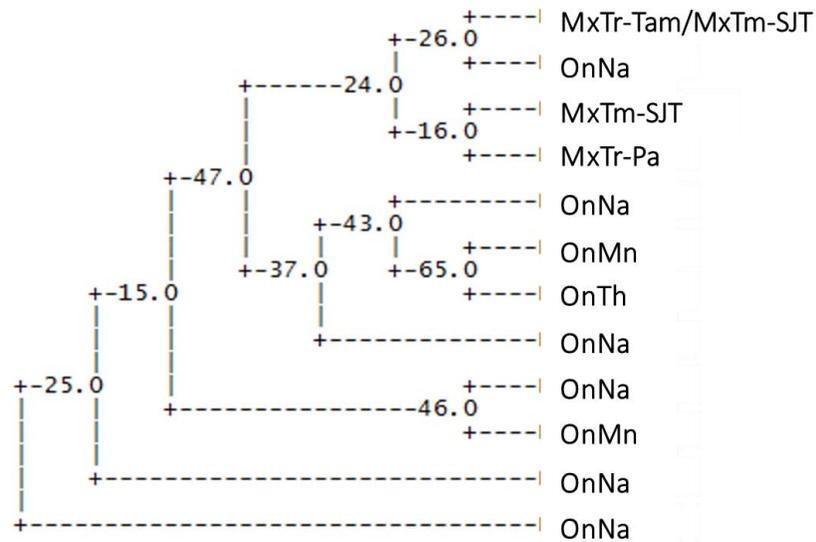


Figura 3. Dendrograma para las muestras de ácaros de México y Canadá. Se muestran los valores “bootstrap”. (MxTr-Tam: México-Trópico-Tamarindos; MxTm-SJT: México-Templado-San Juan Tepenahuac; Mx-r-Pa: México-Trópico-Pancho; OnNa: Canadá-Niágara; OnMn: Canadá-Milton; OnTh: Canadá-Guelph). El dendrograma representa los valores de confianza de la agrupación consenso basado en 1000 árboles, usando presencia/ausencia del marcador.

Fragmentos amplificados del ADN mitocondrial

Se analizó el ADN de los ácaros muestreados y se obtuvieron 48 secuencias en total, 24 para cada uno de los dos fragmentos del ADN mitocondrial de *Varroa destructor* (cytb y cytlI-ATP). De estas secuencias 12 pertenecían a ácaros de México (seis para clima templado y seis para clima tropical) y 12 para ácaros de Ontario, Canadá (cuatro de Townsend House en Guelph, cuatro de Niágara y cuatro de Milton). Todas las secuencias obtenidas de ácaros de México y Ontario se alinearon y compararon con las secuencias de Evans y López (2002) y Navajas *et al.* (2002) y con los aislados previamente mencionados, así como entre ellas (presentados en la parte de ANEXOS). Las muestras se clasificaron de la siguiente manera: los ácaros provenientes de México se identificaron como VdMx-Tm 1-6 (clima templado), VdMx-Tr 1-6 (clima tropical), mientras que los ácaros de Canadá se identificaron como VdOnNa 1-4 (Niágara), VdOnTh 1-4 (Townsend House, Guelph), VdOnMn1-4 (Milton), como se mencionó con anterioridad en el cuadro 2. En el caso de las secuencias correspondientes al genoma mitocondrial de varroa, la identificación de las mismas se denominó FrAv1

para el gen *cytb* y FrAv2 para el gen *cytII-ATP* en el caso del genoma reportado por Navajas *et al.* (2010), y BRL-USA1 para *cytb* y BRL-USA2 para *cytII-ATP* para las secuencias correspondientes a las reportadas por Evans y Lopez (2002). En el caso del *cytb*, se observaron secuencias idénticas que se agruparon y finalmente se identificaron como MxTm1,2,3,4,6/MxTr1,2,3,4,5,6/OnNa1,2,4/OnMn4/OnTh2. En el caso de *cytII-ATP* también se encontraron secuencias idénticas que se agruparon y se denominaron MxTm3,4,5,6/MxTr2,3,4,5,6/OnNa2, y OnNa4/OnTh3. Para el fragmento que corresponde al gen citocromo b (*cytb*), de las 24 secuencias que se obtuvieron de ácaros provenientes de México y Canadá, se observaron ocho haplotipos (secuencias distintas) (ANEXO 1). Al comparar los resultados obtenidos de las secuencias del gen *cytb* de los ácaros de México y Canadá, con el correspondiente fragmento del genoma mitocondrial completo de *Varroa destructor* reportado por Navajas *et al.* (2002), se observaron un total de 15 sitios polimórficos (en las posiciones 242, 274, 309, 533, 604, 622, 636, 638, 643, 650, 656, 675, 678, 679 y 680 como se muestra en el ANEXO 3. De las 12 muestras de ácaros colectados en las dos distintas regiones de México (MxTm y MxTr), 11 presentaron la misma secuencia (MxTm1, 2, 3, 4, 6 y MxTr1, 2, 3, 4, 5, 6) (Anexo 1), y sólo en uno se observó una secuencia distinta (MxTm5). De los 12 ácaros colectados en Canadá, de las tres distintas localidades, cinco ácaros (OnNa1, 2, 4, OnMn4 y OnTh2) presentaron la misma secuencia que los 11 ácaros muestreados en México (Anexo 1), mencionados arriba y seis (OnMn1, OnMn2, OnNa3, OnNa4, OnTh1, OnTh4) de los 12 ácaros colectados en Canadá, tuvieron secuencias distintas entre ellos y en comparación a los ácaros de México (Anexo 1). Solamente un ácaro (OnTh2) de Canadá presentó la misma secuencia que los 11 ácaros de México, mencionados arriba (Anexo 1). Para el fragmento *cytII-ATP*, de las 24 secuencias obtenidas de ácaros colectados en México y Canadá, también se observaron ocho haplotipos (Anexo 2). Al comparar los resultados obtenidos de las secuencias del gen *cytII-ATP* de los ácaros de México y Canadá, con el correspondiente fragmento del genoma mitocondrial completo de *Varroa destructor* reportado por Navajas *et al.* (2002), se observaron un total de 15 sitios polimórficos (en las posiciones 388, 390, 600, 622, 635, 637, 638, 641, 642,

645, 647, 648, 650, 651 y 653) (Anexo 4). De los ácaros muestreados en México, nueve ácaros (MxTm3, 4, 5, 6, MxTr2, 3, 4, 5, 6) presentaron la misma secuencia (Anexo 2) y sólo en uno (MxTm2) presentó una secuencia distinta. Seis (OnTh1, OnTh2, OnTh4, OnMn1 y OnMn3) de los ocho haplotipos observados correspondían a ácaros de Canadá (Anexo 2), pero uno de esos haplotipos se observó en dos ácaros (OnNa4 y OnTh3). Cabe mencionar que un ácaro de Canadá (OnNa2) presentó la misma secuencia que los nueve ácaros de México (Anexo 2).

Del total de 24 secuencias muestreadas por fragmento, de los resultados de *cytb*, la muestra OnMn3 se eliminó del análisis debido a que su lectura post secuenciación era de muy mala calidad. Para el fragmento *cytII-ATP*, las muestras MxHp1, MxTr1, OnNa1 y 3, OnMN2 y 4, también se eliminaron de los análisis por la misma razón antes mencionada.

Se generaron dos árboles filogenéticos basados en el método de Neighbor-Joining para *cytb* y dos para *cytII-ATP* con *Thitarodes gonggaensis* e *Ixodes ricinus* como grupos externos, debido a que *T. gonggaensis* mostró mejores valores de bootstrapping pero *I. ricinus* está taxonómicamente más cercano a *Varroa destructor* (Figuras 4 – 7).

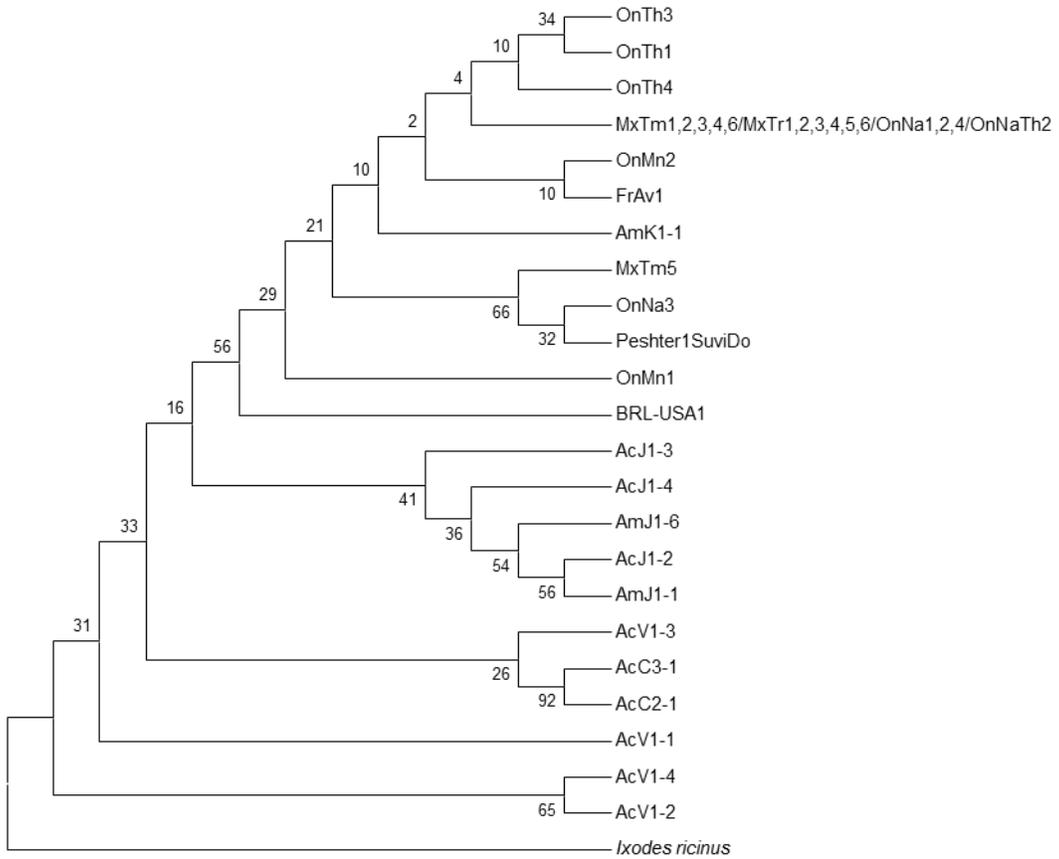


Figura 4. Relaciones filogenéticas, para el gen *cytb*, entre diferentes haplotipos de *Varroa destructor* colectados en México (MxTm/MxTr) y Canadá (OnNa, OnMn y OnTh) y haplotipos reportados de ácaros reportados en Navajas *et al.* (2010) y Gajic *et al.* (2013), con *Ixodes ricinus* como grupo externo. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neigbor-Joining. El porcentaje de árboles replicados (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA6.

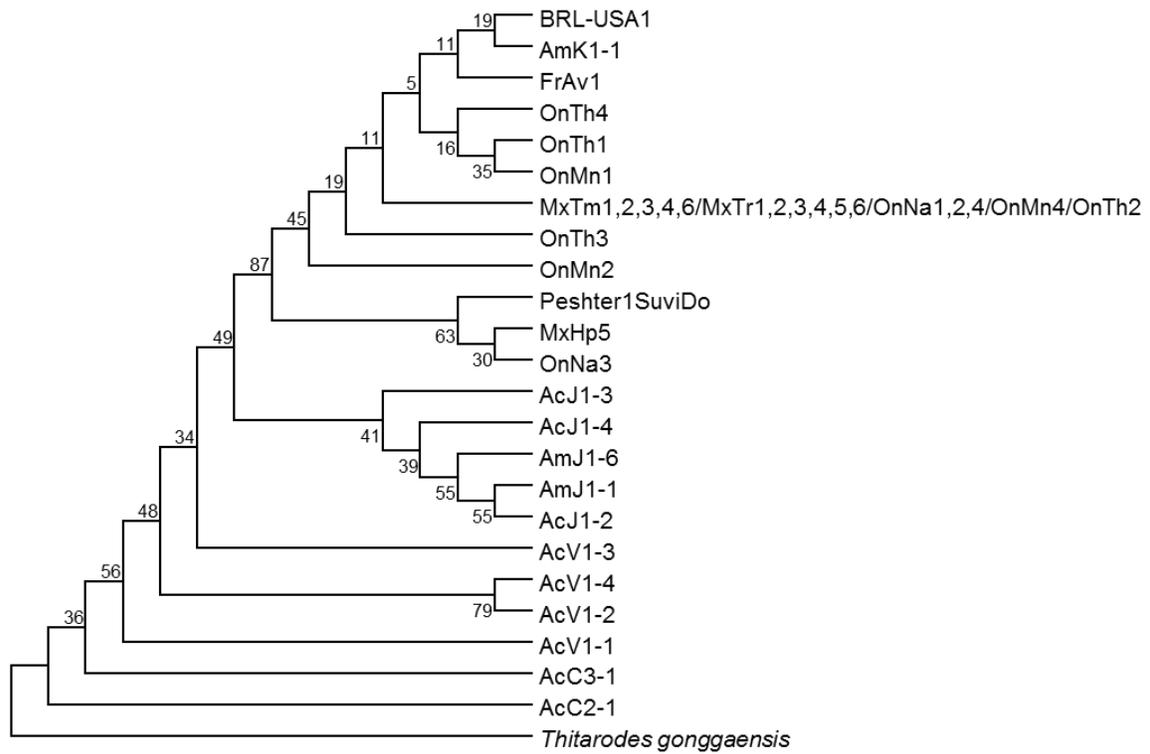


Figura 5. Relaciones filogenéticas, para el gen *cytb*, entre diferentes haplotipos de *Varroa destructor* colectados en México (MxTm/MxTr) y Canadá (OnNa, OnMn y OnTh) y haplotipos reportados de ácaros reportados en Navajas *et al.* (2010) y Gajic *et al.* (2013), con *Thitarodes gonggaensis* como grupo externo. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. El porcentaje de árboles replicados (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA6.

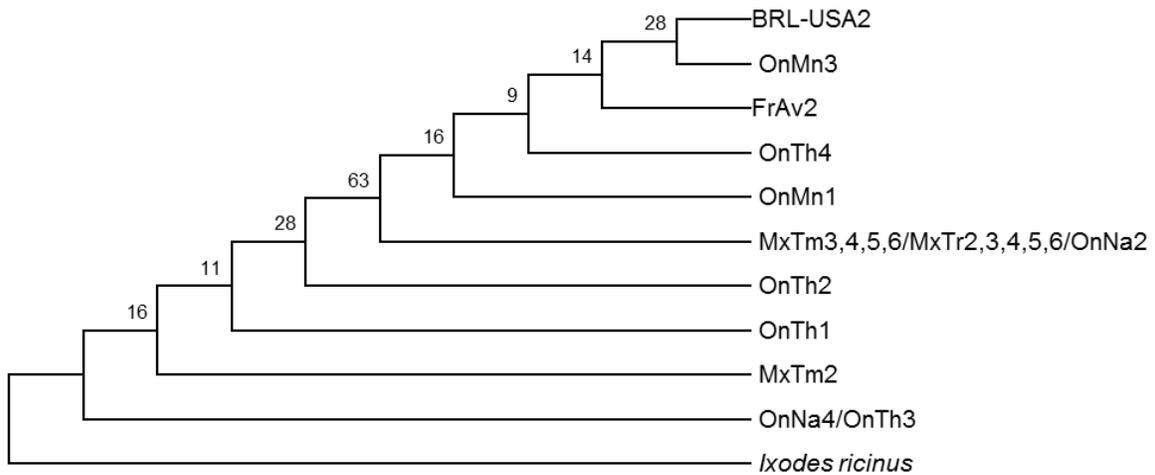


Figura 6. Relaciones filogenéticas, para el gen *cytII-ATP*, entre diferentes haplotipos de *Varroa destructor* colectados en México (MxTm/MxTr) y Canadá (OnNa, OnMn y OnTh) y con las secuencias correspondientes al mismo fragmento del genoma mitocondrial de *V. destructor* reportado por Evans y Lopez (2002) y Navajas *et al.* (2002), con *Ixodes ricinus* como grupo externo. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. El porcentaje de árboles replicados (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA6.

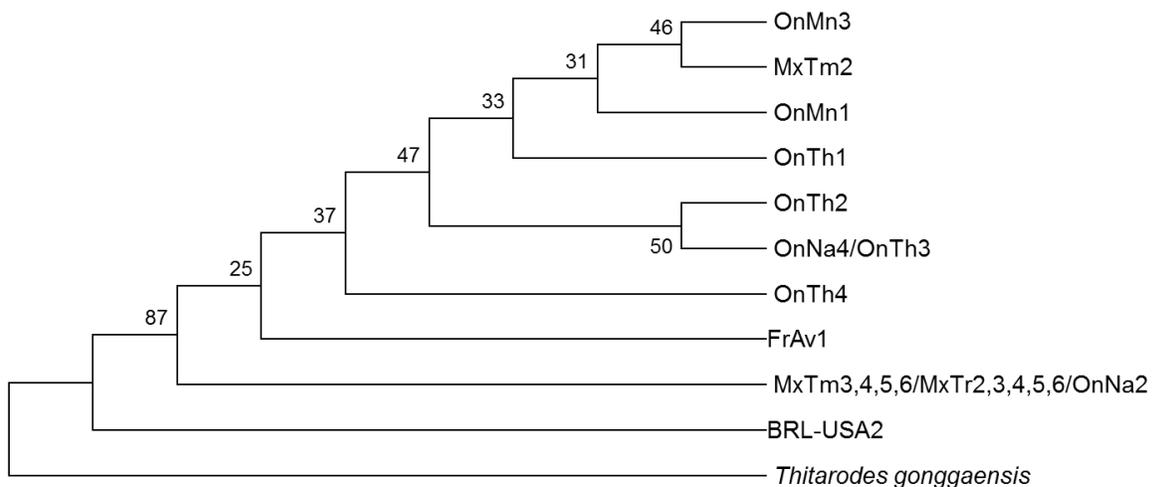


Figura 7. Relaciones filogenéticas, para el gen *cytII-ATP*, entre diferentes haplotipos de *Varroa destructor* colectados en México (MxTm/MxTr) y Canadá (OnNa, OnMn y OnTh) y con las secuencias correspondientes al mismo fragmento del genoma mitocondrial de *V. destructor* reportado por Evans y Lopez (2002) y Navajas *et al.* (2002), con *Thitarodes gonggaensis* como grupo externo. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. El porcentaje de árboles replicados (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA6.

Discusión

Se sabe que existen diversos haplotipos de *V. destructor*, de los cuales, al parecer, sólo el coreano y el japonés son capaces de reproducirse en *A. mellifera*, mientras que otros haplotipos de *V. destructor* están mejor adaptados y pueden parasitar exitosamente a poblaciones de *A. cerana* (Rosenkranz *et al.* 2010), como se mencionará más adelante. El hecho de que en una determinada región prevalezca la presencia de un haplotipo sobre otro puede deberse al efecto de “cuello de botella” que tuvo lugar al inicio de la invasión de varroa en las abejas de occidente (Solignac *et al.* 2005) debido a que se cree que existieron dos eventos independientes de colonización, uno para cada haplotipo a partir de dos haplogrupos monofiléticos distintos. Warrit *et al.* (2006) sugirieron que las poblaciones de varroa que están presentes en diferentes poblaciones de abejas, están genéticamente diferenciadas y pueden estar adaptadas a características específicas de determinados huéspedes.

La variabilidad genética de un organismo puede evaluarse desde distintos enfoques. Mediante el uso de *RFLPs*, Solignac *et al.* (2005) tipificaron el ADN mitocondrial de ácaros de varroa utilizando el sitio de restricción *SacI* de un fragmento del gen *CO-I* (Anderson y Fuchs 1998), para diferenciar entre haplotipos de varroas. En el caso de que el haplotipo coreano esté presente, el producto de PCR permanece sin digerirse por la enzima antes descrita, mientras que para el haplotipo japonés se generan dos fragmentos de digestión de 128/124 pb y 252/256 pb. En esta investigación se utilizó la misma técnica y siguiendo el mismo protocolo de Solignac *et al.* (2005), y se logró identificar al haplotipo coreano en todas las muestras analizadas. Este es el primer estudio que publica resultados de determinación de haplotipos de *V. destructor* en México colectados en dos regiones, de clima templado y tropical. Es posible que la presencia del haplotipo coreano en colonias de abejas melíferas en México se deba a la habilidad del ácaro de colonizar y reproducirse en las abejas de manera exitosa asegurando así su existencia.

Existen ocho haplotipos de *V. destructor* que parasitan a *Apis cerana*. Sin embargo, solamente el haplotipo japonés y el coreano han logrado parasitar exitosamente a *Apis mellifera* (Anderson y Trueman 2000, Solignac *et al.* 2005). Actualmente el haplotipo coreano es el más común y se encuentra presente en Europa, Este Medio, África, Asia, Norte y Sur de América, mientras que el haplotipo japonés es menos común y sólo ha sido reportado en Japón, Tailandia, Brasil (Guerra *et al.* 2010), Puerto Rico (de Guzman y Rinderer 1997, Strapazzon *et al.* 2009), Estados Unidos y Canadá (de Guzman y Rinderer 1999). La amplia distribución del haplotipo coreano de *V. destructor* pudiera tener relación, en primer instancia, con el evento de cambio de huésped del ácaro, y de sus mecanismos de esparcimiento a nivel mundial, debido en parte a la introducción de *Apis mellifera* en diversas regiones del mundo por su importancia en la apicultura. También se puede deber al contacto y convivencia de la abeja de occidente con *Apis cerana* en una misma región geográfica, incluso en un mismo apiario. El efecto de cuello de botella, que sufrieron los ácaros de *V. destructor*, al momento del cambio de huésped (Solignac *et al.* 2005), se caracteriza por una marcada reducción en el tamaño de una población debido a eventos medioambientales lo que provoca una reducción en la variación de la reserva genética de una población, la cual irá incrementando paulatinamente con el paso del tiempo a medida que se desarrollan mutaciones al azar. Esto puede explicar, en parte porqué algunos haplotipos pueden parasitar a una población de abejas y no a otra, y porque los haplotipos coreano y japonés son considerados dos clones aislados (Navajas *et al.* 2010). Las consecuencias de dicho efecto, provocan que las poblaciones sean menos aptas a sobrevivir cambios medioambientales selectivos. En el caso de varroa, debido a la introducción de *Apis mellifera* a regiones donde no era nativa, y al cambio de huésped de *V. destructor*, así como a la constante movilización de abejas, las poblaciones de ácaros sufrieron una separación reproductiva por motivos geográficos provocando lo que se conoce como efecto fundador. El efecto fundador se presenta cuando una pequeña población, en este caso de ácaros de *V. destructor*, cuyo huésped original era *Apis cerana*, logran colonizar exitosamente a un nuevo huésped, *Apis mellifera*. Debido

a esto es posible que los haplotipos coreano y japonés sean los únicos haplotipos de *V. destructor* que logren parasitar a *Apis mellifera*, así como a la dinámica de introducción de los ácaros a este continente. La invasión del haplotipo japonés parece haberse dado a partir de Japón, desde donde los ácaros se empezaron a distribuir para luego estar presentes en Paraguay, Argentina y Brasil (de Jong *et al.* 1982); a Norteamérica posiblemente llegaron de Europa en abejas importadas ilegalmente. Se ha especulado que la introducción del haplotipo coreano a Brasil y Argentina posiblemente se debió a la importación de reinas europeas provenientes de los Estados Unidos y Europa. El haplotipo coreano pudo haber ingresado a México por la movilización e importación de abejas o reinas provenientes de diversos países con proximidad al territorio nacional, como Estados Unidos, y Canadá o posiblemente de países europeos también a través de importaciones de reinas.

El uso de *RFLPs* no debe emplearse como único marcador molecular cuando se quiere analizar la variabilidad genética de un organismo a un nivel más profundo. Su uso debe aplicarse en conjunto con otras técnicas de más fina escala como lo podrían ser los microsatélites, o la secuenciación de fragmentos de genoma. En la literatura existen relativamente pocas investigaciones que han utilizado marcadores moleculares como lo son los microsatélites para la identificación de variantes genéticas de ácaros de varroa colectados en diversas partes del mundo, pero sobre todo analizando muestras de ácaros de distintas regiones de México. Solignac *et al.* (2005) analizaron el ADN de 565 ácaros de *Varroa destructor* utilizando 13 microsatélites, de los cuales 11 permitieron la identificación de los haplotipos coreano y japonés. Tanto para el haplotipo coreano como para el japonés se registraron, en su mayoría, alelos homocigotos que presentaban variantes que se manifestaron por la adición o substracción de uno, dos o tres repetidos dinucleótidos. Es mediante el análisis del tamaño de los repetidos que lograron asignar a los haplotipos, o variantes, pertenecientes a una determinada región geográfica. Solignac *et al.* (2003, 2005) hicieron uso de una técnica basada en marcaje radioactivo para la selección de microsatélites. En

cambio, en esta investigación únicamente se amplificaron cuatro microsatélites a partir del ADN total de muestras de ácaros, y esos fragmentos fueron separados en gel de agarosa junto con un marcador molecular de 100 pb para corroborar el tamaño del microsatélite. Sin embargo, mediante este enfoque no fue posible determinar si existen variantes en el tamaño de los microsatélites (adición o sustracción de repetidos) y si los alelos se encuentran de forma heterocigota u homocigota ya que solo se puede evaluar la presencia o ausencia del marcador. El dendrógrama que se obtuvo muestra valores de bootstrap muy bajos (menores a 50), lo cual no permite hacer una inferencia certera sobre los resultados obtenidos, aunque fue posible observar una mayor variación en la agrupación de los ácaros entre las distintas localidades de Ontario, Canadá, en comparación con los ácaros colectados en el trópico y altiplano mexicanos, los cuales tendieron a agruparse conjuntamente, sugiriendo poca o nula variación entre poblaciones de *V. destructor* de estas dos regiones de México. El análisis por microsatélites en conjunto con la secuenciación o *PCR-RFLPs* podría ser una herramienta poderosa para el estudio de la variación o diversidad genética de un organismo. Una técnica más adecuada es el empleo de los microsatélites mediante marcaje fluorescente y su lectura por medio de electroforesis capilar directa en un secuenciador automatizado. Como alternativa también se puede hacer uso de electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución para identificar diferencias en los tamaños de microsatélites, aunque esta técnica ya no está siendo muy utilizada (Zane *et al.* 2002). El uso de marcadores microsatélites es una buena técnica molecular para la determinación de variantes genéticas; sin embargo, debe utilizarse una mayor cantidad de microsatélites para poder tener un diagnóstico confiable (de 30 en adelante). Actualmente existen técnicas de escala más fina como lo son los microarreglos que pudieran utilizarse para un análisis más completo de mutaciones que se puedan presentar en la secuencia genética de varroa. Es claro que en muchas ocasiones el alto costo para implementar técnicas como la descrita mencionada es el primer obstáculo a vencer.

Como una tercera herramienta para el estudio de la variación genética de varroa, en esta investigación, se procedió a realizar el análisis filogenético de dos fragmentos del ADN mitocondrial (*cytb* y *cytl-ATP*) de ácaros colectados de las regiones templadas y tropical de México, así como de tres localidades de Ontario en Canadá (Niágara, Milton y Guelph). Existen algunos estudios similares cuyo objetivo fue la identificación y análisis de variantes genéticas en ácaros de varroa colectados en diversos países. Solignac *et al.* (2005) se valieron de la secuenciación de la región del CO-I del genoma mitocondrial de *Varroa destructor* de 12 diferentes regiones geográficas. Ellos amplificaron y concatenaron las secuencias (5185 nt en total) de seis fragmentos que incluían regiones de los genes *cox1*, *cox2*, *atp6*, *cox3*, *nad3*, *nad5*, *cob* y *CR* (*control región* por sus siglas en inglés). Observaron que en 10 de las regiones analizadas el haplotipo de ácaros correspondía al coreano y en otras dos regiones el haplotipo predominante era el japonés. Las secuencias que obtuvieron para estos fragmentos eran idénticas a la secuencias correspondientes, en el genoma mitocondrial reportado por Navajas *et al.* (2002). Así fue como lograron determinar que había una diferencia de nucleótidos entre los dos haplotipos (coreano y japonés) de 0.40% y que diferían en 4.15% a la secuencia perteneciente a *V. jacobsoni*. De igual manera, Navajas *et al.* (2010) estudiaron la variación genética de los ácaros que parasitan a *A. cerana* y a *A. mellifera* en varios países de Asia, ya que se sabe que *Varroa destructor* es la única especie presente en China, Japón, Corea, Este de Rusia, Taiwán y Norte de Vietnam, mientras que en Tailandia existe en simpatría con *V. jacobsoni*. A diferencia de la presente investigación, Navajas *et al.* (2010) utilizaron dos enfoques distintos para asignar a qué tipo de haplotipo pertenecían los ácaros, amplificando y secuenciando un fragmento del gen mitocondrial *cox1* (458 pb), y comparar sus resultados con secuencias previamente reportadas. Así lograron identificar cinco secuencias idénticas correspondientes a los haplogrupos China 1 (C1), China 2 (C2), Japón 1 (J1), Corea 1 (K1) y Vietnam 1 (V1) de *Varroa destructor*. Obtuvieron una sexta secuencia que fue idéntica al haplotipo de Laos 1 (L1), que corresponde a *Varroa jacobsoni*; también observaron una séptima secuencia, no reportada

anteriormente, a la que denominaron China (C3) y que corresponde a otro haplotipo de *Varroa destructor*. Por otro lado, amplificaron cuatro fragmentos correspondientes a los genes *cox1*, *cox3*, *atp6* y *cytb* del ADN mitocondrial de *Varroa destructor*, mientras que de *V. jacobsoni*, sólo amplificaron fragmentos de los genes *cox1*, *cox3* y *atp6*. Con las secuencias obtenidas de estos fragmentos lograron identificar una mayor variación genética (66 nt polimórficos en total), y reportaron variantes dentro de los haplogrupos previamente determinados utilizando sólo el fragmento *cox1*. Reportaron la presencia de tres variantes que pertenecen al haplogrupo Corea 1 (K1-1, K1-2 y K1-4) y dos variantes del haplogrupo Japón 1 (J1-1 y J1-6), que obtuvieron a partir de ácaros de *Varroa destructor* colectados de colonias de *Apis mellifera*. De los ácaros que colectaron de colonias de *Apis cerana*, reportaron una variante del haplogrupo K1 (K1-3), tres variantes de J1 (J1-2, J1-3 y J1-4), dos variantes de V1 (V1-1 y V1-2), una variante de C2 (C2-1) y una de C3 (C3-1); todos estos resultados se obtuvieron de ácaros provenientes de regiones del noroeste de Asia. Al analizar ácaros de Tailandia, donde se sabe que coexisten ambas especies de varroa, pudieron identificar dos variantes de Vietnam (V1-3 y V1-4) y dos de Laos (L1-1 y L1-2), en ácaros que parasitan a *Apis cerana*. En resumen, con el empleo de las secuencias obtenidas a partir de fragmentos de los genes mitocondriales previamente descritos, Navajas *et al.* (2010) lograron reportar variantes de los haplotipos coreano y japonés que sólo parasitan a *Apis mellifera* pero no a *Apis cerana* o a ambos. En otro estudio realizado por Gajic *et al.* (2013) con la finalidad de analizar la variabilidad genética de los ácaros que parasitan a *Apis mellifera* en nueve localidades de Serbia, también se amplificaron y secuenciaron los mismos cuatro genes, antes mencionados. Así, observaron que el haplotipo coreano estuvo presente en las nueve localidades muestreadas, pero también lograron identificar dos haplotipos nuevos (Serbia 1 y Peshter 1), basándose en la variabilidad de secuencias de los genes *cox1* y *cytb*. Reportaron que tanto el haplotipo coreano como el de Serbia 1 se encontraron, en simpatria, en cinco de las nueve localidades, mientras que el haplotipo Peshter 1 sólo se observó en una localidad.

En los árboles filogenéticos que se generaron a partir de los alineamientos de las secuencias de los genes *cytb* y *cytII-ATP* podemos corroborar, hasta cierto grado, los resultados reportados por otros investigadores mencionados arriba. En el árbol para el análisis del gen *cytb*, donde se presenta a *Ixodes ricinus* como grupo externo debido a su cercanía taxonómica con *Varroa*, se puede observar que el grupo superior se agrupan todas las secuencias que corresponden al haplogrupo coreano con sus respectivas variantes o haplotipos. En dicho grupo se incluyen todos los ácaros de México y Canadá, así como al haplotipo Am K1-1, que corresponde al haplogrupo coreano (K1) previamente descrito (Solignac *et al.* 2005, Navajas *et al.* 2010). Sin embargo, en este mismo haplogrupo también se observa que recae el haplotipo Peshter1-SuviDo, el cual fue descrito por Gajic *et al.* (2013) y cuya presencia se observó en simpatria con el haplotipo coreano en ácaros presentes en varias localidades de Serbia. Aunque Gajic *et al.* (2013) identifican al haplotipo Peshter 1-SuviDo como una variante distinta a la coreana, podemos observar que su variación o diferencia con una canadiense (OnNa3), no es muy grande ya que aparecen agrupadas dentro de un mismo nodo. Todas las demás entradas de variantes genéticas en el árbol corresponden al haplogrupo japonés con sus respectivos haplotipos (J1-3, J1-4, J1-6, J1-2, J1-1) que parasitan a *Apis mellifera* y a *Apis cerana*, así como a otros haplogrupos y sus variantes (V1-3, C3-1, C2-1, V1-1, V1-4, V1-2) que solamente logran colonizar a poblaciones de la abeja de oriente.

En el árbol creado para el análisis de *cytII-ATP* no se pueden hacer grandes inferencias debido a que no existen secuencias de referencia de otros aislados de *Varroa* con los que se puedan comparar los resultados obtenidos, como en el caso del *cytb*. Sin embargo, todas las secuencias del *cytII-ATP* se agrupan en un mismo nodo que abarca la secuencia reportada por Evans y Lopez (2002) como se muestra en la Figura 6. Sin embargo, tanto para el gen *cytb* como para el *cytII-ATP*, se puede corroborar en cierta medida, la sola existencia del haplogrupo coreano de *Varroa destructor* en colonias de abejas melíferas en México y

Canadá, gracias a los resultados de los RFLP's y a las relaciones filogenéticas que se infirieron en base a los polimorfismos de las secuencias mitocondriales.

La principal diferencia entre las investigaciones antes mencionadas y el presente trabajo, recae en el hecho de que en esta investigación no se procedió a secuenciar el gen *COI*, pero sí se realizaron RFLP's, mediante las cuales se logró determinar que el haplotipo presente en las muestras de México y Canadá pertenecen al haplotipo coreano. En base a los resultados obtenidos por la secuenciación del gen *cytb*, podemos concluir que existen variantes genéticas dentro del haplogrupo coreano. Todas las secuencias del gen *cytb* pertenecientes a ácaros muestreados en México cayeron dentro de un mismo haplotipo, y cuatro secuencias más de Canadá demostraron pertenecer a éste mismo grupo, lo cual se observa en el árbol filogenético presentado en las Figuras 4 y 5. Cabe destacar que, al parecer, existen seis haplotipos en los ácaros muestreados en Canadá pertenecientes a las tres distintas regiones, Niagara, Milton y Guelph (OnNa3, OnMn2, OnTh1, OnTh3, OnTh4) como se muestra en las Figuras 4 y 5. Asimismo, todas las secuencias obtenidas de ácaros de varroa tanto de México como de Canadá pertenecen al haplotipo coreano reportado por Evans y Lopez (2202) de muestras provenientes de Maryland, Beltsville en los Estados Unidos, incluyendo una secuencia perteneciente al haplotipo Peshter 1 SuviDo reportado en Serbia (Gajic *et al.* 2013) y el haplotipo AmK1-1 reportado en Corea-Seoul por Navajas *et al.* (2010). Dentro de este mismo grupo se encuentra la secuencia reportada por Navajas *et al.* (2002) proveniente de ácaros de Avignon en Francia.

Por otro lado se observa que casi todas las secuencias reportadas en *Apis mellifera* y *Apis cerana* cae en mismo grupo, el cual a su vez se divide en dos, agrupando aquellas secuencias pertenecientes al haplogrupo Japonés (Japón y Tailandia), y otro agrupando ácaros pertenecientes a regiones de Tailandia, Vietnam y China.

Al hacer el análisis de las secuencias obtenidas para los ácaros de México y los de Ontario se observó que la mayoría de éstas secuencias registraron un mayor grado de similitud a la secuencia de Navajas *et al.* (2002) quienes utilizaron ácaros provenientes de una colonia de abejas mantenida en la Estación de Zoología del Instituto Nacional para la Investigación Agrícola de Francia (INRA por sus siglas en inglés) en Avignon, Francia, mientras que Evans y Lopez (2002) utilizaron ácaros del apiario perteneciente al Laboratorio de Investigación Apícola de Beltsville, Maryland en Estados Unidos. Podríamos pensar que los resultados de las secuencias de los ácaros muestreados de México y de Ontario tendrían mayor similitud con la secuencia de Evans y López (2002) debido a la proximidad que tienen ambos países con Estados Unidos, a partir de donde se pensaría que varroa invadió nuestro territorio y no que su vía de ingreso fuera a través de ácaros provenientes de Europa (Avignon, Francia).

En conclusión se propone que en estudios consecuentes se analice la variación de las secuencias de los mismo genes reportados por otras investigaciones pero tomando en cuenta un mayor número de ácaros y precedentes de distintas regiones de México. Asimismo, se pueden analizar otras partes del genoma mitocondrial, en busca de mejores marcadores moleculares, o que permitan un análisis más robusto de la variación genética pero sabemos que uno de las principales problemas con los que se tiene que lidiar al momento de analizar el genoma mitocondrial de varroa son los porcentajes de las bases nitrogenadas de adenina (39.2%) y timina (40.9%) presentes en la secuencia genética, lo que dificulta la selección de iniciadores adecuados que permitan la correcta amplificación de fragmentos genéticos.

El uso de marcadores microsatélites también es una buena técnica molecular para la determinación de variantes genéticas, sin embargo deben utilizarse una mayor cantidad de marcadores para poder tener un diagnóstico confiable. Actualmente existen técnicas de escala más fina como lo son los microarreglos, ya utilizados en otros organismos (Salama *et al.* 2000; Cutler *et al.*

2001; Wang *et al.* 2002; Huber *et al.* 2002; Carter 2007; Greenhall *et al.* 2007; Hänzelmann *et al.* 2013) que pudieran utilizarse para un análisis más completo de mutaciones que se puedan presentar en la secuencia genética de varroa.

Es claro que en muchas ocasiones el alto costo para implementar esas técnicas es el primer obstáculo a vencer. Se propone seguir haciendo uso de estas técnicas, así como de muestreos a gran escala, para seguir estudiando las variaciones genéticas que existen en los ácaros que parasitan a *A. mellifera*, lo cual permitirá conocer cuál y cómo ha sido la dispersión del ácaro a nivel mundial. Al conocer las variantes de *V. destructor* que existen en diferentes poblaciones de abejas melíferas se puede determinar cuáles pudieran ser los factores que influyen en el equilibrio huésped-parásito se ha establecido en algunas poblaciones de estos organismos y por qué en otras el impacto del ácaro sobre las abejas es mayor. Es necesario conjuntar una serie de factores como lo son la resistencia a mitocidas, factores medio ambientales y geográficos, factores genéticos tanto de varroa como de las abejas, etc. que interactúan y tienen influencia en la diversidad genética.

La presencia del haplotipo coreano en las colonias de abejas melíferas en México, y en el mundo, representa un serio problema para la apicultura debido a su aparente alto grado de patogenicidad, en comparación con el haplotipo japonés (Delfinado-Baker 1988, de Guzman y Rinderer 1999). Podemos observar que el proceso de selección hace que se favorezca la presencia de un determinado haplotipo, evidencia de esto es la presencia a nivel mundial del haplotipo coreano sobre otros que parecen no lograr parasitar a *Apis mellifera* o que representan una menor amenaza para las abejas como el haplotipo japonés gracias a su bajo nivel de patogenicidad.

Capítulo II

Efecto del ácaro parasitario *Varroa destructor* A. en el desarrollo y tiempo de vida de abejas melíferas africanizadas

Introducción

La apicultura mexicana se ha logrado desarrollar por el esfuerzo y dedicación de pequeños y medianos productores, que han conseguido ubicar a nuestro país en el mercado internacional. La apicultura mexicana beneficia de forma directa a 40,000 apicultores y de forma indirecta a 400,000 familias con el amplio mercado de los productos y subproductos que se obtienen de las abejas. Además se estima que en nuestro país, por concepto de polinización, las abejas proporcionan un valor de \$212 mil millones de dólares (Gallai *et al.* 2009).

La ectoparasitosis causada por el ácaro *Varroa destructor* representa el problema más grave para la apicultura a nivel mundial ya que de alcanzar niveles de infestación altos en abejas adultas (5% o más) puede provocar la mortalidad de gran cantidad de colonias (Rosenkranz *et al.* 2010), así como una disminución en la productividad (Arechavaleta-Velasco y Guzmán-Novoa 2000; Murilhas 2002; Medina-Flores *et al.* 2011; Emsen *et al.* 2014). *Varroa* es un ácaro de forma ovalada y aplanada de 1.1 mm de largo y 1.5 mm de ancho, de coloración rojiza-café. Se reproduce en la cría de las abejas y se alimenta de la hemolinfa de larvas, pupas y adultas de abejas obreras y zánganos principalmente (Sammataro *et al.* 2000). El ciclo biológico de *varroa*, inicia con su introducción en las celdas de larvas de abejas obreras y zánganos horas antes de que éstas sean operculadas para la continuación del desarrollo y metamorfosis de la cría de abejas. Una vez dentro de la celda y 70 horas *post* operculación, el ácaro hembra pone un huevo que dará origen a un ácaro macho y posteriormente depositará huevos cada 30 horas que darán origen a ácaros hembras, por lo que *varroa* experimenta una reproducción hermano-hermanas o adelfogamia (Rosenkranz 2010).

La reproducción de varroa está muy relacionada con el desarrollo de la cría de abejas. La secuencia de los huevos macho y hembra de varroa depende de señales que son emitidas por la etapa de desarrollo de las larvas y pupas de las abejas (Garrido y Rosenkranz 2003). El éxito de reproducción de varroa depende en parte del número de hijas adultas apareadas y viables producidas durante un ciclo reproductivo, dentro de una celda de cría de abeja. Finalmente, los ácaros hembra que alcanzan la madurez sexual salen sobre el cuerpo de las abejas adultas recién emergidas, con lo que inician la fase forética, y mediante las abejas adultas se desplazan hacia otras celdas de crías para continuar con su reproducción.

Una vez que varroa infesta por primera vez a una colonia de abejas, sus poblaciones crecen exponencialmente en pocos años. Sin embargo, el crecimiento poblacional de varroa es altamente variable y depende de ciertas características del huésped que tienen influencia en la tasa de reproducción y en la mortalidad de este ácaro (Fries *et al.* 1994; Calis *et al.* 1999). Algunas de estas características son la cantidad de cría disponible, sobre todo de zánganos, la enjambrazón, así como la eficiencia del comportamiento de acicalamiento e higiénico de las abejas, etc. Otro factor que influye en la dinámica poblacional de varroa es la deriva, que se presenta cuando en una región hay una alta densidad de colmenas por lo que se presenta un intercambio de ácaros cuando abejas pecoreadoras o zánganos entran en colonias que no son las propias, o cuando hay pillaje (robo de néctar y polen). Este efecto de re-infestación hace que en algunas colonias se reduzca el número de ácaros mientras que otras tendrán niveles de infestación mayores, principalmente en épocas de bajo flujo de néctar cuando el pillaje se vuelve más frecuente y las colonias de abejas que tienen alta población experimentarán un incremento en la población de ácaros mucho mayor que las colonias débiles.

Otro factor que puede influir en la dinámica poblacional de varroa es el clima. Existen diferencias significativas en la cantidad de varroas presentes en colonias de abejas que se encuentran en climas templados con respecto a las que

están en climas tropicales. Hay publicaciones que indican que en condiciones de clima templado, las colonias infestadas por varroa pueden perderse en tres o cuatro años después de la primera infestación. En regiones con clima tropical o subtropical, la población de los ácaros tiende a disminuir o su crecimiento es menor (De Jong *et al.* 1984; Moretto *et al.* 1991; Eguaras *et al.* 1995; García-Fernández *et al.* 1995; Rosenkranz *et al.* 2010). Este fenómeno es sorprendente debido a que en climas tropicales la disponibilidad de cría se mantiene casi todo el año por lo que la reproducción de las varroas se mantiene de manera continua a diferencia de regiones con climas templados en los cuales el invierno provoca que se interrumpa el ciclo reproductivo.

La parasitosis por varroa tiene un efecto negativo sobre la salud de las abejas, al ser causa de estrés biológico que las afecta a nivel individual y a nivel de colonia (Le Conte *et al.* 2010). El ácaro ocasiona que las pupas presenten bajo volumen de hemolinfa y bajo contenido de proteínas y carbohidratos (Bowen-Walker y Gunn 2001; Contzen *et al.* 2003; Amdam *et al.* 2004; Rosenkraz *et al.* 2010). Consecuentemente las abejas adultas recién emergidas presentan reducción de tamaño corporal, deformación de alas, debilidad, degeneración del tejido adiposo y poco desarrollo de las glándulas hipofaríngeas, lo que en conjunto conlleva a una disminución en su rendimiento y en su ciclo de vida (De Jong y De Jong 1983; Kovac y Crailsheim 1988), y por consiguiente su mortandad (De Jong 1997). Adicionalmente a los daños morfológicos y fisiológicos, las abejas se ven inmunosuprimidas (Gregory *et al.* 2005; Yang y Cox-Foster 2007; Genersch y Aubert 2010), lo cual provoca que sean aún más susceptibles a otros padecimientos de origen bacteriano, fungal, viral, etc. (Le Conte *et al.*, 2010; Rosenkraz *et al.* 2010).

Yang y Cox-Foster (2007) observaron que el efecto a nivel individual con mayor impacto por la infestación con varroa es la pérdida de peso. El peso corporal de una abeja obrera libre de varroa va de 103.82 a 110.40 mg (106.97 mg), debido a diferencias en el tamaño de las celdas y la fortaleza de la colonia

(Winston 1987), y disminuye hasta 92.50 a 97.57 mg (95.02 mg en promedio) con una reducción del peso de 9.45 a 12.43%. En zánganos, el peso normal va de 135.64 a 140.25 mg (137.89 mg en promedio) y se reduce a 121.92 a 126.70 mg (123.63 mg en promedio) cuando están infestados con uno a tres ácaros, con una reducción de peso de 10.33% en promedio (Kotwal y Abrol 2009). La alimentación de varroa, a partir de la hemolinfa de las abejas, reduce significativamente el peso corporal de las abejas y la cantidad de proteínas solubles en abejas recién emergidas; las abejas infestadas pierden aproximadamente 18% del total de proteínas solubles al momento de emerger en comparación con abejas libres de varroa. Hay publicaciones que describen cambios en contenido de azúcares y proteínas en abejas infestadas, así como alteraciones en los hidrocarburos cuticulares (Bowen-Walker y Gunn 2001; Salvy *et al.* 2001).

Por otro lado, existen diversos estudios que documentan una mayor tolerancia hacia la parasitación por varroa en las abejas africanizadas y sus híbridos en comparación con las abejas europeas (De Jong *et al.* 1984; Guzmán-Novoa *et al.* 1999; Medina-Flores *et al.* 2014). En Brasil existen colonias de abejas africanizadas que han mantenido niveles de infestación estables, menores al 5%, desde 1978 (Gonçalves 1986; Rocha y Almeida-Lara 1994). Se han reportado coexistencias de este tipo entre *Apis mellifera* y *Varroa destructor* en diferentes tipos de clima y con distintos genotipos de abejas y ácaros (Eguaras *et al.* 1995, Moretto *et al.* 1995; DeJong y Soares 1997; Fries *et al.* 2006, Fries y Bommarco 2007; Seeley 2007; Le Conte *et al.* 2007). Sin embargo, aún con niveles de infestación bajos la tasa de mortalidad de las abejas en desarrollo puede ser relativamente mayor que en aquellas colonias de abejas menos infestadas. De Mattos y Chaud-Netto (2011) demostraron que en colonias de abejas africanizadas en Brasil, las tasas de mortalidad debido a los efectos negativos provocados por varroa fueron 2.28 y 2.65 veces mayores en pupas y larvas de abejas africanizadas, respectivamente. Asimismo, De Jong y De Jong (1983) reportaron que el promedio de días de la longevidad de abejas africanizadas en Brasil, es 50% menor en abejas infestadas y a medida que el nivel de infestación

aumenta, el promedio de días de supervivencia disminuye. Ellos reportaron que los coeficientes de correlación entre el número de ácaros y la longevidad de las abejas ($r = -0.25$, $n = 169$), así como el número de ácaros y el peso corporal de las abejas ($r = -0.49$, $n = 169$) son altamente significativos ($P < 0.001$) en ambos casos.

Como se mencionó y demostró en el capítulo anterior mediante los análisis con *RFLPs* y la secuenciación de dos fragmentos del ADN mitocondrial de varroa, de los dos haplotipos que logran parasitar a *Apis mellifera*, sólo el coreano, que es el más patógeno, está presente en las abejas melíferas de las dos regiones muestreadas de México.

Por otro lado, en la única investigación publicada realizada en México, Romero-Vera y Otero-Colina (2002) llevaron a cabo un estudio en Texcoco, Estado de México, para conocer el efecto individual e interactivo de *Varroa destructor* y *Acarapis woodi* en el peso y longevidad de abejas obreras africanizadas. Ellos reportaron que no hubo interacción significativa de especie de ácaro en la longevidad de las abejas infiriendo que no hay efecto aditivo en las abejas cuando se parasitan sucesivamente por *Varroa destructor* y *Acarapis woodi* en pupas y adultas, respectivamente. Sin embargo, sí demuestran que existe una disminución en la longevidad de las abejas a medida que incrementa el nivel de infestación por varroa, en al menos una de cuatro colonias analizadas. Romero-Vera y Otero-Colina reportaron que el número promedio de días de supervivencia de las abejas africanizadas sin presencia de varroa fue de 35.10 días y disminuyó hasta 21.25 días en promedio cuando la colonia de abejas presentaba niveles de infestación por celda de cuatro ácaros o más (incluyendo hembras adultas y deutoninfas). Sin embargo, en las otras tres colonias analizadas no encontraron diferencias significativas entre las colonias de abejas no estaban infestadas y las que presentaban cuatro ácaros o más. Por ello, puede decirse que sus resultados no fueron concluyentes y queda la interrogante de qué tan dañino es *V. destructor* en las abejas melíferas de México.

Por lo anterior, se llevó a cabo el presente estudio para analizar el efecto que tiene varroa directamente sobre la mortalidad, longevidad y daños estructurales de las alas en abejas melíferas africanizadas en México.

Hipótesis

El ácaro *Varroa destructor* reduce significativamente el número de abejas que logran emerger como insecto adulto así como el tiempo de vida de las abejas melíferas africanizadas en México.

Objetivo

Investigar el efecto del parasitismo de *Varroa destructor* sobre el desarrollo y tiempo de vida de abejas melíferas africanizadas en México.

Materiales y métodos

Área de estudio

Se trabajó con abejas africanizadas del Centro de Educación Ambiental (CEA) “Acuexcomatl” localizado en el pueblo de San Luis Tlaxialtemalco de la Delegación Xochimilco en el Distrito Federal.

Colonias altamente infestadas por *Varroa destructor*

Se seleccionaron cinco colmenas del apiario del CEA en México y se les diagnosticó el nivel de infestación de *Varroa destructor* usando la metodología descrita por De Jong *et al.* (1982). Se seleccionaron aquellas que presentaban altos niveles de infestación (>5%) para que sirvieran como fuente de ácaros para la infestación artificial de larvas recién operculadas.

Colonias libres de *Varroa destructor*

Basándose en los resultados del diagnóstico del nivel de infestación, se seleccionaron las dos colmenas con el nivel de infestación más bajo y se procedió a medicarlas con tiras de Apistan[®], cuatro semanas previo al inicio del experimento, para asegurarnos que no tuvieran varroas ya que estas colmenas sirvieron como proveedoras de panales con cría recién operculada (larvas de quinto instar) y libres de varroa para el experimento. Estas colonias se mantuvieron dentro del mismo apiario pero separadas del resto de las colmenas, sobre todo de aquellas con altos niveles de infestación. Para corroborar que las colmenas estuvieran libres de varroa al momento del experimento, se estuvo monitoreando la ausencia de varroas colocando una cartulina blanca con manteca vegetal y se observaba la caída de varroas debido al tratamiento acaricida. En un principio, estas cartulinas se revisaron cada tercer día, y posteriormente de manera diaria para confirmar que no existieran más varroas.

Obtención de ácaros

Para la obtención de ácaros se seleccionaron panales con cría operculada (pupas de ojos blancos o morados) provenientes de las colonias altamente infestadas. Se colocó una cartulina blanca sobre una superficie dura y plana. Luego se procedió a desopercular toda la cría, utilizando unas pinzas entomológicas de punta recta para remover por completo el opérculo, y una vez abiertas las celdas, el panal se giró para que la cara del panal con la cría desoperculada quedara sobre la cartulina blanca. Con mucho cuidado y en un solo movimiento se procedió a dar un golpe fuerte sobre la cartulina para provocar la salida de las pupas junto con los ácaros de *V. destructor*. Finalmente, con ayuda un pincel de cerdas finas, se colectaron los ácaros y se mantuvieron en una caja de Petri hasta su utilización.

Se optó por utilizar este método de colección de varroas y no el que emplea éter junto con el sacudido de abejas adultas, porque los ácaros debían ser utilizados de manera inmediata posterior a su obtención, ya que no era ideal esperar (alrededor de tres horas o más) a que éstos se recuperaran de la anestesia para proceder a infestar a la cría. Otro factor de decisión para elegir este método de colecta fue que, basándose en previas experiencias propias, se obtiene un porcentaje de mortalidad de ácaros mucho menor en comparación al empleado con el éter y sacudido.

Grupos experimentales

De los panales provenientes de las colmenas libres de varroa se seleccionaron 150 celdas de crías (larvas) recién operculadas (menos de 24 horas post operculación) por cada grupo experimental. Para la identificación de dichas larvas, se revisaron los panales que contenían cría y se identificaron aquellas celdas que contenían larvas de aproximadamente cuatro a cinco días de edad. Se colocó un acetato sobre el panal y con ayuda de un plumón se delimitó el área donde se encontraban estas celdas. Finalmente, se estuvieron monitoreando los

panales, tres veces al día, para observar que las celdas seleccionadas estuvieran recientemente operculadas (menos de 24 horas). Cada grupo experimental (150 larvas por cada uno) se sometió a los siguientes tratamientos:

1) Grupo testigo 1

Estas celdas se desopercularon, en forma de media luna, con ayuda de una navaja de afeitar, siguiendo el contorno de la celda. El opérculo se regresó a su posición inicial; es decir, cubriendo el contorno de la celda y entonces se selló con un poco de cera líquida, utilizando un pincel de cerdas finas, siguiendo el contorno de la celda. Las celdas correspondientes a cada grupo experimental se marcaron con un plumón de aceite para su fácil identificación.

2) Grupo testigo 2

Las celdas no fueron manipuladas de ninguna manera, solo fueron tocadas con el pincel e identificadas como se describe arriba.

3) Grupo con infestación

Estas celdas se desopercularon de la misma forma antes mencionada y se introdujeron dos ácaros por celda usando un pincel de cerdas finas (simulando la infestación natural del ácaro). Finalmente se procedió a sellar el opérculo con cera líquida y a identificar las celdas de la manera mencionada anteriormente (Figura 8).



Figura 8. Panal con celdas operculadas. Se observa la manera en que se sellaron las celdas con cera líquida después de haber infestado artificialmente cada celda con dos varroas y la manera en que se marcaron con un plumón de color (verde).

Panales con malla y jaulas

Para delimitar el área de las celdas tanto del grupo testigo como del grupo infestación, se colocó incrustada en el panal una malla con orificios de 3 mm x 3 mm sobre cada grupo experimental, manteniendo una separación de un centímetro con la superficie de los opérculos, con el fin de permitir que las abejas tuvieran espacio al momento de emerger (Figura 9). Los panales tratados se mantuvieron dentro de una colmena hasta un día antes de cuando se esperaba la emergencia de las abejas (nueve días). Un día previo a que emergieran las abejas se sacaron los panales con los grupos experimentales y se introdujeron en jaulas con malla (5 x 28 x 25.5 cm) que se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 32°C a 35°C y 60% de humedad relativa durante el tiempo que fuera necesario hasta que las abejas emergieran. Una vez que las abejas emergieron, se retiró la malla que las delimitaba y se contó el número de abejas

emergidas (registro de abejas emergidas) así como el número de abejas no emergidas (muertas dentro de las celdas). También se tomó registro de las abejas que presentaban alas deformes así como de la disminución del tamaño de su cuerpo (por observación directa en comparación a abejas normales). Las abejas emergidas se introdujeron en jaulas de encierro (12.7 x 8.5 x 14.5 cm) (Figura 10) con piso de malla en la parte inferior y una ventana de vidrio en la parte de enfrente para permitir la visualización de ellas. Cada jaula de encierro tenía dos alimentadores, uno para miel y otro para agua, los cuales se ofrecieron *ad libitum* hasta que se muriera la última abeja. Estas jaulas de encierro también se mantuvieron dentro de la incubadora durante el tiempo que duraron los experimentos. Para registrar la mortalidad de las abejas se contó el número de abejas muertas cada día y hasta que murieran todas, tanto de los grupos testigo como del grupo con infestación. Se realizaron tres réplicas por cada grupo experimental.



Figura 9. Panal con mallas que delimitan el área de celdas experimentales. Se muestra la manera en que fueron aislados los grupos experimentales (infestado y no infestado a la izquierda y derecha, respectivamente) de abejas africanizadas para permitir la emergencia de las mismas utilizando el método de malla sobre panal.



Figura 10. Jaula de encierro en la cual se mantuvieron las abejas africanizadas, recién emergidas, de los tres grupos experimentales.

Análisis estadístico

Los datos sobre el número y proporción de abejas que emergieron y que no emergieron de las celdas cuyas larvas fueron infestadas artificialmente con ácaros fueron comparados con los de las del tratamiento testigo 1 y con las del tratamiento testigo 2 por medio de pruebas de chi cuadrada. La misma prueba se utilizó para comparar la proporción de abejas con alas normales y dañadas entre las abejas de los grupos experimental y testigo 1. Los datos de mortalidad de abejas adultas se usaron para obtener porcentajes de supervivencia diaria y el número de días que vivieron las abejas se comparó mediante una prueba de *t* de *Student* con datos transformados a raíz cuadrada.

Resultados

Efecto de *V. destructor* en la supervivencia de cría de abejas obreras

El número y proporción de abejas obreras emergidas de celdas infestadas con ácaros de *Varroa destructor* fue significativamente menor en comparación con los grupos testigos no infestados con ácaros. La mortalidad de la cría del grupo infestado fue del 31% contra 15% y 4% de los grupos testigo 1 y 2, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número y proporción de abejas obreras emergidas de celdas infestadas y no infestadas con ácaros de *Varroa destructor*.

Variable	Cría infestada	Testigo 1 ^a	Testigo 2 ^b	χ^c	χ^d
Abejas experimentales	555	450	594		
Abejas emergidas	385	380	568		
Abejas no emergidas	170	70	26		
Proporción de abejas muertas	.31	.15	.04	31.1 P<0.0001	139.8 P<0.0001

^a Larvas en celdas no infestadas cuyos opérculos fueron abiertos y luego sellados con cera líquida

^b Larvas en celdas no infestadas cuyos opérculos no fueron abiertos

^c Comparación entre cría infestada y cría del testigo 1

^d Comparación entre cría infestada y cría del testigo 2

Efecto de *V. destructor* en la supervivencia de abejas obreras adultas

Las abejas adultas que emergieron de celdas infestadas y que estaban parasitadas con el ácaro *V. destructor* murieron más rápidamente que las abejas que emergieron de celdas no infestadas con el ácaro (testigo 1). La supervivencia diaria de las abejas fue más alta en el grupo testigo 2 a lo largo del experimento. Las abejas del grupo parasitado no vivieron más de 23 días en ninguna de las réplicas del experimento, mientras que las del grupo testigo 2 vivieron hasta 40 días (Figura 11). El promedio de vida de las abejas adultas enjauladas en la

incubadora fue de 8.5 ± 0.3 días y 14.4 ± 0.4 días en los grupos infestado y testigo 1, respectivamente; la diferencia en tiempo de vida entre ambos grupos fue significativa ($t = -10.6$, $P < 0.0001$; Figura 12).

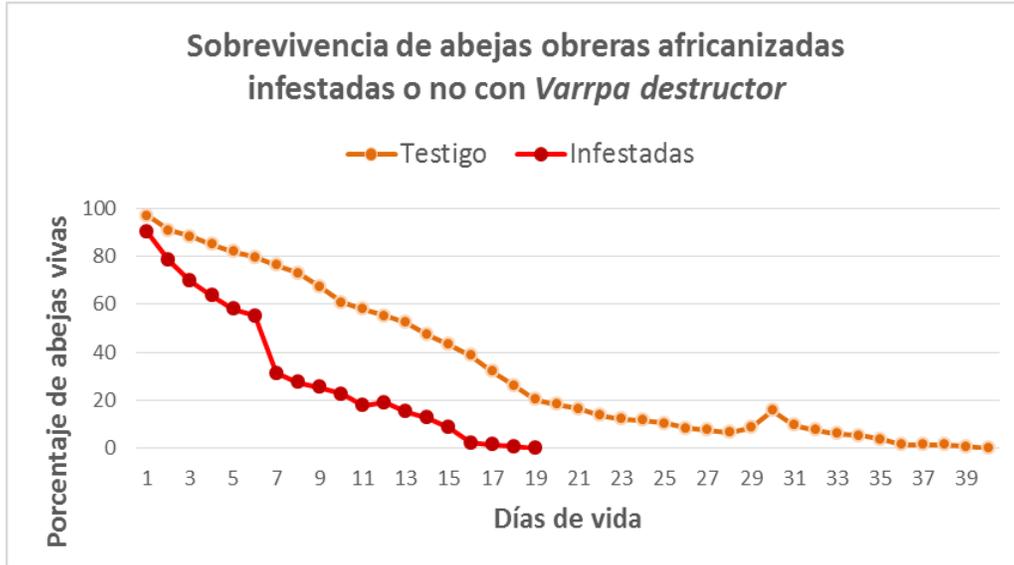


Figura 11. Porcentaje promedio de sobrevivencia de abejas obreras que se observaron durante 40 días enjauladas dentro de una incubadora después de haber emergido de celdas infestadas y no infestadas con ácaros de *Varroa destructor*.

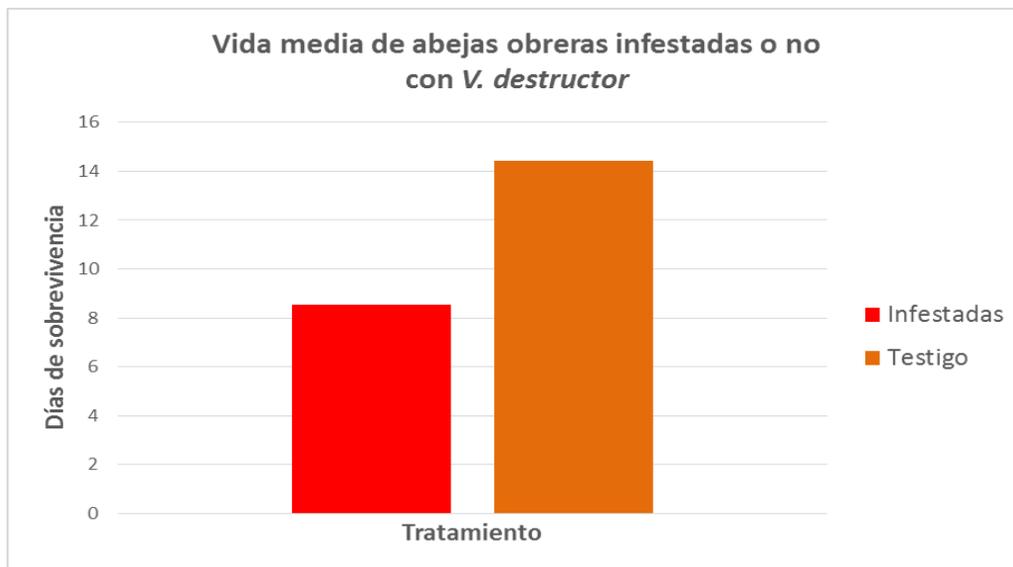


Figura 12. Vida media en días de abejas emergidas de celdas infestadas con ácaros de *V. destructor* y de abejas testigo no infestadas. Ambos grupos de abejas se mantuvieron enjaulados en una incubadora a 32°C - 35°C y con 60% de HR.

Efecto de *V. destructor* en las alas de abejas obreras adultas

El número y proporción de abejas obreras emergidas de celdas infestadas con ácaros de *Varroa destructor* que tenían las alas deformes fue significativamente diferente ($P < 0.05$) al de las abejas que emergieron del grupo testigo 1, no infestado. La totalidad de abejas observadas del grupo testigo 1 tenían alas normalmente desarrolladas a la inspección ocular, mientras que el 54% de las obreras inspeccionadas del grupo infestado mostraban daños en las alas, incluyendo la falta de ellas, desarrollo parcial y/o enrollamiento. La diferencia entre los dos grupos de abejas para esta variable fue significativa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número y proporción de abejas obreras emergidas de celdas infestadas y no infestadas con ácaros de *Varroa destructor* que tenían las alas deformes.

Variable	Cría infestada	Testigo 1 ^a	χ
Abejas experimentales	385	380	
Abejas con alas normales	177	380	
Abejas con alas deformes	208	0	
Proporción de abejas con alas deformes	.54	.00	282.0 P<0.0001

^a Larvas en celdas no infestadas cuyos opérculos fueron abiertos y luego sellados con cera líquida

Discusión

Como se mencionó anteriormente existen pocas investigaciones dedicadas al estudio del efecto que tiene varroa en el desarrollo de las abejas melíferas y de la magnitud de las consecuencias que tiene esta parasitosis en la emergencia así como en la longevidad de estas, lo cual tiene repercusiones finales a nivel individual y de colonia.

El propósito de esta investigación fue medir el daño provocado por la parasitosis de varroa en el desarrollo, emergencia, supervivencia y morfología de las abejas melíferas africanizadas en México, sometidas a la infestación artificial con varroa, y comparar los resultados con dos grupos testigos (abejas no infestadas).

En esta investigación, la proporción de larvas que se infestaron artificialmente con dos ácaros y que lograron emerger como insecto adulto fue significativamente menor ($P < 0.0001$) que aquellas larvas que no fueron infestadas (dos grupos testigo), lo cual confirma que la parasitosis por varroa tiene un marcado efecto detrimental en la emergencia de las abejas que fueron parasitadas durante su etapa de desarrollo. De 555 larvas infestadas artificialmente, 170 murieron dentro de sus celdas (31%), en comparación con 70 y 26 pupas muertas (15% y 4%) en los dos grupos testigos (pupas). De manera similar, en un estudio realizado en Brasil para cuantificar el daño que provoca *V. destructor* en colonias de abejas africanizadas con niveles de infestación naturales (del 2 al 5%), De Mattos y Chaud Neto (2011) evidenciaron la pérdida de individuos durante su desarrollo al registrar que la tasa de mortalidad de pupas de abejas fue proporcional al grado de infestación, con una interacción significativa ($P < 0.0001$). En su estudio, las colonias de abejas con un alto nivel de infestación de varroa presentaron una mayor proporción de individuos muertos durante el estado de pupa. Observaron que de 1243 pupas, en una colonia de abejas con un 5.03% de infestación de varroa, el 9.81% (122 pupas) de ellas murieron; en otras dos colonias con niveles de infestación de 3.08% y 2.92%, de 859 y 887 pupas,

respectivamente, el 9.89% y el 6.65% de esas pupas no lograron sobrevivir, mientras que en el grupo testigo (colonia de abejas con 0.20% de infestación), el 3.85% de 1220 pupas no lograron completar su ciclo de desarrollo. Estos resultados demuestran que existe una diferencia significativa entre la tasa de mortalidad de pupas con alto grado de infestación *versus* un nivel de infestación mucho menor ($P < 0.0001$). La diferencia de mortalidad de las pupas entre nuestro estudio y el de De Mattos y Chaud-Neto (2011) puede deberse a la diferencia de metodologías empleadas; por ejemplo, en esta investigación las abejas tenían por igual un mismo nivel de infestación (dos ácaros por abeja), mientras que De Mattos y Chaud-Neto (2011) analizaron la mortalidad de abejas con diferentes niveles de infestación, la cual fue “natural”, en comparación con la infestación “artificial” llevada a cabo en esta investigación. El estrés que genera la manipulación de los panales y la desoperculación y re-operculación con cera líquida pudo haber influenciado en la supervivencia de las pupas, además de la influencia propia del ácaro.

Romero-Vera y Otero-Colina (2002) llevaron a cabo un estudio similar en Texcoco, Estado de México, en el cual analizaron el efecto de varroa en la longevidad y peso corporal de las abejas infestadas. Sin embargo, una diferencia del estudio que ellos realizaron con el aquí reportado, recae en que la medición de dichas variables estaba relacionada también con la presencia de otro ácaro parasitario, el *Acarapis woodi*, que ataca a las abejas adultas, provocandoles heridas mecánicas y trastornos fisiológicos, consecuencia de la obstrucción de las vías respiratorias, lesiones en las tráqueas y disminución de la hemolinfa. Eso dificulta su análisis porque no es posible separar los efectos causados por *V. destructor* y aquellos causados por *A. woodi*. Además, ellos utilizaron abejas que ya se encontraban infestadas de manera natural por varroa, a diferencia de esta investigación en la cual la infestación se realizó de manera artificial, por lo que en su investigación se tuvo menos control de las cargas parasitarias que en esta investigación. Romero-Vera y Otero-Colina (2002) pesaron a las abejas al momento de emerger, cosa que en esta investigación no se hizo. Romero-Vera y

Otero-Colina (2002) encontraron que hubo asociación negativa y significativa entre el nivel de infestación de varroa y el peso corporal de las abejas emergidas post infestación y que la disminución del peso corporal de las abejas fue proporcional al nivel de infestación de varroa; observaron que el primer ácaro varroa en parasitar a una abeja es el que provoca una reducción mayor del peso, del 7 al 8%, que los ácaros varroa subsecuentes. Aunque en esta investigación no se midió de manera directa la reducción del peso en las abejas infestadas, más adelante se demuestra que sí existe una diferencia en el peso de las abejas que se encuentran infestadas y aquellos que no lo están. Por otro lado, aunque Romero-Vera y Otero-Colina (2002) observaron ligera reducción en la longevidad de las abejas infestadas por varroa, no encontraron una interacción significativa entre la longevidad de las abejas infestadas y no infestadas. Asimismo, no detectaron que hubiera una correlación significativa entre el peso corporal y la longevidad de las abejas infestadas o no infestadas por varroa. Aunque esta correlación de variables no fue medida en la presente investigación, dichos resultados concuerdan con los de De Jong y De Jong (1983), quienes reportaron que el peso al momento de la emergencia no tiene influencia alguna en la vida promedio de las abejas, mientras que Beetsma *et al.* (1989) sí demuestran que existe una correlación entre el peso a la emergencia y la longevidad de abejas infestadas. La diferencia de resultados obtenidos entre estos estudios puede deberse a diferencias en genotipos de abejas y metodologías empleadas. Romero-Vera y Otero-Colina (2002) concluyeron, que no existe interacción significativa entre los efectos combinados de ambos ácaros utilizados, sugiriendo que no existe un efecto aditivo del parasitismo sucesivo de un ácaro con el otro y que ninguno de los dos parásitos provocó un impacto significativo en la longevidad de las abejas. Estos resultados resultan cuestionables, en virtud de que los investigadores no pudieron separar los efectos de los dos ácaros en su investigación. A diferencia del estudio de Romero-Vera y Otero-Colina (2002), en esta investigación se estudió el efecto de una sola especie de ácaro y de manera más controlada que en el experimento de los investigadores mencionados.

Al medir la supervivencia de las abejas que lograron emerger como insecto adulto en esta investigación, se demostró que las abejas que fueron infestadas artificialmente con varroas durante su etapa larval, murieron con mayor rapidez que aquellas abejas que no fueron infestadas (testigo 1). Al evaluar la cantidad de días totales de supervivencia, se observó que las larvas de abejas africanizadas del grupo testigo 2 (larvas no infestadas y sin manipulación de opérculos) y que lograron emerger como insecto adulto, sobrevivieron casi el doble de días que aquellas abejas emergidas que se infestaron artificialmente (con dos ácaros) durante su etapa larval; 40 días versus 23 días, respectivamente. En otro estudio previo realizado por de Jong y de Jong (1983) en Brasil con abejas africanizadas se reportó que las abejas lograron sobrevivir más de 40 días cuando estas no estaban parasitadas o presentaban uno, dos o más ácaros por celda. Estos resultados concuerdan, de manera parcial, con los obtenidos en esta investigación para aquellas abejas no infestadas mientras que para las infestadas, nuestros resultados demuestran una disminución en la cantidad total de días de supervivencia de aproximadamente 50% menos. Esta variación se atribuye a la diferencia de metodologías empleadas para la infestación de las larvas (infestación artificial *versus* infestación natural) y a las condiciones en las cuales se mantuvieron las abejas adultas post emergencia. En esta investigación, las abejas recién emergidas se mantuvieron en jaulas de encierro las cuales tenían adaptadas un par de alimentadores con agua y miel, mientras que en el estudio de de Jong y de Jong (1983), las abejas se mantuvieron en colmenas de observación. Algunos factores que pudieron haber influido en la diferencia de días de supervivencia de los grupos experimentales denominados “infestados” en ambas investigaciones son que, en el caso de la presente investigación, un cierto número de abejas presentaron ausencia, deformidad o desarrollo parcial de sus alas lo cual pudo haberlas impedido para poder alimentarse por medios propios e incluso de ser alimentadas por otras abejas (trofolaxia) (Free 1957, 1959), las cuales seguramente tampoco podían alimentarse por sí mismas, reduciendo así su longevidad. En cambio, de Jong y de Jong (1983) mantuvieron a las abejas en colmenas de observación, en compañía de 3,000 abejas adicionales, lo cual pudo

haber permitido que otras abejas “sanas” lograran alimentar a las abejas “infestadas”, prolongando así su vida. Aunque generalmente la trofolaxia se asocia más con fines de comunicación entre abejas que para la alimentación entre individuos, se ha demostrado que la frecuencia y el grado de efectividad de dicha actividad disminuyen cuando las abejas se encuentran enjauladas (Korst y Velthuis 1982, Crailsheim 1998).

Otro factor a considerar que pudo haber influido en gran parte en la diferencia de días de supervivencia en el estudio de De Jong y de Jong (1983) es que en el año de su realización, el haplotipo de varroa presente o predominante en las colonias de abejas melíferas africanizadas en ese entonces era el japonés, el cual se introdujo en Brasil a principios de 1970's (Stort *et. al* 1981; Anderson y Trueman 2000), y parece ser menos virulento ya que mantenía bajos niveles de infestación y el impacto en las colonias de abejas melíferas no era tan grave. De Guzman *et al.* (1997) reportaron la distribución del genotipo japonés en Japón, Brasil, Puerto Rico y algunos estados de Estados Unidos. Carneiro *et al.* (2007) demostraron que las tasas de reproducción de *V. destructor* en la cría de abejas africanizadas en Brasil aumentó casi el doble al compararlo con registros de 20 años, lo cual al parecer se debió a un incremento del haplotipo coreano en las colonias de abejas en ese país.

Asimismo es la probable transmisión de virus, en particular el virus de las alas deformes, el cual pudo haber provocado un efecto aditivo en la disminución de la longevidad de las abejas al comprometer el estado inmunológico de las abejas y provocar más estrés en el estado fisiológico de las abejas, lo cual pudo haber repercutido en su longevidad. En Brasil, el primer estudio que evidenció la presencia de diversos virus, entre ellos el virus de las alas deformes, se publicó en 2008 (Teixeira *et al.* 2008), lo cual no precisamente quiere decir que en 1983 no existiera el virus, pero es muy probable que su prevalencia fuera menor a la que se da en la actualidad.

En esta investigación, las abejas obreras adultas que fueron infestadas en su etapa larval y que emergieron como insecto adulto, lograron sobrevivir 8.5 ± 0.3 días en promedio, mientras que las abejas correspondientes al grupo testigo 1 sobrevivieron 14.4 ± 0.4 días en promedio; diferencia que fue estadísticamente significativa ($t = -10.6$, $P < 0.0001$). De Jong y de Jong (1983) demostraron que la esperanza de vida disminuye marcadamente con el aumento en la carga parasitaria (a mayor cantidad de ácaros por celda, menor esperanza de vida). Ellos observaron que en una de dos colonias de abejas evaluadas, la esperanza de vida se correlacionó negativamente con el número de ácaros ($r = -0.314$, $P > 0.0001$) con un promedio de 2.12 ± 1.38 de ácaros por abeja infestada. Ellos demostraron que el promedio de la longevidad de las abejas adultas (infestadas durante el desarrollo pupal) fue menor que el de las no infestadas; la mediana de la longevidad de las abejas adultas infestadas fue de 7 días, menos de $\frac{1}{4}$ de las abejas testigo no infestadas, las cuales tuvieron una mediana de longitud de vida de 29 días y un promedio de 27.6 días. Estos resultados no pudieron ser contrastados en su totalidad en la presente investigación debido a que la infestación artificial que se efectuó en todas las abejas del grupo “infestado artificialmente” fue igual (dos ácaros por celda/abeja) para todas las crías. Sin embargo, los resultados de ambas investigaciones demuestran que existe un impacto importante en la supervivencia de las abejas africanizadas debido a la parasitación por varroa. Es evidente que existe diferencia en la cantidad de días en promedio de supervivencia de las abejas testigo (14.4 y 27.6 días) que puede haberse visto influenciado por las condiciones de laboratorio (infestación artificial, manipulación de opérculos, condiciones de temperatura y HR en incubadora) que se llevaron a cabo en esta investigación, a diferencia del método de de Jong y de Jong (1983), quienes basaron su estudio en infestaciones bajo condiciones naturales (sin manipulación de opérculos y panales dentro de las colmenas). Por otro lado, Beetsma *et al.* (1989) demostraron que abejas en colonias “sanas” sobrevivieron 11 días en condiciones de campo y 18 días en colmenas de observación, mientras que abejas infestadas sobrevivieron 9.8 días en campo y 13 días en colmenas de observación. Estos resultados evidencian que factores como

condiciones de campo *versus* condiciones “no naturales” (incubadora o colmenas de observación) parecen tener influencia en la longevidad de las abejas, independientemente de la parasitación por varroa. A pesar de que las metodologías empleadas en el proceso de infestación de pupas fueron diferentes en las investigaciones antes mencionadas, los resultados indican que hay una clara disminución de la longevidad de las abejas parasitadas con varroa en comparación con abejas no infestadas. Otro factor que puede influir en la diferencia de la mortalidad de abejas y días de supervivencia puede deberse a que el estudio de De Jong y De Jong (1983) se realizó cuando la presencia del ácaro en abejas del continente Americano apenas se comenzaba a reportar, así como por un efecto de resistencia/tolerancia que lleva a un posible equilibrio entre el ácaro y abejas europeas (Le Conte *et al.* 2007; Locke *et al.* 2012), que pudiera también presentarse en abejas africanizadas. El factor genético de las abejas africanizadas y su grado de resistencia hacia varroa puede haber influido en los resultados de la presente investigación. Asimismo, el factor genético de varroa, como ya se mencionó arriba también puede influir en la cantidad de días de supervivencia de acuerdo a la virulencia del haplotipo de varroa (coreano) que parasita actualmente a las abejas melíferas en México y Brasil (haplotipo definido en el primer capítulo de esta misma investigación).

El parasitismo por varroa ocasiona que las abejas que son parasitadas durante su etapa larval emerjan con alas deformes, lo cual está asociado a la infección por el virus de las alas deformes y no sólo a la infestación por varroa. En esta investigación se tomó registro de la cantidad de abejas adultas que lograron emerger y que presentaban alas “anormales”. Mientras que el total de abejas emergidas del grupo testigo 1 (larvas no infestadas) presentaron sus alas desarrolladas de manera normal, el 54% de las obreras que fueron infestadas artificialmente durante su etapa larval con dos varroas, mostraron daños en sus alas (ausencia, desarrollo parcial o enrollamiento) (Figuras 13 y 14), diferencia que resultó significativa entre ambos grupos ($P < 0.0001$). Aunque en esta investigación no se realizó la detección del VAD en abejas sanas o enfermas, el hecho de que

las abejas no infestadas no presentaran anomalías en las alas, no quiere decir que no estén infectadas por el virus ya que este puede persistir como infección latente y no provocar signología aparente. Existe evidencia de que el factor que determina la presencia de alas deformes no es la presencia o ausencia del VAD, sino la cantidad de virus presente (Bowen-Walker *et. al* 1999); es posible que abejas con bajos niveles virales no presenten la característica signología del VAD pero sí se ha demostrado que el total de abejas con alas deformes son positivas al virus (Yue y Genersch 2005). También cabe señalar que está comprobado que la deformidad de alas solo se presenta cuando las abejas se infectan durante su etapa de desarrollo, ya que cuando abejas adultas adquieren el virus, estas no muestran alas anormales (Martin *et al.* 2013).



Figura 13. Comparación en la morfología de dos abejas obreras africanizadas. Se muestran dos abejas obreras africanizadas, la superior es una abeja no parasitada por *Varroa destructor* y la inferior es una abeja parasitada por *Varroa destructor* durante su etapa de desarrollo desde el momento de la operculación de la celda hasta la emergencia de la abeja. Se observa una clara disminución del tamaño corporal de la abeja parasitada, así como la presencia de alas deformes y abdomen reducido, en comparación a la abeja no parasitada.



Figura 14. Abejas obreras adultas con daños morfológicos ocasionados por la parasitosis de *Varroa destructor*, alas normales y deformes, así como abejas con desarrollo normal y anormal del abdomen. En la parte superior se muestra una abeja no infestada durante su etapa de desarrollo y en la parte inferior se observan cinco abejas con deformidad de alas y abdomen reducido.

En cuanto a la interacción que tiene el efecto del parasitismo por varroa junto con la presencia de virus, principalmente el de las alas deformes y otros retos inmunológicos, se ha reportado que existe una diferencia en la supervivencia de las abejas. Yang y Cox Foster (2007) demostraron que abejas infestadas por varroa con y sin signos de alas deformes tienen una esperanza de vida significativamente menor que abejas libres de ácaros al momento de su emergencia cuando son expuestas a otros patógenos. Esto lo observaron al realizar varios experimentos donde exponían a abejas libres de varroa, a abejas infestadas con varroa pero sin signos de alas deformes, y a abejas con signos de alas deformes, expuestas a estímulos inmunológicos (bacterianos), inyección de solución salina, herida por punción con aguja estéril y abejas testigo (sin tratamiento), en condiciones de laboratorio.

Con todo lo descrito anteriormente, se puede afirmar que existe una pérdida significativa de abejas en su etapa de desarrollo en las colonias infestadas por varroa, que a la larga se ve reflejado en un menor número de abejas adultas lo

cual impacta en la productividad de la colonia así como en su supervivencia. Aún en climas tropicales como lo es Brasil, en donde parece que el ácaro no tiene un alto impacto en las colonias ya que no alcanza niveles de infestación altos (<5%), sí se reporta que varroa tiene un marcado efecto detrimental en la cantidad de abejas que logran llegar al estado adulto, por lo que se puede esperar que en colonias que no manifiestan un grado de resistencia a esta ectoparasitosis, el impacto sea mucho mayor. También es evidente que varroa cursa paralela con muchos otros padecimientos que afectan a las abejas y por consiguiente influyen aún más, sobre la longevidad de las abejas. Sin embargo, es difícil diferenciar los efectos de varroa y los efectos de los virus por sí solos aunque existen estudios que han demostrado que las infecciones virales pueden estar presentes de manera latente y es hasta la infestación por varroa, que los niveles de los virus aumentan y provocan infecciones mayores con signología visible. Pero se debe resaltar que el estudio de los efectos directos por la infestación de varroa en abejas “sanas” así como el conocimiento de la biología y fisiología que subyacen con esos efectos, es de vital importancia para desarrollar estrategias que ayuden a mitigar los daños causados por varroa. Concluimos que es importante realizar estudios enfocados en conocer, analizar y comprender los efectos de varroa sobre la fisiología, estructura corporal, y efectos patogénicos que afectan la proporción de abejas que logran, emerger con o sin signos provocados por la propia parasitosis; más aún, estudios comparativos entre abejas africanizadas y europeas que pudieran verse afectadas de manera diferencial gracias a ciertos mecanismos de tolerancia hacia varroa debido a factores genéticos que les confieren resistencia y que pudieran emplearse para programas de mejoramiento genético.

Capítulo III

Replicación viral en abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) africanizadas y europeas en respuesta al parasitismo por *Varroa destructor* A. o a su transmisión mecánica

Introducción

El ectoparasitismo de abejas melíferas por el ácaro *Varroa destructor*, trae como consecuencia indirecta la transmisión de diversas infecciones virales, provocando que las abejas enfermen y mueran (Martin 2001; Shen 2005a,b; Chen *et al.* 2006 a,b; Martin *et al.* 2012). *Varroa* es considerado uno de los principales factores en la pérdida de colonias en regiones templadas (Potts *et al.* 2010; Rosenkranz *et al.* 2010), principalmente por la inmunosupresión que provoca (Yang y Cox-Foster 2005, Navajas *et al.* 2008) y por actuar como vector para la transmisión de diversos virus de tipo ARN + monocatenario (Chen y Siede 2007). Algunos de los virus que han sido asociados al parasitismo por varroa también se han ligado a la mortalidad de las abejas como lo son el virus de Cachemira, el virus de las alas deformes, el virus de la parálisis aguda, el virus de la parálisis crónica, y más recientemente el virus Israelí de la parálisis aguda (Ball y Bailey 1997; Cox-Foster *et al.* 2007; Berthoud *et al.* 2010; Dainat *et al.* 2012a,b, Dainat y Neumann 2013). Existen otros virus que también están asociados al parasitismo de varroa como el virus de las celdas reales negras y el virus de la cría ensacada, los cuales parecen provocar daños menos severos a las colonias de abejas (Ball y Bailey 1997).

La relación entre la transmisión viral y el parasitismo de varroa parece ser una consecuencia de la alimentación del ácaro sobre las abejas. Una evidencia de esto es la detección del virus de Cachemira en la saliva de varroa, por lo que se supone que la saliva que se inyecta al momento de la acción mecánica de la punción del ácaro sobre la cutícula de las abejas contiene partículas virales que

son transmitidas a la hemolinfa (Shen *et al.* 2005a). Adicionalmente, varroa puede activar infecciones virales encubiertas que están presentes en las abejas, pero que no manifiestan signos, al provocar una inmunosupresión durante su parasitismo (Yang y Cox-Foster 2005, Navajas *et al.* 2008). Sin embargo, existen otras vías por las cuales los virus son transmitidos, como lo son la vía sexual (durante el apareamiento), vía alimento y heces, a través de huevos o esperma, así como por transmisión mecánica (inyección) en condiciones de laboratorio (Chen *et al.* 2006b).

Se ha reportado que hay variación en la susceptibilidad al parasitismo y reproducción de varroa en diferentes genotipos y subespecies de las abejas melíferas de occidente (Page y Guzmán-Novoa 1997; Emsen *et al.* 2012). Existen diversos estudios que han demostrado que las abejas africanizadas son más resistentes a varroa que las abejas europeas (Moretto *et al.* 1991; Guzmán-Novoa *et al.* 1996, 1999; Moretto y Mello 1999; Arechavaleta-Velasco y Guzmán-Novoa, 2001; Medina-Flores *et al.* 2014). Sin embargo, no existe información sobre si dicha diferencia también se manifiesta en diferencias de susceptibilidad a infecciones virales transmitidas por el ácaro directamente o por su transmisión mecánica. Además, se tiene poco conocimiento acerca de la etapa de desarrollo de la abeja (cría o adulta) durante la cual ésta es más susceptible a la transmisión viral así como a su replicación tanto en abejas africanizadas como en abejas europeas.

Virus en las abejas melíferas

Se conocen al menos 22 virus ARN de la familia picornavirus que afectan a las abejas (Allen y Ball 1996; Chen y Siede 2007; Genersch y Aubert 2010; Genersch 2010; Runckel *et al.* 2011) entre los que están el virus de las alas deformes (VAD), el virus de la cría ensacada (VCE), el virus de la parálisis aguda (VPA), el virus de la parálisis crónica (VPC), el virus de Cachemira (VC), el virus Israelí de la parálisis aguda (VIPA) y el virus de las celdas reales negras (VCRN). Algunos de ellos presentan una signología muy particular mientras que otros

pueden estar presentes en las abejas a nivel individual o a nivel de colonia sin provocar una signología aparente. Por lo general, los virus que atacan a las abejas permanecen como infecciones “encubiertas” si las colonias no se encuentran infestadas con varroa (Nordstrom *et al.* 1999).

Actualmente, en México se ha reportado la presencia de los siguientes virus: el virus de la parálisis crónica (Bailey 1967), el virus de las alas deformes, el virus Israelí de la parálisis aguda, el virus de la parálisis aguda, el virus de la cría ensacada (Guzmán-Novoa *et al.* 2012) y el virus de las celdas reales negras (Guzmán-Novoa *et al.* 2013).

Virus de las alas deformes

Uno de los virus que afectan a las abejas melíferas, de gran importancia por su distribución mundial, es el virus de las alas deformes (*DWV* por sus siglas en inglés) (Berenyi *et al.* 2007). Este virus pertenece al género *Iflavirus* y fue aislado en las abejas por primera vez en Japón en los años 80's (Allen y Ball 1996; Lanzi *et al.* 2006). Su presencia está estrechamente relacionada con la infestación del ácaro *V. destructor* (Gisder *et al.*, 2009; de Miranda *et al.* 2010b), el cual, al alimentarse de la hemolinfa de abejas crías y adultas, transmite el virus de manera directa (Bowen-Walker *et al.* 1999). Otra forma de transmisión es la de tipo vertical; cuando la infección se efectúa a través de los huevos o por el esperma (Chen *et al.* 2006a,b; Yue *et al.* 2007; de Miranda y Fries 2008). Chen *et al.* (2006a) han demostrado que la transmisión del VAD también puede llevarse a cabo por el alimento que las abejas nodrizas proporcionan a la cría, así como a través de la abeja reina hacia las abejas obreras (Yue y Genersch 2005).

La infección del virus se ve exacerbada debido a que hay una reducción en la transcripción de los péptidos antimicrobianos y enzimas relacionadas con la respuesta inmune de tipo humoral, cuando las abejas están infestadas por el ácaro; es decir, que el virus toma ventaja de la inmunosupresión que provoca *V. destructor* (Yang y Cox-Foster 2005). Asimismo, el crecimiento de la población de

ácaros puede provocar un incremento en la transmisión de virus por lo que de existir infecciones virales encubiertas, éstas se vuelven evidentes por la alta carga viral, pudiendo provocar la muerte de la colonia entera (Martin 2001, Martin *et al.* 2012, 2013). Las abejas parasitadas con el ácaro llegan a presentar altos niveles de ARN del virus de las alas deformes; títulos virales de hasta 20 veces más que aquellas abejas sin parasitar, (Navajas *et al.* 2008) y ese aumento puede provocar daño celular y molecular en las abejas.

Este virus es uno de los pocos que presentan una signología bastante bien definida. Las abejas infectadas con el VAD se observan encogidas, con alas arrugadas, tamaño corporal reducido, decoloración, disminución de la longevidad, y las abejas adultas sufren daños en la capacidad de aprendizaje. Bailey y Ball (1991) demostraron que en la infestación con varroa durante el estado de pupa, las abejas obreras que emergen se observan con alas deformes; sin embargo, el mecanismo por que cual se presentan estas anormalidades morfológicas aún se desconoce.

La signología de las alas deformes no sólo depende de los altos títulos virales, sino también del momento en que ocurre la infección, así como de la vía de transmisión. Sólo se observa esta característica cuando el virus se transmite directamente por varroa y durante el estado de pupa de las abejas (Bowen-Walker *et al.* 1999; Gisder *et al.* 2009; Möckel *et al.* 2011). La infección con VAD mediada por varroa, durante la etapa adulta de las abejas, no resulta en deformidad de alas (Chen *et al.* 2006a; Gauthier *et al.* 2007; Möckel *et al.* 2011).

Virus de las celdas reales negras

El virus de las celdas reales negras (VCRN) se aisló de las abejas melíferas por primera vez en prepupas y pupas de abejas reinas que se encontraban muertas dentro de sus celdas (Bailey y Woods 1977). El nombre del virus se debe a que las pupas infectadas presentan una coloración ennegrecida en las paredes de las celdas que las contienen. En un principio el virus hace que las larvas de

reinas adquieran una tonalidad amarillenta, la cual posteriormente se torna café oscuro.

Bailey *et al.* (1983) demostraron que el virus se multiplica en abejas adultas que ingieren esporas de *Nosema apis*. Se conoce que existe una correlación entre la incidencia del virus y *Nosema apis* ya que para ambos patógenos se registró un pico de la infección durante la primavera y el inicio de verano en colonias en el Reino Unido, épocas en las que es muy común su incidencia; también demostraron que al administrar el virus vía oral, su manifestación dependía de la presencia de *Nosema apis*.

Debido a que el VCRN provoca que las pupas se tornen amarillentas y que la cutícula de las pupas adquiera un aspecto de “saco” con líquido en su interior, es posible que se le confunda con el virus de la cría ensacada (VCE). Sin embargo, el VCRN afecta por lo general a pupas de abejas reinas mientras que el VCE afecta principalmente a abejas obreras (Ball y Bailey 1997; Ribière *et al.* 2008). Las abejas obreras que pudieran estar infectadas con el VCRN, normalmente no muestran signología alguna de infección (Chen y Siede 2007).

Se supone que el VCRN se esparce por medio de las abejas nodrizas cuando éstas alimentan a las larvas con alimento infectado (Allen y Ball 1996, Ribière *et al.* 2008); el virus puede permanecer viable en restos de larvas, miel y polen hasta por cuatro semanas. Otras vías de transmisión pueden ser a través del microsporidio *Nosema apis*, pero también por abejas que derivan (introducción de abejas en colonias ajenas a la de su origen) entre colmenas, agua contaminada, así como por las herramientas del apicultor. También se ha reportado que es probable que el VCRN se transmita de manera vertical, ya que se logró detectar en abejas reinas y huevos (Chen *et al.* 2006a). El virus se replica en la pared del intestino medio de la abeja adulta y posteriormente en el cerebro, y su periodo de incubación es de siete u ocho días.

Por lo general el virus se logra controlar con una adecuada nutrición, al introducir reinas jóvenes en colonias muy pobladas, rotación de panales cada tres a cuatro años, y la colocación de las colmenas en una posición que permita que les dé el sol durante el otoño, el invierno y la primavera para que las colonias se mantengan fuertes, no se sobre estresen y se reduzca la posibilidad de una infección por *Nosema* (Ribière *et al.* 2008).

Virus de la cría ensacada

White (1913) describió la enfermedad causada por el virus de la cría ensacada (VCE) y la atribuyó a una infección viral en 1917. Sin embargo, el virus se aisló por primera vez y fue identificado por Bailey (1969). El primer brote se dio en poblaciones de abejas melíferas orientales, *Apis cerana*, pero actualmente el virus tiene una distribución mundial ya que también infecta a *Apis mellifera*.

El VCE afecta principalmente a las larvas de dos días de edad, las cuales adquieren una coloración amarillenta, y quedan envueltas en la cutícula de la última muda que no se llegó a desprender formando una especie de “saco” o bolsa, el cual contiene abundante líquido de aspecto claro. Hacia el final de la infección, las larvas se deshidratan y los restos adquieren un aspecto de escama con forma de góndola. En las abejas adultas también puede estar presente el virus pero sin causar signo alguno.

El virus se replica tanto en la cría como en las abejas adultas. En la cría en desarrollo, se replica en el interior de las glándulas dérmicas que recubren todo el cuerpo de la larva y que son las encargadas de sintetizar enzimas que ayudan al desprendimiento de la cutícula durante el proceso de la muda. El VCE inhibe la secreción de esas enzimas, por lo cual, la larva no se puede deshacer de su cutícula, provocando la formación de una estructura tipo “bolsa”. En las obreras nodrizas, se replica en las glándulas hipofaríngeas. La transmisión del virus se efectúa de manera horizontal, cuando las abejas remueven larvas infectadas y las abejas nodrizas esparcen el virus al alimentar a las larvas con sus secreciones

glandulares e intercambian comida con otras abejas adultas, como las pecoreadoras, las que a su vez, van a pasar el virus hacia el polen que colectan y almacenan. Sin embargo, parece ser que el virus provoca un cambio en el comportamiento de las abejas nodrizas infectadas, ya que éstas cambian de actividad y cesan de alimentar a las crías, dejan de comer polen, y empiezan a pecorear prematuramente (sólo néctar y muy raramente polen) (Bailey y Fernando 1972).

También se ha detectado el VCE en los ácaros y en su saliva (Shen *et al.* 2005a) por lo que la transmisión de estos virus por medio de varroa es una posibilidad. Asimismo, la infección por el VCE se ha asociado a la infestación por *Varroa destructor*, ya que existen estudios que reportan que el virus se ha detectado en grandes cantidades en abejas adultas de colonias infestadas con el ácaro (Shen *et al.* 2005a; Antúnez *et al.* 2006; Berényi *et al.* 2006; Chantawannakul *et al.* 2006), lo cual puede sugerir que varroa es un transmisor potencial, aunque no se ha demostrado experimentalmente.

El virus de la cría ensacada provoca una enfermedad cuya prevalencia es de tipo estacional ya que presenta una mayor incidencia durante la primavera y el verano (Anderson y Gibbs 1988; Tentcheva *et al.* 2004).

Virus Israelí de la parálisis aguda.

El virus Israelí de la parálisis aguda se describió por primera vez en 2004 afectando colonias de abejas en Israel (Maori *et al.* 2007). Según un reporte en el 2007, se le asoció al síndrome del colapso de las colonias (SCC) en los Estados Unidos, donde la presencia del virus se consideró como un marcador estadísticamente significativo de dicho síndrome (Cox-Foster *et al.* 2007). Debido a que la presencia del virus es inaparente, se ha sugerido que está presente como una infección “encubierta” (de Miranda *et al.* 2010a). La carga viral puede influenciar el desarrollo de signos de enfermedad, por lo que se requiere que se hagan estudios que permitan diferenciar la cantidad de virus presente en aquellas

enfermedades que causan infecciones “encubiertas” respecto a las infecciones evidentes, a nivel de colonia. Una explicación para que se presente una infección de tipo encubierto es la virulencia del aislamiento. La mayoría de los aislamientos que se han reportado son poco virulentos, pues no muestran signos obvios de enfermedad, tanto a nivel individual, como a nivel de colonia (de Miranda *et al.* 2010a). Cuando la carga viral es alta, las alas de las abejas se observan temblorosas, las abejas progresan a una parálisis para finalmente morir de frente a la colmena.

El virus Israelí de la parálisis aguda, el virus de la parálisis aguda y el virus de Cachemira, están altamente relacionados (de Miranda *et al.* 2010a). Por lo general su presentación es poco evidente pero pueden ser letales tanto a nivel individual como de colonia, especialmente cuando son transmitidos por *Varroa destructor* (Todd *et al.* 2007). En pruebas de laboratorio se observó una rápida mortalidad, de tres a cinco días post tratamiento, de pupas y abejas adultas que fueron inyectadas con cargas virales (Bailey 1967a,b; Maori *et al.* 2007, 2009).

Existen diversos estudios que evidencian la asociación del ácaro con diversos virus RNA que en conjunto contribuyen al SCC, debido al esparcimiento que ha tenido varroa a nivel mundial (Cox-Foster *et al.* 2007; Carreck *et al.* 2010). Previo a la introducción de varroa, se desconocía la prevalencia natural de la carga viral y de la diversidad de cepas de los diferentes virus que infectan a las abejas (de Miranda y Genersch 2010b), lo cual es importante de remarcar ya que antes se creía que las infecciones virales eran de bajo impacto (Genersch y Aubert 2010).

Debido a la compleja y no tan clara interacción que existe entre el ácaro y los virus, se propuso esta investigación para determinar la influencia de *Varroa destructor* en la transmisión y replicación de virus en las abejas melíferas y comparar su dinámica de transmisión entre abejas europeas y africanizadas para

determinar si existe alguna variación que pudiera estar influenciada por el genotipo de abeja.

Éste es el primer estudio que hace una comparación entre cría y abejas adultas tanto africanizadas como europeas para la replicación de virus después de la transmisión mecánica por inyección de homogenizado de varroas o por transmisión natural del ácaro. Los títulos del virus de las alas deformes, el virus de las celdas reales negras, el virus de la cría ensacada y el virus Israelí de la parálisis aguda varían con el tiempo, de acuerdo al estado de desarrollo de las abejas (cría Vs adultas) y con el genotipo de la abeja afectada (africanizado Vs europeo).

Hipótesis

El ácaro *Varroa destructor* transmite y promueve de manera similar la replicación de virus en abejas melíferas africanizadas y europeas.

Objetivo

Establecer si el ácaro *Varroa destructor* favorece de manera diferencial la replicación de virus en abejas melíferas africanizadas en comparación con europeas.

Materiales y métodos

Áreas de estudio

La presente investigación se realizó en dos etapas diferentes. En la primera, se utilizaron abejas provenientes del apiario del Centro de Educación Ambiental (CEA) “Acuexcomatl” localizado en el pueblo de San Luis Tlaxialtemalco de la Delegación Xochimilco en el Distrito Federal. En la segunda etapa se trabajó con abejas europeas en el Centro de Investigación Apícola de la Universidad de Guelph en Ontario, Canadá.

Preparación de colonias experimentales

Se muestrearon las colonias del apiario del Centro de Educación Ambiental Acuexcomatl (México), recolectando 30 abejas en etanol al 70%, en las cuales se midió la longitud del ala anterior mediante el método FABIS I (*Fast Africanized Bee Identification System I* por sus siglas en inglés) (Sylvester y Rinderer 1987), para determinar su morfotipo (europeo o africanizado). De acuerdo a los resultados, se seleccionaron aquellas colonias cuyas abejas obreras tuvieron una longitud de ala promedio menor a 8.79 mm, ya que se sabe que las alas de abejas de origen africano son de menor tamaño que las de origen europeo. Asimismo, a las abejas de estas colonias se les determinó el tipo de ADN mitocondrial (ADNmt), mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para corroborar su genotipo africano (Nielsen *et al.* 2000). Del total de colonias muestreadas, se seleccionaron ocho, cuyas obreras tenían ADNmt africano, las cuales se aislaron y medicaron con el acaricida flumetrina (Bayvarol[®] de Bayer) durante seis semanas para que estuvieran libres de ácaros previo a los experimentos. En el Centro de Investigación Apícola de la Universidad de Guelph (Ontario, CA) se seleccionaron cinco colmenas que se medicaron con tiras de Apistan[®].

Posteriormente, a otras colmenas dentro del mismo apiario del CEA se les diagnosticó el nivel de infestación de *Varroa destructor* usando el método descrito por De Jong *et al.* (1982) y se seleccionaron aquellas que presentaban altos

niveles de infestación (>5%) para que sirvieran como fuente de ácaros para los diferentes grupos experimentales. Las colmenas que sirvieron como fuente de abastecimiento de ácaros en el Centro de Investigación Apícola de Guelph fueron facilitadas por un apicultor de la región, las cuales también presentaban altos niveles de infestación (>5%).

Obtención de ácaros

Para obtener a los ácaros se utilizó una cubeta plástica de 19 L con malla de criba de 4 mm, 20 cm por encima de su fondo. Entre el fondo del contenedor y la malla, se colocó un vial con 30 ml de éter al 95%. Se sacudieron bastidores con abejas obreras dentro de la cubeta y después se cerró durante 15 ó 20 min para anestesiarse a las abejas y permitir que los ácaros se desprendieran del cuerpo de éstas. Finalmente se colectaron los ácaros del fondo de la cubeta utilizando un pincel de cerdas finas para recopilarlos en una caja de Petri. Previo al uso de los ácaros, se seleccionaron al azar 30 de ellos de cada región y se analizaron para conocer el haplotipo de los mismos, mediante *RFLPs*, y todos fueron del tipo coreano (Solignac *et al.* 2005).

Preparación de homogenizado

Alrededor de 100 ácaros se introdujeron en un vial de 1.5 mL para microcentrifuga (*Fisher Scientific*[®]) y se lavaron con solución amortiguadora (*Phosphate Buffer Saline*; por sus siglas en inglés) (fosfato monosódico anhidro 0.038M, fosfato disódico 0.162M, cloruro de sodio 0.75M en agua destilada y pH 7.4) utilizando un agitador Vortex por 15 segundos a velocidad media. Posteriormente, la solución amortiguadora se colectó con una micropipeta y los ácaros se colocaron sobre un papel filtro para que se secaran. Finalmente se colocaron en un mortero estéril al cual se le agregaron 5 µL de solución amortiguadora por ácaro y se maceraron con el pistilo del mortero hasta deshacer por completo la exocutícula de los mismos. El homogenizado se colectó con una micropipeta y se depositó en un vial para microcentrifuga el cual se centrifugó a

10,000 rpm durante 10 minutos. Al término de este tiempo se transfirió la fase líquida (sobrenadante) del macerado a un vial nuevo con su identificación. El homogenizado de varroas se conservó en congelación a -20°C hasta su utilización.

Tratamientos

❖ Abejas adultas

Se utilizaron 70 abejas adultas, por cada grupo experimental, que fueron expuestas a los siguientes tratamientos: para el grupo testigo las abejas se inyectaron con 2.5 µL de solución amortiguadora entre el segundo y el tercer terguito utilizando una jeringa con una microjeringa Hamilton con aguja de calibre 32 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) (de Miranda *et al.* 2013). Para el grupo experimental tratado con homogeneizado de varroa las abejas se inyectaron, como se describió anteriormente, con un homogeneizado de varroas que se preparó con solución amortiguadora, mencionado en la sección anterior. Después de las respectivas inyecciones, las abejas se incubaron en jaulas de encierro (descritas más adelante). Para el grupo experimental varroa, las abejas obreras recién emergidas se dividieron equitativamente en ocho jaulas tipo Benton ya que este tipo de jaulas facilitó que los ácaros localizaran a su huésped en un espacio más confinado, en comparación con las jaulas de encierro. Se colocaron dos ácaros sobre el cuerpo de cada una de las abejas a través de la malla de las jaulas utilizando un pincel de cerdas finas.

❖ Cría de abejas (pupas)

Las celdas de panales se abrieron cuidadosamente con una navaja de afeitar siguiendo el contorno de la celda, en forma de media luna y los opérculos se doblaron hacia arriba para corroborar que las pupas fueran de la edad deseada (pupas de ojos blancos). Una vez expuestas, las pupas del grupo testigo y homogeneizado se inyectaron con 2.5µL de solución amortiguadora o homogeneizado de varroas, respectivamente, a nivel de tórax con la microjeringa

antes mencionada, Las pupas del grupo varroa fueron infestadas artificialmente con un solo ácaro introducido dentro de las celdas con ayuda de un pincel de cerdas finas. Se utilizaron un total de 50 pupas por cada grupo experimental. Después de cada tratamiento, los opérculos de cada grupo experimental se regresaron a su posición natural y se sellaron con un poco de cera líquida (Hamiduzzaman *et al.* 2012). Los panales con los grupos experimentales se incubaron como se describe en la siguiente sección.

Los grupos inyección de homogeneizado e infestación artificial de varroa fueron seleccionados de esa manera ya que representan dos métodos distintos de transmisión o activación viral. Aunque las cantidades iniciales de virus pudieron haber diferido entre los dos métodos, una comparación de la tasa de incremento viral fue posible entre los diferentes métodos de introducción de virus en abejas adultas y cría de abejas africanizadas y europeas. Todos los experimentos se realizaron cuatro veces.

Jaulas

Para los diferentes tratamientos con abejas adultas (europeas y africanizadas) se utilizaron las siguientes jaulas:

- a) Las abejas adultas inyectadas con solución amortiguadora (grupo testigo) y abejas adultas inyectadas con homogeneizado se mantuvieron en jaulas de encierro (12.7 x 8.5 x 14.5 cm) y se alimentaron con jarabe de sacarosa al 50% y agua destilada *ad libitum*. Las jaulas se mantuvieron en una incubadora a 32-35°C con 60% de humedad relativa durante 48 horas (de Miranda *et al.* 2013).
- b) Las abejas adultas infestadas artificialmente se mantuvieron en jaulas de reinas tipo Benton las cuales tenían *candy ad libitum* y se les esparció, dos veces al día, un par de gotas de agua sobre la malla para mantener hidratadas a las abejas. También se mantuvieron dentro de la incubadora.

- c) Los panales con la cría de abejas (pupas de ojos blancos) africanizadas y europeas se introdujeron en jaulas de madera con malla (5 x 28 x 25.5 cm) y se mantuvieron dentro de la incubadora.

Muestreo post tratamientos

En los experimentos efectuados en ambos genotipos de abejas, tanto con abejas adultas como con las pupas, se colectaron muestras a las 0 (previo tratamiento), 2, 24 y 48 horas *post* exposición a cada uno de los tratamientos. El muestreo a las 2 horas *post* exposición se seleccionó para proveer una base de la cantidad relativa de virus en las abejas poco tiempo después de los tratamientos, ya que los niveles de virus de *V. destructor* no fueron determinados previo a los tratamientos en los grupos experimentales de infestación artificial y homogenizado. Se seleccionó el muestreo a las 48 horas *post* exposición debido a que los virus de las alas deformes, de las celdas reales negras, de la cría ensacada y el virus Israelí de la parálisis aguda fueron fiablemente detectados por RT-PCR, a ese intervalo de tiempo, en abejas adultas o cría en al menos uno de los dos genotipos de abejas. Esto indicó que para las 48 horas *post* tratamientos, la infección en los grupos experimentales varroa y homogeneizado resultó ya sea en la introducción de los virus o en su activación a niveles detectables. Para las muestras de cría, se desopercularon tres celdillas y las tres pupas se introdujeron en un vial Eppendorf® de 1.5 mL. En el caso de las abejas adultas, se tomaron tres abejas, con ayuda de una pinza, de las jaulas de encierro y se introdujeron en un vial Eppendorf® de 2 mL. Cabe mencionar que para los grupos experimentales de abejas africanizadas, las muestras se mantuvieron dentro de viales Eppendorf de 2 mL con 1,200 µL de solución RNA*later*® (Life Technologies Inc® Burlington, ON, Canadá) para evitar que se degradara el ARN. Los viales con las abejas correspondientes a cada tratamiento se mantuvieron la primera noche en refrigeración y posteriormente se mantuvieron en congelación hasta su traslado al Laboratorio de Investigación Apícola de la Universidad de Guelph en Canadá. En

el caso de las abejas europeas se mantuvieron en nitrógeno líquido inmediatamente después de su colecta mientras se trasladaban a un congelador.

Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de tres abejas (pupas y adultas), por cada grupo experimental, por cada tiempo estipulado. Se hizo una extracción con fenol:cloroformo (modificada de Chen *et al.* 2000) siguiendo el siguiente protocolo:

Protocolo de extracción del ARN de pupas y abejas adultas

1. Las muestras de abejas (pupa o adulta) europeas, sacadas del congelador, se colocaron en un mortero y se maceraron con ayuda de un pistilo (ambos estériles); se vertió un poco de nitrógeno líquido durante todo el proceso de macerado para mantener en cadena fría la muestra y evitar que el ARN se degradara. Si la muestra de abejas se mantuvo en RNALater[®], el vial viejo donde la muestra se encontraba, se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 segundos; el líquido restante se depositó en el vial nuevo donde se colocó previamente el macerado de abejas. Una vez maceradas las muestras, estas se colocaron en viales de 2 mL con su respectiva identificación.
2. Se añadieron 800 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) al vial con la muestra macerada, mientras esta se encontraba congelada. Posteriormente, el vial se mantuvo a temperatura ambiente y se esperó dos minutos hasta que la muestra se descongeló.
3. Se añadieron al vial 800 µL de solución amortiguadora de extracción y se mezcló mediante inversión manual.
4. Se agitó el vial con ayuda de un vortex a 8,000 rpm durante 30 segundos.
5. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos (de preferencia a 4°C).
6. Se colectó el sobrenadante con micropipeta y se transfirió a un nuevo vial de 2 mL. Se añadió el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamil (24:1) y se mezcló por inversión manual.

7. Se centrifugó a 13,000 rpm durante cinco minutos (de preferencia a 4°C).
8. Se colectó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo vial de 1.5 mL. Se añadió el mismo volumen de cloruro de litio (LiCl) 10M al nuevo vial y se mezcló por inversión manual.
9. El ARN se dejó precipitar por la noche a 4°C.
10. Al día siguiente se centrifugó la muestra a 13,000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante por decantación y se conservó el pellet de ARN.
11. Se añadieron 500 µL de etanol al 70% para lavar el pellet de ARN.
12. Se agitó con un vortex por unos segundos y se centrifugó a 12,000 rpm durante tres minutos.
13. Se descartó el sobrenadante de etanol por decantación y se dejó secar el tubo en una cabina de flujo laminar por aproximadamente 20 minutos para permitir que el pellet se seque por completo.
14. El pellet se re-suspendió en 25 µL de agua dietilpirocarbonatada (DEPC) estéril.
15. La muestra se incubó a 60°C en baño María por tres minutos.
16. Se centrifugó el vial a 10,000 rpm durante 10 segundos.
17. El ARN se conservó a -20°C o a -80°C hasta el momento de su uso.

NOTA: Los puntos descritos en los numerales 2-8 se realizaron dentro de una campana de extracción de gases.

Finalmente se midió la concentración y pureza del ARN extraído utilizando un espectrofotómetro NonoVue[®] (GE Healthcare, Cambridge, UK).

Bibliotecas ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2 µg de ARN total con Oligo (dT)₁₈ y M-MuLV RT utilizando el *kit RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas Life Sciences[®], Burlington, Ontario) siguiendo las instrucciones del

proveedor. El ADNc sintetizado se conservó a -20°C hasta su utilización. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se preparó la solución oligo en un microtubo mantenido en cadena fría:

Iniciador Oligo (dT) ($0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$) : $1\ \mu\text{L}$

ARN total : $6\ \mu\text{L}$

Agua desionizada dietilpirocarbonatada: $5\ \mu\text{L}$

Total : $12\ \mu\text{L}$

Se mezcló suavemente con una micropipeta y se centrifugó a $10,000\ \text{rpm}$ durante cinco a siete segundos.

2. Se incubó a 70°C durante cinco minutos.
3. Se colocó en hielo durante dos minutos.
4. Se preparó la solución amortiguadora en un microtubo mantenido en hielo:

5x de solución amortiguadora para reacción: $4\ \mu\text{L}$

Inhibidor de la RNAasa : $1\ \mu\text{L}$

Mezcla de dNTPs ($10\ \text{mM}$) : $2\ \mu\text{L}$

Total : $7\ \mu\text{L}$

Se mezcló suavemente con una micropipeta y se centrifugó a $10,000\ \text{rpm}$ durante cinco a siete segundos.

5. Se añadieron $7\ \mu\text{L}$ de solución amortiguadora a $12\ \mu\text{L}$ de la solución oligo en un microtubo para PCR ($0.2\ \text{mL}$) y se mezcló suavemente con una micropipeta.
6. Se incubó a 37°C durante cinco minutos.
7. Se añadió $1\ \mu\text{L}$ de transcriptasa reversa M-MuL ($200\ \text{U}/\mu\text{L}$)
8. Se incubó a 42°C durante 60 minutos.
9. Se incubó a 70°C durante 10 minutos.
10. Se colocó en hielo durante dos minutos y se centrifugó a $10,000\ \text{rpm}$ durante cinco a siete segundos.
11. El ADNc se almacenó a -20°C .

Gen constitutivo e iniciadores

Se determinaron las cantidades relativas de los siguientes virus: virus de la parálisis aguda, virus de la parálisis crónica, virus de Cachemira, virus de las alas deformes, virus de las celdas reales negras, virus de la cría ensacada y virus Israelí de la parálisis aguda, relativas a un gen constitutivo (*Rps5*) de *Apis mellifera* (como se muestra en la Figura 15), por medio de una PCR múltiple de ARN viral sometido a transcripción reversa. Los iniciadores para el gen constitutivo que se utilizaron fueron los diseñados por Thompson *et al.* (2007). Los iniciadores específicos para el virus Israelí de la parálisis aguda, el virus de la parálisis aguda, el virus de la cría ensacada, el virus de Cachemira y el virus de la parálisis crónica se diseñaron basándose en las publicaciones de Ribière *et al.* (2002), Tentcheva *et al.* (2004), Maori *et al.* (2009), Federova *et al.* (2011), respectivamente. Para el virus de las alas deformes se utilizó el iniciador sentido reportado por Chen *et al.* (2005), y se diseñó un nuevo iniciador antisentido para obtener un producto de PCR más pequeño (5'CATAGATATCAGTCAACGGAGC). Para el diseño de este iniciador se obtuvo la secuencia completa del virus de las alas deformes (Genbank no. NC 004830) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) y empleando el programa de computación Gene Runner (Version 3.05, Hastings Software Inc. ®, NY). Los iniciadores para el virus de las celdas reales negras, sentido 5'GTCAGCTCCCACTACCTTAAAC y antisentido 5'CAACAAGAAGAAACGTAAACCAC, que se utilizaron fueron los reportados por Benjeddou *et al.* (2001) pero con modificaciones para obtener productos más pequeños. Todos los iniciadores se mandaron a sintetizar en el Laboratorio de Servicios de la Universidad de Guelph (Guelph, Ontario).

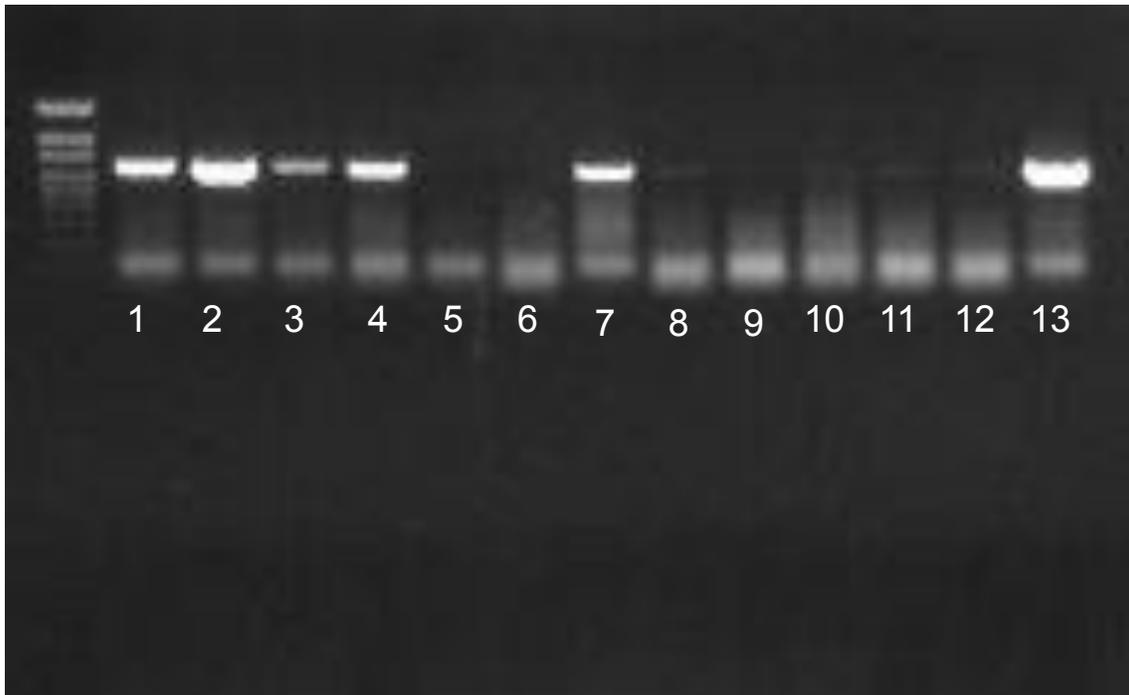


Figura 15. Amplificación del virus de las celdas reales negras (VCRN) en abejas adultas y del gen doméstico *Rps5* de *Apis mellifera*. Líneas 1-6 corresponden al virus amplificado en abejas adultas europeas, líneas 7 -13 corresponden al virus en abejas adultas africanizadas. El bandeo superior muestra la amplificación del VCRN (698 pb) y el bandeo inferior muestra la amplificación del gen constitutivo *Rps5* (115bp).

PCR Cuantitativa relativa

Se realizó una RT-PCR cuantitativa relativa (Dean *et al.* 2002), para medir la cuantificación relativa de virus en los diferentes tratamientos. Los productos se co-amplificaron junto con el gen doméstico *RpS5* (115pb). Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador Eppendorf AG 22331 (Eppendorf® Hamburgo, DE). Para cada reacción, se preparó una solución con volumen final de 15 μ L que contenía 2.0 μ L de ADNc, 0.2 μ L 5U/ μ L de Taq polimerasa ADN (Laboratorios New England®, Pickering ON, Canadá), 7.8 μ L de agua doblemente destilada, 1.5 μ L de solución amortiguadora 10x para PCR (New England BioLabs®, Pickering, Ontario), 0.5 μ L de dNTPs 10mM (Bio Basic Inc.®, Markham, Ontario) y 1 μ L de iniciadores sentido y antisentido 10mM para el gen doméstico *RpS5* y de iniciadores sentido y antisentido 10 mM para uno de los virus analizados (mencionados anteriormente). Las condiciones de la reacción fueron 94°C durante

tres minutos seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C con una extensión final de 72°C por 10 minutos para los virus: virus Israelí de la parálisis aguda, virus de la parálisis aguda, virus de la cría ensacada, virus de Cachemira y virus de la parálisis crónica. Las condiciones de amplificación para el virus de las alas deformes y el virus de las celdas reales negras fueron las mismas con la modificación en la temperatura de alineamiento que fue de 58°C.

Electroforesis y cuantificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa en amortiguador TBE al 1% teñido con bromuro de etidio, junto con un marcador molecular de 100pb (Bio Basic Inc[®]). Se visualizaron y capturaron las imágenes de los productos amplificados con una cámara digital adaptada a un transiluminador con luz ultravioleta (BioDoc-It^M Imaging System[®], Upland, CA, USA). Para confirmar identificaciones positivas, se seleccionaron productos de PCR al azar y se purificaron usando el *kit Z-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit* (Bio Basic Canada Inc[®]) y se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Servicio de la Universidad de Guelph (Guelph, Canadá). Las secuencias se utilizaron para hacer una búsqueda en la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) por medio de BLASTn. Todas las secuencias mostraron un $\geq 96\%$ de identidad con la secuencia respectiva a cada virus. La intensidad de las bandas de los productos amplificados se cuantificó en pixeles usando el programa de imagen Scion Image (Scion Corporation[®], Frederick, MD, USA) como lo publicaron Dean *et al.* (2002). Se determinó la semi cuantificación de la relación de intensidad entre la banda de cada virus analizado y la banda del gen constitutivo *RpS5* para determinar las unidades de cuantificación relativa (*RQUs* por sus siglas en inglés) del ARN viral. La intensidad de la banda de *Rps5* se mantuvo constante en todos los intervalos de muestreo.

La intensidad de la banda del gen constitutivo *Rps5* fue constante durante todos los intervalos de tiempo. Para determinar si la cuantificación a los 35 ciclos

de amplificación no se vio afectada por saturación de señal de la intensidad de banda, se seleccionaron muestras al azar con valores *RQUs* altos, medianos y bajos del virus de las alas deformes y se cuantificaron de la misma manera con 25 y 30 ciclos de amplificación. Las unidades de cuantificación relativa para esas muestras no fueron significativamente diferentes a 25, 30 o 35 ciclos de amplificación analizados ($F_{2, 15} = 0.30$, $P = 0.75$).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R-Statistical Program (R Development Core Team[®], Auckland, New Zealand). Para cada intervalo de tiempo del muestreo, se calculó la media y el error estándar de las cuatro réplicas biológicas. Para el análisis de las diferencias en las cantidades relativas de ARN viral entre los intervalos de muestreo, se realizaron pruebas *t* de *Student*, y para comparar las pendientes de los cambios en las cantidades relativas de virus a través del tiempo se utilizó un análisis de covarianza (ANOCOVA) que representa la tasa de incremento (replicación viral) en las abejas melíferas.

Resultados

❖ Virus de Cachemira y virus de la parálisis aguda

La cría y abejas adultas de abejas europeas y africanizadas se analizaron para detectar la presencia de virus desde las cero horas (previo tratamiento) hasta las 48 horas *post* tratamiento, en los tres tratamientos (solución amortiguadora/testigo, infestación artificial e inyección de homogenizado). En virtud de que ni el virus de Cachemira ni el virus de la parálisis aguda se detectaron en ninguna de estas muestras, se decidió no volverlos a considerar en la presente investigación.

❖ Virus de las alas deformes – abejas adultas (africanizadas y europeas)

Para las abejas adultas africanizadas que fueron tratadas con infestación artificial, los niveles del VAD fueron significativamente menores ($P < 0.05$) que los de las abejas adultas europeas, a las 2 y 12 horas *post* tratamiento indicando que la cantidad del virus transmitido fue muy poca o que el inicio de su replicación se retrasó. Sin embargo, entre las 12 y 24 horas *post* tratamiento se detectó un rápido incremento en los niveles del VAD. Para las 24 a 48 horas *post* tratamiento, los niveles del VAD fueron similares en ambos genotipos. La baja tasa de incremento del VAD de las 2 a las 12 horas *post* tratamiento en las abejas adultas africanizadas expuestas a la infestación artificial pudiera indicar que hubo un periodo de alta resistencia a la replicación del virus, en comparación con las abejas adultas europeas, o que se presentó un periodo de latencia debido a una menor cantidad de inóculo. Aunque este resultado también pudiera ser el resultado de una variación en la virulencia entre aislados del VAD de México y de Canadá, esos aislados no parecieron ser atípicos. Una comparación de la secuencia parcial de la ARN helicasa amplificada del VAD, originado de una muestra de Ontario o de México, demostró que había más de 98% de identidad de nucleótidos. Los sitios polimórficos entre esas muestras, lo fueron también en otras secuencias de ARN helicasa del VAD reportadas por Berenyi *et al.* (2007), que se originaron de Polonia, Austria, Hungría, Eslovenia, Alemania, Nepal, Sri

Lanka, Emiratos Árabes Unidos, así como de otras regiones de Canadá (datos no mostrados).

Las abejas adultas africanizadas y europeas inyectadas con el homogenizado de varroas no mostraron diferencia entre genotipos para los niveles del VAD a las 2 horas *post* tratamiento. Sin embargo, en el intervalo de tiempo de 2 a 48 horas *post* tratamiento los niveles de VAD incrementaron más lentamente en las abejas africanizadas en comparación a las abejas europeas (Figura 16 A y B), como lo indica el incremento de 0.53 URC contra 1.10 URC, respectivamente. Finalmente, la tasa de incremento viral de 2 a 48 horas *post* tratamiento (i.e., la pendiente de la líneas de regresión de la cuantificación relativa de los niveles del VAD) fue significativamente menor en las abejas adultas africanizadas ($F_{1, 28}=4.6$, $P<0.05$). La menor tasa de incremento del virus en las abejas adultas africanizadas inyectadas con el homogenizado, de las 2 a las 48 horas *post* tratamiento, indicó que pudiera haber un mayor grado de resistencia al VAD, en comparación con las abejas adultas europeas.

❖ **Virus de las alas deformes – cría de abejas (africanizadas y europeas)**

En la cría de abejas africanizadas y europeas infestadas artificialmente con varroa, no se detectaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los genotipos de abejas a las 2 horas *post* tratamiento (Figura 16 C y D). Sin embargo, se detectó una tasa de incremento menor del VAD en las pupas africanizadas en comparación con las pupas europeas de las 2 y hasta las 24 horas *post* tratamiento ($P<0.05$) (0.19 UCR Vs. 0.86 UCR, respectivamente) (i.e., una menor pendiente en el incremento de los niveles del VAD durante ese periodo de tiempo; $F_{1, 20}= 5.0$, $P<0.05$). Entre las 24 a las 48 horas *post* tratamiento, el incremento en los niveles del VAD fue más rápido en las pupas africanizadas que en las pupas europeas (1.36 URC Vs. 0.40 URC, respectivamente). Finalmente, a las 48 horas *post* tratamiento, no se detectaron diferencias significativas ($P>0.05$) en los niveles del VAD entre ambos genotipos de abejas. Por lo tanto, pudiera haberse

presentado una mayor resistencia resultando en la desaceleración de la replicación del VAD en pupas africanizadas versus las europeas hasta las 24 horas *post* tratamiento pero que se perdió al final de ese periodo.

La cría de abejas africanizadas que fue inyectada con el homogenizado de varroas tuvo niveles de VAD significativamente mayores que las pupas europeas a las 2 horas *post* tratamiento ($P < 0.01$) (0.58 URC versus 0.84 URC, respectivamente), pero la tasa de incremento en los niveles del virus entre las 12 y las 48 horas *post* tratamiento llegaron a ser similares entre ambos genotipos (i.e., la pendiente de las líneas de los niveles del VAD no fue significativamente diferente durante ese periodo de tiempo; $F_{1, 20} = 0.2$, $P > 0.05$). Finalmente, a las 48 horas *post* tratamiento, no se detectó diferencia significativa alguna en los niveles del VAD entre ambos genotipos (Figura 16 C y D) y parece que la tasa de replicación del virus fue casi idéntica entre las pupas de ambos genotipos inyectados con el homogenizado.

En conclusión, las cantidades relativas del VAD no difirieron entre genotipos de abejas ni al principio ni al final de la presente investigación en los grupos expuestos a infestación artificial y homogenizado; la tasa de incremento viral no fue diferente en varios periodos de tiempo dentro de las 48 horas *post* tratamiento con una menor tasa de incremento del VAD que fue temporal o sostenible observada en las abejas africanizadas.

Al analizar la cría (pupas) y abejas adultas africanizadas y europeas tratadas con solución amortiguadora, no se detectaron niveles de virus de las alas deformes (VAD) (Figura 16) indicando que no había virus latente detectable en las abejas que fuera inducido por la inyección de solución amortiguadora similar al grupo de abejas inyectadas con homogenizado (Figura 16).

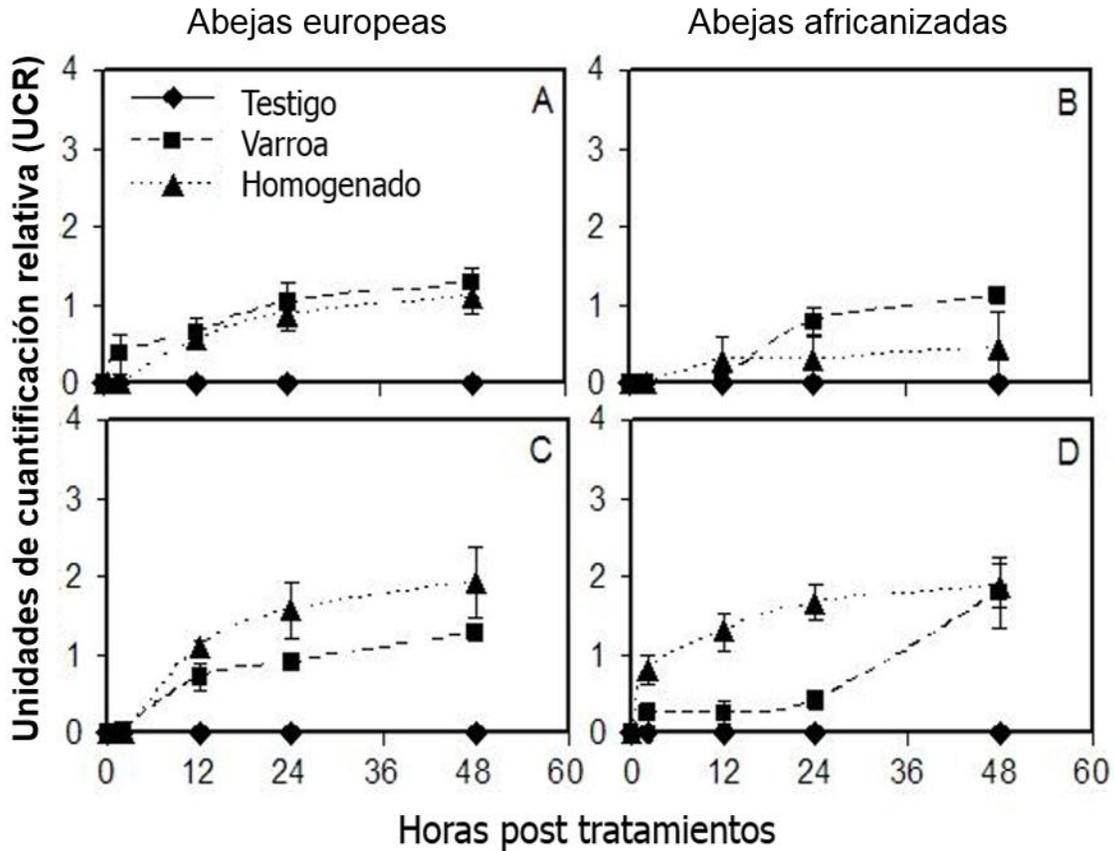


Figura 16. Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del virus de las alas deformes. A) abejas adultas europeas, B) abejas adultas africanizadas, C) pupas europeas y D) pupas africanizadas. Valores presentados como medias \pm errores estándar.

❖ **Virus de las celdas reales negras – abejas adultas (africanizadas y europeas)**

Para el virus de las celdas reales negras (VCRN) no se detectaron títulos virales, o fueron muy bajos, en abejas adultas africanizadas que se infestaron artificialmente con varroa, y no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$) de los de las abejas adultas europeas a las 2 y 12 horas *post* tratamiento (Figura 17 A y B). Esto indicó bajos niveles iniciales del VCRN relativamente similares en ambos genotipos. La tasa de incremento del VCRN en las abejas adultas fue similar entre los dos genotipos a partir de las 24 y hasta las 48 horas *post* infestación artificial y los niveles del virus no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$) entre las abejas africanizadas y europeas en ninguno de esos dos intervalos de tiempo. No

hubo evidencia de una diferencia en la resistencia al VCRN entre abejas adultas de ambos genotipos que fueron infestados artificialmente.

Para el tratamiento de inyección de homogenizado de varroas, los niveles del VCRN no fueron significativamente diferentes ($P>0.05$) entre abejas adultas africanizadas y europeas a las 2 o 12 horas *post* tratamiento (Figura 17 A y B). Sin embargo, la tasa de incremento del VCRN de 12 a 48 horas *post* tratamiento fue mucho menor en las abejas adultas africanizadas que en las abejas europeas (0.80 UCR versus 2.72 UCR, respectivamente) (i.e., una pendiente significativamente menor en el incremento del nivel del VCRN durante ese periodod de tiempo; $F_{1, 20} = 14.3$, $P<0.01$) (Figura 17 A y B). El tratamiento de homogenizado provocó una menor tasa de incremento viral en abejas adultas africanizadas de las 12 a las 48 horas *post* tratamiento, lo cual indicó una mayor resistencia al VCRN en comparación con abejas adultas europeas.

❖ **Virus de las celdas reales negras – cría de abejas (africanizadas y europeas)**

Para la cría africanizada expuesta a la infestación artificial por varroa, los niveles de VCRN no fueron significativamente diferentes ($P>0.05$) que los registrados para las pupas europeas, en cualquiera de los tiempos analizados (Figura 17 C y D).

Se registraron resultados similares en las pupas inyectadas con homogenizado, sin diferencias significativas ($P>0.05$) en los niveles del VCRN entre pupas africanizadas y europeas en cualquiera de los intervalos de tiempo analizados. Estos resultados indicaron que el virus se replicó de manera similar en la cría en ambos genotipos sin importar el tipo de tratamiento (infestación artificial/homogenizado).

La comparación de los tratamientos de infestación artificial y homogenizado en ambos genotipos demostró que la transmisión mecánica vía inyección de homogenizado resultó, consistentemente, en mayores niveles del VCRN en comparación con la transmisión natural vía infestación por varroa (Figura 17). Sin embargo, un factor adicional para el VCRN, fue que el tratamiento con inyección de solución amortiguadora en las abejas adultas, activó infecciones latentes del virus con niveles detectables a las 24 y 48 horas *post* tratamiento en las abejas adultas de ambos genotipos (Figura 17 A y B), implicando que había infecciones latentes en las abejas adultas que fueron activadas por el estrés provocado por la perforación de la cutícula al introducir la solución amortiguadora en la hemolinfa así como por el enjaulamiento.

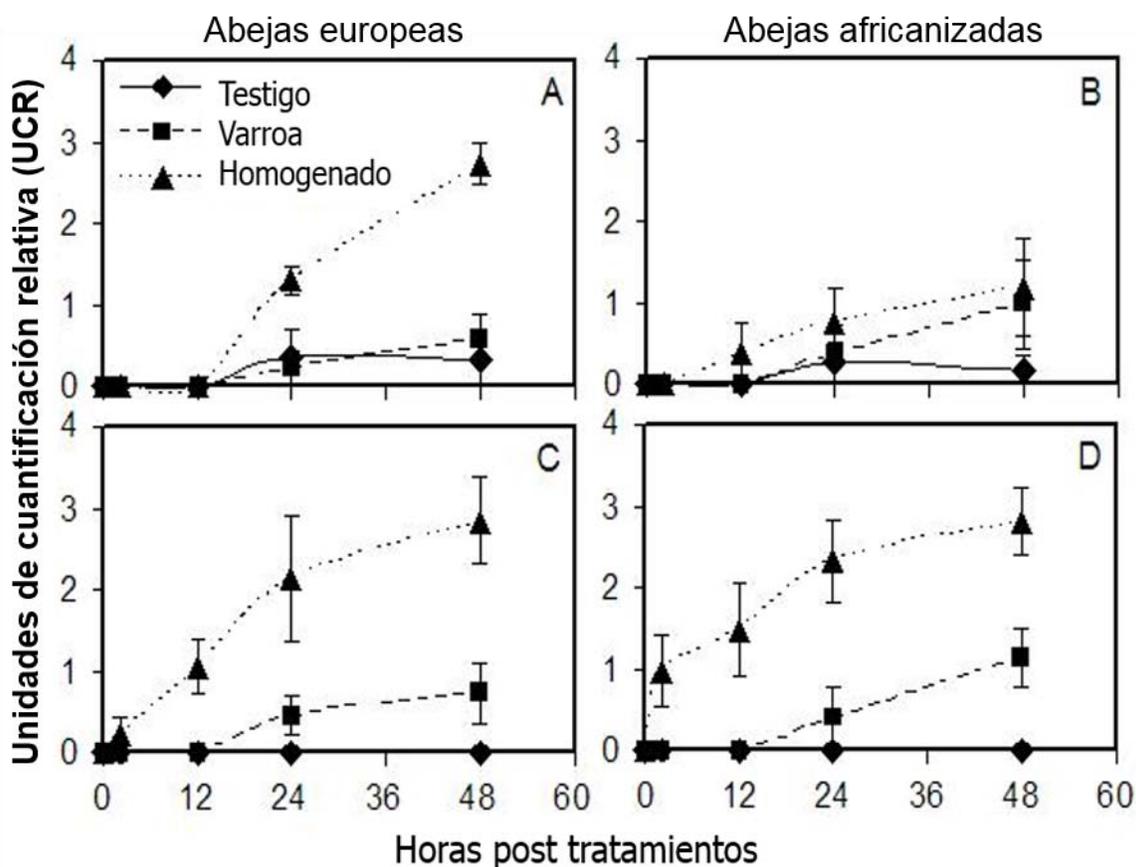


Figura 17. Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del virus de las celdas reales negras. A) adultas europeas, B) adultas africanizadas, C) pupas europeas y D) pupas africanizadas. Valores presentados como medias \pm errores estándar.

❖ **Virus de la cría ensacada – abejas adultas**

En las abejas adultas africanizadas expuestas a la infestación artificial con varroa se detectaron niveles del VCE pero no en las abejas adultas europeas, mientras que en las adultas inyectadas con el homogenizado de varroa, sólo se detectaron niveles del virus en las abejas europeas pero no así en las africanizadas (Figura 18 A y B). El hecho de que la infestación artificial o la inyección de homogenizado, pero no ambos, resultó en niveles detectables del VCE en uno de los dos genotipos fue sorprendente ya que en cada caso se utilizó la misma colecta de varroas que fue utilizada para cualquiera de los dos tratamientos. Esto se puede haber debido a diversos factores, como a la habilidad del VCE de ser secretado en la saliva durante la infestación artificial o a su replicación con compuestos del ácaro, ingresando a la hemolinfa de abejas adultas, originándose ya sea a partir del cuerpo del ácaro (homogenizado) o de su saliva (infestación artificial).

❖ **Virus de la cría ensacada – cría de abejas**

Sólo se detectaron niveles del VCE en las pupas africanizadas expuestas a la infestación artificial con varroa a las 48 horas *post* tratamiento (Figura 18 C y D). En las pupas de ambos genotipos tratadas con el homogenizado se detectaron niveles del VCE, siendo significativamente mayores en las pupas africanizadas a las 2 y 12 horas *post* tratamiento ($P < 0.01$). También se observó un rápido incremento del virus entre las 12 y 24 horas *post* tratamiento en las pupas de abejas europeas, pero sin diferencia significativa en los niveles del virus en ambos genotipos a las 24 y 48 horas *post* tratamiento ($P > 0.05$) (Figura 18 C y D). La menor tasa de incremento del VCE de las 2 a las 12 horas *post* tratamiento en las pupas europeas expuestas al homogenizado pudiera indicar una mayor resistencia inicial en comparación a las abejas adultas africanizadas, la cual no persistió después de las 12 horas *post* tratamiento.

No se detectaron niveles del VCE en las abejas adultas ni en las pupas africanizadas o europeas inyectadas con solución amortiguadora, indicando que el virus no se presentaba de manera latente en las abejas y que no pudo ser activado dentro de las 48 horas *post* inyección de solución amortiguadora, como lo fue en el caso de la inyección de homogenizado (Figura 18).

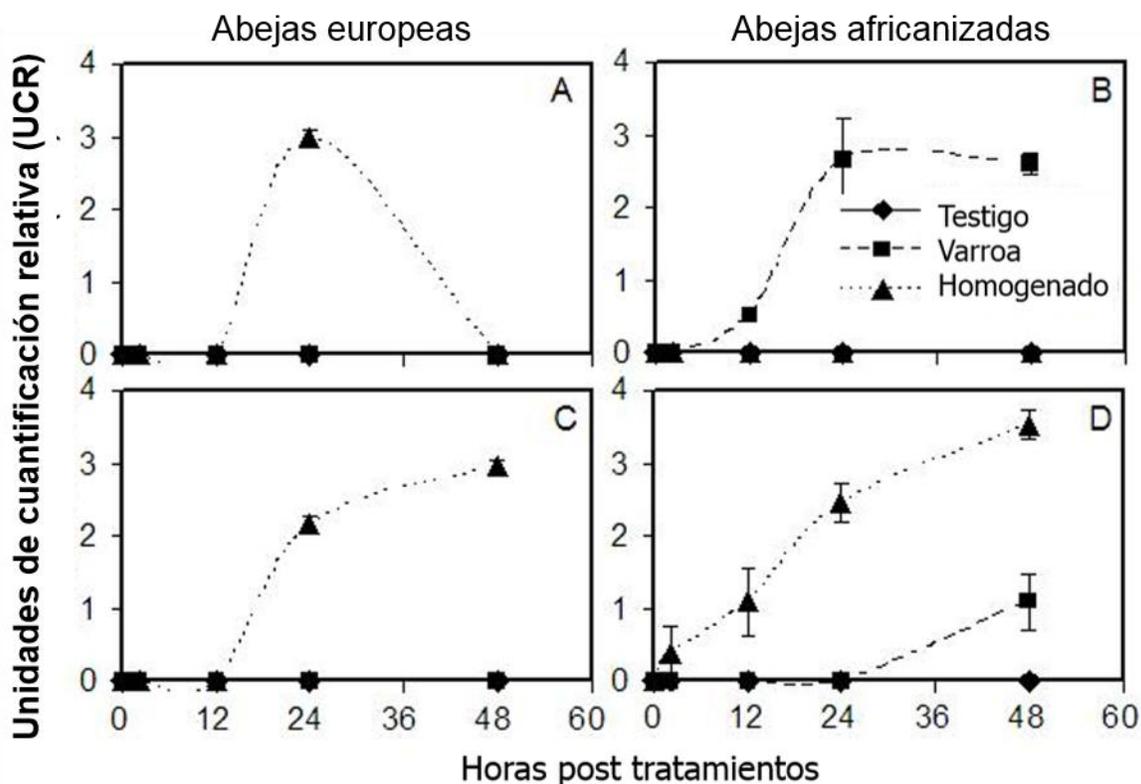


Figura 18. Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del virus de la cría ensacada. A) adultas europeas, B) adultas africanizadas, C) pupas europeas y D) pupas africanizadas. Valores presentados como medias \pm errores estándar.

❖ Virus Israelí de la parálisis aguda – abejas adultas

Los niveles del VIPA en el grupo de abejas adultas expuestas a la infestación artificial con varroa no difirieron entre los genotipos de abejas africanizadas y abejas europeas en ninguno de los tiempos analizados ($P > 0.05$) (Figura 19 A y B). A pesar de que los niveles del VIPA fluctuaron a lo largo del

tiempo, puede ser que el virus se haya estado replicando en las abejas adultas africanizadas y europeas (i.e., la pendiente de la recta de la regresión lineal de los niveles del VIPA fue significativamente diferente de 0 entre las 2 y las 48 horas *post* tratamiento; $F_{1,20}=0.80$, $P<0.05$). Se observaron resultados similares en el grupo de abejas adultas expuestas a la inyección con homogenizado de varroas. Sin embargo, un factor de confusión fue que el VIPA se detectó, a menudo, en niveles similares en el grupo de abejas tratadas con solución amortiguadora. Las únicas veces en que los niveles del virus fueron significativamente más altos que en el tratamiento testigo fue en las abejas adultas europeas inyectadas con homogenizado de varroa a las 12 horas *post* tratamiento y en las abejas adultas africanizadas expuestas a la infestación artificial a las 48 horas *post* tratamiento. Esto pudiera indicar que el VIPA estaba presente en estado latente en ambos genotipos de abejas.

❖ Virus Israelí de la parálisis aguda – cría de abejas

Tanto en la cría de abejas europeas como africanizadas, la pendiente de la línea de regresión de los niveles del VIPA, no fue significativamente diferente de cero ($F_{1, 20}=0.06$, $P>0.05$) en el grupo expuesto a la infestación artificial de varroa, entre las dos y las 48 horas *post* tratamiento, lo cual indica que no hubo una replicación consistente del virus (Figura 19 C y D).

En la cría de abejas europeas expuestas a la inyección de homogenizado de varroas, los niveles del VIPA aumentaron de manera considerable de las 24 a las 48 horas *post* tratamiento indicando que el virus se replicó. Sin embargo, en la cría de abejas africanizadas los niveles del VIPA fluctuaron con el tiempo, y los niveles del virus no fueron significativamente diferentes en comparación a la cría de abejas africanizadas testigo a las 48 horas *post* tratamiento.

Se observó la presencia de una infección latente del VIPA tanto en abejas adultas como en la cría de ambos genotipos (africanizado y europeo), ya que el

virus fue detectado pre y post inyección con solución amortiguadora en al menos uno de los tiempos de muestreo (Figura 19). De hecho, los únicos casos en los que los niveles del VIPA fueron significativamente mayores que en el grupo testigo fue en la cría africanizada expuesta a la infestación artificial con varroa y en el grupo inyectado con homogenizado de varroas a las dos horas *post* tratamiento ($P < 0.05$). El VIPA fue el único virus que se activó por estrés, tanto en abejas adultas como en la cría de abejas expuesta a la inyección con solución amortiguadora.

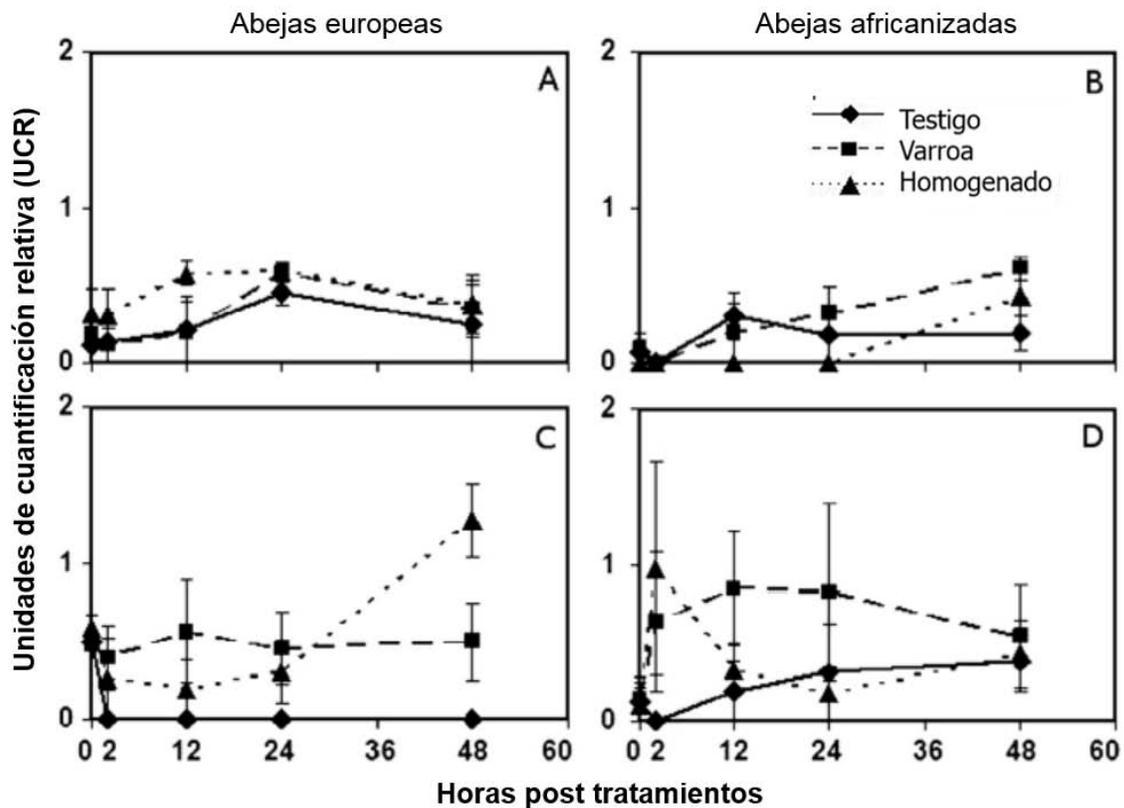


Figura 19. Cuantificación relativa del producto de RT-PCR del virus Israelí de la parálisis aguda. A) adultas europeas, B) adultas africanizadas, C) pupas europeas y D) pupas africanizadas. Valores presentados como medias \pm errores estándar.

Discusión

Aunque en esta investigación no se encontró evidencia consistente de un alto grado de resistencia por parte de alguno de los genotipos de abejas, sí se encontraron resultados que sugieren que las abejas africanizadas y las abejas europeas difirieron en forma temporal en su resistencia a la replicación de varios de los virus analizados. Esta inferencia se deriva de que hubieron diferencias significativas en las cargas virales o en tasas de crecimiento viral en periodos particulares de tiempo entre ambos tipos de abejas, presumiblemente como resultado de la activación viral por medio de la infestación artificial o por la inyección del homogenizado. Cabe mencionar que los ácaros utilizados tanto para el tratamiento de parasitismo por varroa como para el homogenizado provenían de una misma colecta.

Previo al inicio de los tratamientos con varroa/homogenizado, no se detectó el virus de las alas deformes en ninguno de las dos etapas de desarrollo, cría o adultas, para ninguno de los dos genotipos, africanizado o europeo. Se sabe que el virus de las alas deformes provoca infecciones encubiertas actuando como un virus “benigno” en ausencia de varroa (Genersch y Aubert 2010). Si las abejas usadas en este estudio presentaban infecciones encubiertas del virus de las alas deformes, los niveles de éste virus no fueron detectables por la RT-PCR hasta después de que las abejas fueron sometidas al parasitismo y al homogenizado de varroa.

En el caso de las abejas adultas europeas, los niveles del virus de las alas deformes fueron incrementando progresivamente de manera similar en los dos tratamientos (parasitismo e inyección de homogenizado). En un estudio donde se inyectó a cría de abejas europeas con suspensión del virus de las alas deformes, Möckel *et al.* (2011) lograron demostrar la factibilidad de la transmisión mecánica del virus, la cual mimetiza la infección natural por varroa, resultando en la replicación viral y presencia de signos del virus en las abejas que se lograron desarrollar hasta el estadio de insecto adulto. También, mediante métodos

similares a los utilizados en esta investigación, para parasitar abejas adultas recién emergidas con varroa, se observó que los niveles del virus de las alas deformes se correlacionan positivamente con el nivel de infestación de varroa (Di Prisco *et al.* 2011).

Una observación a resaltar es el hecho de que la replicación del VAD se retrasó temporalmente durante las primeras 12 horas en las abejas africanizadas mientras que en las europeas la replicación viral inició antes de las 2 horas *post* tratamiento. También se registró un retraso similar en los niveles del VAD en la cría de abejas africanizadas parasitadas por varroa. La resistencia al virus de las alas deformes en las abejas adultas africanizadas fue más notable en aquellas sometidas a la inyección de homogenizado de varroas, con una tasa en los incrementos virales significativamente menor a lo largo del experimento, en comparación con lo observado en las abejas adultas europeas. Sin embargo, dicho resultado no se observó en la cría de abejas africanizadas.

La diferencia en los niveles del VAD entre los genotipos africanizado y europeo pudo deberse a una menor transmisión o a una desaceleración en la replicación del mismo. A pesar de que el virus se ha detectado en abejas africanizadas, una amplia investigación de abejas africanizadas en Brasil mostró una menor prevalencia del virus (20%) en éstas, en comparación a poblaciones de abejas europeas a nivel mundial, implicando un cierto nivel de resistencia por parte de las poblaciones de abejas africanizadas (Teixeira *et al.* 2008). Un estudio en México mostró que la cría y abejas adultas africanizadas presentaron niveles virales significativamente menores en comparación a la cría y abejas adultas europeas (datos no publicados, Anguiano R. UNAM, comunicación personal). Los resultados de esta investigación, dan más soporte a la observación de que las abejas africanizadas pudieran ser más resistentes al virus de las alas deformes, al demostrar que los niveles del virus fueron menores en abejas africanizadas en comparación a las abejas europeas, poco después de su exposición al virus por el parasitismo de Varroa.

Se sabe que las abejas africanizadas tienen una mayor resistencia al parasitismo por varroa que las abejas europeas (Guzmán-Novoa *et al.* 1996, 1999; Moretto y Mello 1999; Arechavaleta-Velasco y Guzmán-Novoa 2001; Medina-Flores *et al.* 2014). Esta investigación proporciona evidencia de que esa resistencia también se observa en la replicación del VAD. Dainat *et al.* (2012b) y Dainat y Nueman (2013) demostraron que el VAD y el ácaro varroa son marcadores predictivos de la pérdida de colonias durante el invierno, por lo que es muy importante identificar fuentes de resistencia a éstos patógenos ya que pueden ser factores trascendentales en el colapso de colonias infestadas con varroa. Sin embargo, esta investigación se diseñó sólo para medir la fase inicial de una infección viral (hasta 48 horas *post* tratamiento a varroa) y por lo tanto, se desconoce si las abejas africanizadas pudieran presentar esa resistencia a lo largo de su ciclo de vida, o si menores títulos virales pudieran tener un efecto significativo en la presencia y severidad de los signos de la infección.

Una explicación para la diferencia en los niveles del VAD en las abejas africanizadas y las europeas, poco después de su exposición al virus, pudiera ser el impacto del ácaro sobre la respuesta del sistema inmune de las abejas. Yang y Cox-Foster (2007) sugirieron que varroa inmunosuprime a las abejas, y por consecuencia activa infecciones encubiertas del VAD. Esto sólo ha sido examinado hasta ahora en abejas adultas europeas, y por lo tanto se desconoce si otro genotipo de abeja se afectaría de manera similar. Una posibilidad para el retraso en los niveles del VAD en las abejas africanizadas es que el parasitismo por varroa fue menos eficiente en inmunosuprimir a las abejas, permitiendo una mejor respuesta inmune inicial contra el virus. El grado de inmunosupresión, presuntamente debido a compuestos presentes en la saliva del ácaro, pudiera explicar la diferencia en la respuesta al parasitismo y a la inyección de homogenizado ya que pudieran presentar diferentes componentes (Richards *et al.* 2011).

El VCRN, a diferencia del VAD, sí provocó infecciones encubiertas en las abejas adultas africanizadas y europeas ya que fue posible detectarlo en las abejas testigo (sin tratamiento y enjauladas) e inyectadas con solución amortiguadora. Este resultado indica que el estrés del enjaulamiento así como de la inyección, facilitó la replicación del VCRN en las abejas adultas. Sin embargo, la cría no parecía presentar infecciones encubiertas, lo cual pudo deberse a que no se encontraban infectadas previo a los tratamientos, o a que la cría fue tratada dentro de sus celdas, las cuales se opercularon después de cada tratamiento. La poca manipulación de la cría pudo haber provocado un menor nivel de estrés en comparación al enjaulamiento y por lo tanto no hubo activación de infecciones encubiertas del VCRN durante el tiempo del estudio.

Los títulos virales en las abejas adultas europeas durante el parasitismo por varroa, nunca fueron significativamente mayores que el grupo testigo, aunque los niveles del virus fueron aumentando con el tiempo y quizás posteriormente pudieran ser significativamente mayores que el testigo. Sin embargo, en las abejas adultas africanizadas, se observaron incrementos significativos del VCRN, que se registraron entre las 24 y 48 horas *post* tratamiento, en comparación al grupo control. La limitada habilidad de varroa de transmitir el VCRN negras se debió a que varroa no parasitó ni a las abejas adultas africanizadas ni a las europeas, ya que el virus de las alas deformes se logró transmitir de la misma manera. El VCRN puede infectar tanto a la cría como a las abejas adultas y se supone que es transmitido de manera natural por las abejas adultas hacia la cría por medio del alimento (Allen y Ball 1996). También se ha demostrado que las abejas europeas se han logrado infectar con el virus después de haberlas inyectado (Benjeddou *et al.* 2002). Sin embargo, en esta investigación se demostró que los crecientes niveles del VCRN pueden ocurrir durante el parasitismo por varroa.

En el caso de las abejas adultas europeas que fueron inyectadas con el homogenizado de varroas, los niveles del VCRN incrementaron rápidamente en comparación al grupo testigo, indicando que la transmisión mecánica fue más

eficiente. En las abejas adultas africanizadas, la tasa del incremento viral fue significativamente menor en el mismo grupo experimental (inyección de homogenizado de varroas) durante el experimento. Este resultado indica un mayor grado de resistencia por parte de las abejas adultas africanizadas hacia el virus, pero a diferencia del VAD, esa resistencia fue más prolongada (por lo menos 48 horas). A pesar de que previamente se ha reportado el VCRN en abejas africanizadas, la prevalencia del virus en abejas africanizadas en Brasil fue menor (37%) en comparación a poblaciones de abejas europeas a nivel mundial, implicando algún grado de resistencia (Teixeria *et al.* 2008) debido al genotipo de las abejas. Los resultados de esta investigación indican que puede presentarse una mayor resistencia en las abejas africanizadas que en las abejas europeas tanto para el virus de las celdas reales negras como para el VAD.

En los tratamientos de parasitismo por varroa e inyección de homogenizado de varroas, la respuesta del VCRN en la cría de abejas europeas tuvo un comportamiento similar al de las abejas adultas. No obstante, la cría de abejas africanizadas fue más susceptible al virus en el grupo de abejas inyectado con el homogenizado de varroas en comparación al grupo parasitado por varroa. A diferencia de las abejas adultas, no hubo evidencia de una mayor resistencia en las cría de abejas africanizadas para el VCRN, demostrando así la importancia de examinar las diferentes etapas de desarrollo en el estudio de los virus. A medida que las abejas se van desarrollando, diversos aspectos de su sistema inmune cambian; un ejemplo es que la inmunidad en la cría de abejas es menos eficiente que en las abejas adultas (Wilson-Rich *et al.* 2008).

El VCE no se detectó ni en la cría, ni en las abejas adultas, en ninguno de los dos genotipos estudiados, lo cual indicó que no existían infecciones encubiertas por este virus. Nunca se logró detectar el VCE, ni en la cría, ni en las abejas adultas europeas que fueron parasitadas por varroa, demostrando que el ácaro pudiera no introducir el virus de manera efectiva ni activarlo en este genotipo. Sin embargo, sí se detectaron altos niveles de virus para el grupo de

abejas inyectado con homogenizado, demostrando así la transmisión mecánica del virus. Debido a que las varroas utilizadas tanto para el parasitismo como para el homogenizado provenían de una misma colecta, se esperaba que la transmisión del VCE se efectuara tanto para el parasitismo y el homogenizado, o para ninguno. Además, la transmisión del VAD seguido de la exposición a varroa indicó que el parasitismo por el ácaro fue suficiente para transmitir/activar los virus de las abejas.

A diferencia de las abejas adultas europeas, no se detectó el VCE en las abejas adultas africanizadas que fueron inyectadas con el homogenizado de varroas, pero sí se lograron detectar niveles del virus en las abejas parasitadas por varroa. Esto fue inesperado, ya que las varroas provenían de una misma colecta en ambos grupos experimentales (parasitismo y homogenizado). De hecho, sólo la cría de abejas africanizadas presentó replicación inicial efectiva del VCE en el parasitismo como en el homogenizado. Estos resultados sugieren que el parasitismo por varroa puede ser capaz de transmitir el virus de la cría ensacada a las abejas africanizadas más eficientemente que a las abejas europeas. Sin embargo, también es posible que el VCE estuviera presente de manera latente a niveles no detectables sólo en las abejas africanizadas y que el parasitismo por el ácaro haya activado la replicación del virus en este genotipo, pero no así, en las abejas europeas.

El VCE infecta tanto a la cría como a las abejas adultas europeas y se transmite de manera natural vía el alimento, aunque también puede ser transmitido vía inyección (Bailey 1969; Ball y Bailey 1997); también ha sido detectado en abejas africanizadas (Freiberg *et al.* 2012). Sin embargo, el VCE también es transmitido por varroa ya que ha sido detectado en la saliva del ácaro (Shen *et al.* 2005a). Esta investigación demuestra que, tanto como el parasitismo natural por varroa como la inyección de homogenizado, pueden iniciar la replicación viral en las abejas pero puede no ser así en las abejas europeas.

En cuanto al virus de la parálisis aguda Israelí, se detectaron infecciones encubiertas en la cría y abejas adultas en ambos genotipos después de inyectarlas con solución amortiguadora y enjaularlas. Los niveles de ese virus después del parasitismo de varroa o de la inyección de homogenizado de varroas fluctuaron durante el tiempo de estudio, pero sólo se pudieron registrar evidencias para el grupo de cría de abejas europeas, y para el grupo parasitado por varroa e inyectado con homogenizado en las abejas adultas africanizadas, que indicaron que el virus se fue incrementando progresivamente con el tiempo.

El VIPA es genéticamente similar al virus de la parálisis aguda y al virus de Cachemira (Genersch y Aubert 2010). Sin embargo, se tiene menor conocimiento sobre el VIPA ya que fue descubierto relativamente hace poco tiempo (Maori *et al.* 2007). Este virus se puede presentar como una infección latente y los signos se manifiestan cuando el virus alcanza títulos altos, lo cual está relacionado o depende del parasitismo por varroa; posiblemente por una transmisión vía la saliva del ácaro (Genersch y Aubert 2010). Otra vía de transmisión del VIPA puede ser la inyección de homogenizado de varroas que deriva en altos títulos virales (Maori *et al.* 2007). Los resultados de esta investigación comprueban ambas vías de transmisión viral, aunque la presencia de infecciones encubiertas pudo haber influenciado esa observación. El VIPA ha sido detectado en abejas africanizadas (Teixeira *et al.* 2012), lo que concuerda con esta investigación.

Una limitación de esta investigación fue que los niveles virales en el homogenizado de varroa no fueron estandarizados entre experimentos. En lugar de ello, se realizaron colectas de varroas y luego éstas fueron seleccionadas al azar ya sea para la infestación artificial o para la preparación del homogenizado de ácaros. Se seleccionó este enfoque porque no es posible estandarizar la cantidad de virus que se transmite mediante la saliva de varroa durante el parasitismo. Pero al seleccionar ácaros, de manera aleatoria, de una misma colecta para preparar el homogenizado entonces habría proporcionalmente niveles virales similares entre los ácaros utilizados para parasitación natural y aquellos para el homogenizado.

Sin embargo, la transmisión viral por inyección de homogenizado no puede ser comparada directamente con la parasitación por varroa porque difieren en el tamaño de la herida (más grande en la inyección), tipo de material (saliva contra solución amortiguador y homogenizado) y potencial de inmunosupresión (posiblemente mayor para la parasitación natural). Por lo tanto, no sólo se hicieron comparaciones para los niveles virales a determinados intervalos de tiempo post infección sino también para cambios en diferentes periodos de tiempo para estimar la tasa de incremento viral.

A pesar de las condiciones de esta investigación, los resultados obtenidos son los primeros en demostrar que el genotipo de abejas (africanizadas o europeas) así como la etapa de desarrollo de éstas (cría o adultas), afectan la replicación viral temprana iniciada, ya sea por el parasitismo natural de varroa o por la inyección de homogenizado de varroas. Los resultados fueron reproducibles ya que se registró muy poca variación entre las tres diferentes repeticiones. En el VAD, el VCRN, y el VIPA, su replicación viral temprana se redujo o se retrasó ya sea en la cría o en las abejas adultas africanizadas en comparación a lo observado en la cría y las abejas adultas europeas. Esta observación es evidencia de que existe un mayor grado de resistencia en las abejas africanizadas a esos virus. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigación que ayude a determinar si la resistencia se debe a un mayor grado de inmunidad por parte de las abejas africanizadas hacia estos virus y para ver si esta característica pudiera mejorarse en abejas europeas a través de mejoramiento genético.

Discusión general

En este estudio se demostró que el genotipo del ácaro varroa presente en las poblaciones de abejas de dos regiones apícolas de México, y en la provincia de Ontario en Canadá, pertenecen al haplogrupo coreano, el cual parece ser el que presenta un mayor grado de patogenicidad en las abejas melíferas. También se infiere que dentro del haplogrupo coreano existen variantes de éste, al realizar pruebas con restricción de enzima (*RFLPs*) y al analizar las secuencias de los genes mitocondriales *cytb* y *cytII-ATP* mediante la secuenciación de dichos fragmentos y la generación de árboles que muestran sus relaciones filogenéticas, como lo demostraron Navajas *et al.* (2010). Creemos que, gracias a este estudio y a la identificación de haplotipos coreanos, es importante realizar investigaciones futuras que abarquen un mayor rango de muestreo en cuanto a número de ácaros muestreados, así como de regiones geográficas en México. Se propone también la utilización de un mayor número de marcadores moleculares que permitan hacer una inferencia más robusta de la variación y flujo genético de las varroas en México. El equilibrio que existe actualmente en la interacción del ácaro con determinados genotipos de abejas, puede estar influenciado por cambios en la genética del ácaro que se pudieron haber presentado desde que comenzó a parasitar a las abejas melíferas. Estos cambios se pueden deber a adaptaciones del ácaro a su ambiente y a su huésped, los cuales actualmente han cambiado y son muy diversos, puesto que su distribución ya es mundial. Al determinar si existen variaciones en la carga genética del ácaro se pueden llevar a cabo investigaciones que permitan identificar las regiones en las que estas mutaciones se presentan y tratar de determinar cómo afectan o no, al proceso adaptativo del ácaro en las abejas. También es importante evaluar la diversidad genética de las poblaciones de ácaros en México, y como estas variantes puedan tener un mismo efecto detrimental o incluso un equilibrio huésped-párasito en las colonias de abejas melíferas en nuestro país. Es posible que realizando un muestreo más amplio, de los ácaros que se encuentran a lo largo del territorio nacional, se puedan identificar la presencia del haplotipo japonés o incluso variantes del mismo

o del haplotipo coreano como se infiere en los resultados obtenidos en esta investigación. Esta posible interacción entre haplotipos pudiera deberse a la importación y movilización de abejas y reinas.

De acuerdo a las investigaciones que se han llevado a cabo en diversos países del mundo, se ha logrado la identificación de diversos haplotipos de *Varroa destructor* parasitando a *Apis mellifera*. Es necesario saber si los distintos haplotipos, además de presentar variaciones en su carga genética, presentan interacciones diferenciales en las poblaciones de abejas que parasitan, en cuanto a su ciclo de vida y grado de patogenicidad. Es probable que pequeñas variaciones en estos factores provoquen que algunos haplotipos, como es el caso del coreano, sean más virulentos que otros. Por alguna razón, que se desconoce, el haplotipo coreano ha logrado distribuirse a nivel mundial mientras que el japonés se encuentra restringido a ciertas partes del mundo. Incluso cuando se llegan a detectar ambos gentipos conviviendo simpátricamente, parece ser que el haplotipo coreano prevalece sobre el japonés (de Guzman *et al.* 1997, Anderson y Trueman 2000, Garrido *et al.* 2003).

En esta investigación se demostró que la presencia de *Varroa destructor* influye significativamente en la proporción de crías de abejas que logran emerger como insecto adulto, cuando son parasitadas desde su etapa de desarrollo y metamorfosis, en comparación con cría no infestada (31% contra 15%). Asimismo, se comprobó que la longevidad de las abejas adultas disminuye significativamente al registrar un promedio de vida de 8.5 ± 0.3 días en abejas infestadas contra 14.4 ± 0.4 días en abejas no infestadas, bajo condiciones de laboratorio. También se demostró que las abejas que no se encontraban parasitadas lograron vivir hasta 40 días en comparación con las abejas infestadas, las cuales sobrevivieron poco más de la mitad del tiempo. Por otro lado, se demostró que existe un marcado efecto significativo de *V. destructor* en la morfología de las alas de las abejas. De 385 abejas, el 54% de ellas emergió con alas deformes, mientras que ninguna de las abejas no infestadas presentó daño en la estructura de sus alas.

De acuerdo a los resultados de esta investigación, también podemos comprobar que el efecto de varroa en la mortalidad y supervivencia de las abejas melíferas, en comparación con otras investigaciones aquí discutidas, presenta variaciones. Sería importante llevar a cabo estudios que permitan entender a qué grado los diversos haplotipos de varroa parasitando a *Apis mellifera*, el coreano y el japonés así como sus variantes, afectan las diferentes variables medidas en esta investigación: mortalidad, longevidad, peso corporal y deformidad de alas, al momento de emerger, e incluso otros parámetros, que pueden dar indicios de la diferencia en patogenicidad que tienen hacia su huésped. Aunque también se tiene que tomar en cuenta que las diferencias entre esta investigación y estudios similares pueden deberse a las diferentes metodologías empleadas así como al genotipo de abeja utilizado.

La gran pérdida de colonias de abejas a nivel mundial es considerada como un síndrome, es decir que son muchos factores los que están involucrados. Como se ha demostrado en ésta y otras investigaciones, la sinergia que existe entre la presencia del ácaro varroa en colonias de abejas melíferas, el haplotipo del ácaro y otro factores como diversas infecciones virales que se encuentran de manera encubierta, son factores de vital importancia a considerar para el control de esta parasitosis. Actualmente se han publicado varios estudios que demuestran que los ácaros varroa coexisten en colonias de abejas que también pueden estar afectadas por otros patógenos, como los son otros parásitos (*Acarapis woodi*, *Tropilaelaps clareae*), patógenos bacterianos (loque americana, loque europea, etc), virales (VAD, VIPA, VCE, etc.) y microsporidios (*Nosema spp*), que definitivamente provocan un efecto detrimental ya sea a nivel estructural (alas deformes, menor tamaño) como a nivel fisiológico (inmunosupresión), y que sin duda alguna disminuyen la vida promedio de las abejas como se ha demostrado en esta investigación.

En esta investigación no se logró comprobar que exista una resistencia constante que se deba a uno de los dos genotipos de abejas estudiados,

africanizadas y europeas. Sin embargo, sí se demostró que existe una resistencia de carácter temporal en cuanto a la replicación de los diferentes virus analizados en ambos genotipos de abejas. De acuerdo a los virus analizados y a los métodos empleados para su inoculación en abejas “sanas”, la diferencia en las cargas virales a distintos tiempos post infección nos hace concluir que existe una activación viral. De todos los virus analizados, se comprobó que el VAD es el que tiene un mayor impacto en la carga viral, así como la existencia de una respuesta diferenciada dependiente del genotipo de abeja. Las abejas africanizadas demostraron tener cierta resistencia al VAD, expresada en el retraso de su activación o incremento viral que se puede deber a una respuesta inmunológica más eficiente en comparación con las abejas europeas. Los resultados de esta investigación señalan que las infecciones virales pueden estar encubiertas, como lo fue el caso del VCRN, el cual fue detectado en el grupo de abejas testigo, las cuales no se sometieron a ningún tipo de tratamiento con varroa (homogeneizado o infestación artificial) así como en las que se inocularon con solución amortiguadora, sugiriendo que el estrés del enjaulamiento así como la manipulación de las abejas y la inyección provocó la replicación del virus en abejas adultas más no así en la cría de abejas africanizadas y europeas. Otro indicio de que pueden existir infecciones virales encubiertas fueron los resultados obtenidos para el VIPA el cual se logró detectar en la cría y abejas adultas de ambos genotipos al ser inyectadas con solución amortiguadora y someterlas al estrés del encierro. Se concluyó que la replicación viral temprana del VAD, el VCRN y del VIPA se redujo o retrasó tanto en la cría de abejas como en las abejas adultas africanizadas en comparación a lo observado para ambas etapas del desarrollo de las abejas europeas, demostrando así un mayor grado de resistencia en las abejas africanizadas a esos virus, aunque falta esclarecer si esta resistencia temporal tiene un efecto a largo plazo. El hecho de que un alto porcentaje de abejas africanizadas haya emergido con alas deformes en el estudio descrito en el capítulo II de esta tesis, demuestra que a pesar de su relativa resistencia al VAD en comparación con abejas europeas, este virus es muy dañino en abejas africanizadas del altiplano mexicano. Lo anterior refuerza la noción de

que aunque en la mayoría de los casos de infestación por *V. destructor* no colapsen las colonias en países como México, es importante controlar las poblaciones de este ácaro para que las colonias de abejas sean productivas. Esta inferencia coincide con estudios realizados en México con abejas africanizadas que demuestran que las infestaciones de *V. destructor* reducen significativamente la producción de miel (Arechavaleta-Velasco y Guzmán-Novoa 2000, Medina-Flores *et al.* 2011).

El manejo por separado de los diversos virus que están presentes en una colonia pudiera reducir en gran medida la morbilidad de las abejas, asociada a la infestación por varroa, y disminuir el estrés fisiológico al que éstas se ven sometidas (Martin *et al.* 2010), lo cual a su vez tiene un efecto detrimental en la fortaleza de las abejas para combatir otras enfermedades o incluso deficiencias nutricionales. Asimismo, es probable que la variabilidad genética de los ácaros parasitando a las abejas melíferas a nivel mundial, tenga efectos diferenciales en la transmisión de otros patógenos virales como se ha demostrado en estudios previos. La constante movilización de ácaros y abejas, ya sea por factores naturales como por prácticas apícolas, puede estar ocasionando un intercambio de variantes de patógenos entre las abejas lo cual puede verse reflejado en respuestas diferenciales en cuanto a resistencia o a tipo y eficiencia de la respuesta inmune.

Existen varios estudios que hacen énfasis en la búsqueda de estrategias y soluciones que permitan reducir el impacto de varroa en las colonias de abejas melíferas. Sin embargo, a pesar de esto, aún no se ha logrado un avance significativo en la materialización de una solución para esta patología; una de las más importantes que afecta a las abejas melíferas. Es necesario tener un conocimiento profundo y certero sobre la biología del ácaro, y sus interacciones con sus huéspedes, para que se logren desarrollar distintos métodos de control hacia esta ectoparasitosis; que sean sustentables, no dañinos para las abejas ni para el ser humano, amigables con el ambiente, eficaces, económicos y prácticos para los apicultores, y que permitan asegurar el futuro de la especie polinizadora

más importante del mundo. Las opciones más prometedoras son aquellas que están basadas en un control de tipo biológico utilizando hormonas, patógenos, predadores o antagonistas (Meikle *et al.* 2012). Otro ejemplo de control, específico para varroa, es el propuesto por Desai *et al.* (2012) quienes demostraron que cuando las abejas ingieren ARNdc, este se transfiere al ácaro y, a su vez, del ácaro a otras abejas, ello tiene como objetivo silenciar genes en el ácaro resultando en su mortalidad en un alto porcentaje (>60%), reduciendo así su población. En cuanto al control de las enfermedades virales, se han realizado pocos estudios con antivirales específicos contra algunos virus de las abejas melíferas basados en la tecnología de RNA de interferencia (Garbian *et al.* 2012). Es posible que la misma técnica sea aplicable para el control de varroa al usar como blanco aquellos genes que son de vital importancia para la supervivencia del ácaro (Hunter *et al.* 2010; Campbell *et al.* 2010).

Es evidente que es necesario seguir llevando a cabo investigaciones y generando conocimientos así como estrategias que ayuden a mitigar o controlar los diversos factores responsables de la pérdida de colonias de abejas melíferas debido a su importante papel en los ecosistemas. Sobre todo seguir estudiando el tipo y magnitud de daños que no sólo la simple parasitación de varroa provoca en las abejas sino también su participación en la transmisión, activación y replicación de los diferentes virus que las infectan.

Independientemente de los estudios que faltan llevarse a cabo, en esta investigación se demostró por primera vez, que en dos climas de México existen variantes del haplotipo coreano de *V. destructor*, considerado el más patógeno de los haplotipos del ácaro para las abejas melíferas. También se demostró que el daño que esta variante del ácaro puede ocasionar es alta (reducción de >30% en la emergencia de abejas y de >40% en su longevidad) y que el ácaro puede transmitir y activar la replicación de virus, en particular del VAD y del VCRN. Las abejas africanizadas mostraron una resistencia temporal a la replicación de estos virus, pero falta corroborar si el efecto ocurre a más largo plazo que el analizado

en esta investigación. Por lo tanto, estos resultados indican que de no controlarse las infestaciones de *V. destructor*, los daños en la salud y productividad de las colonias de abejas en México serían considerables.

Referencias

- Akinwande KL, Badejo MA, Ogbogu SS. 2013. Morphometrics and parasitic load of varroa mites (ACARI: VARROIDAE) on colonies of *Apis mellifera adansonii* (HYMENOPTHERA: APIDAE) in south western Nigeria. *Acarina* 21(1):17-26.
- Allen M and Ball BV 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77: 141-162.
- Alux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, et al. 2010. Interaction between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental biology* 12(3):774-82.
- Amdam GV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. 2004. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology* 97(3):741-747.
- Anderson DL and Gibbs AJ. 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *Journal of General Virology* 69:1617–1625.
- Anderson DL and Fuchs S. 1998. Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 37:69–78.
- Anderson DL and Trueman J.W. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24:165–189.
- Anderson DL, Morgan MJ. 2007. Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. *Experimental and Applied Acarology* 43:1-2.
- Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, and Zunino P. 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 93:67–70.
- Arechavaleta-Velasco ME, Guzmán-Novoa E. 2000. Honey production with fluvalinate-treated and untreated honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Valle de Bravo, México. *Veterinaria México* 30(4): 381-384.
- Arechavaleta-Velasco ME, Guzmán-Novoa E. 2001. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 32: 157-174.
- Bailey L 1967a. The incidence of virus diseases in the honey bee. *Ann Appl Biol* 60: 43-48.
- Bailey L 1967b. Acute bee paralysis virus in adult honey bees injected with sacbrood virus. *Virology* 33(2); 368.
- Bailey L 1969. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Annals of Applied Biology* 63:483–491.
- Bailey L and Fernando EFW. 1972. Effects of sacbrood virus on adult honey bees. *Annals of Applied Biology* 72; 27-35.
- Bailey L and Woods RD. 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *Journal of General Virology* 37; 175-182.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN. 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology* 103: 13-20.
- Bailey L and Ball BV. 1991. *Honey bee pathology*. Academic Press; London, UK. 193 pp.
- Ball BV and Bailey L. 1997. Viruses. In Morse, R; Blottum, K (Eds). *Honey bee pests, predators and diseases* (3rd Edition). A I Root; Medina Ohio, USA. 13-31 pp.
- Bee informed <http://beeinformed.org>
- Beetsma J, de Vries R, Emami Yeganeh B, Emami Tabrizi M and Bandpay V. 1989. Effects of *Varroa jacobsoni* Oud. on colony development, worker bee weight and longevity and

- brood mortality. En R. Cavalloro (Editor), Proceedings of a Meeting of EC-Experts' Group, Udine, 28–30 November 1988. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 163–170.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet JL. 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43: 348-370.
 - Benjeddou, M, Leat N, Allsopp M. and Davison S. 2001. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2384-2387.
 - Benjeddou M, Leat N, Allsopp M and Davison S. 2002. Development of infectious transcripts and genome manipulation of Black queen-cell virus of honey bees. *Journal of General Virology* 83: 3139-3146.
 - Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglbberger H, Nowotny N, 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (4); 2414–2420.
 - Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglbberger H, Topolska G, Ritter W. 2007. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicate recent global distribution of the virus. *Applied and Environmental Microbiology* 73:3605-3611.
 - Berthoud H, Imdorf A, Haueter M, Radloff S and Neumann P. 2010. Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 49:60-65.
 - Biasiolo A. 1992. Lack of allozyme variability among *Varroa* mite populations. *Experimental and Applied Acarology* 16: 287-294.
 - Blacquiere T, Smagghe G, van Gestel CAM, Mommaerts V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21: 973–992.
 - Boot WJ, Schoenmaker J, Calis JNM, Beetsma J. 1995. Invasion of *Varroa jacobsoni* into drone brood cells of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 26: 109-118.
 - Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology* 73:101–106.
 - Bowen-Walker PL, Gunn A. 2001. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101:207–217.
 - Brodschneider R and Crailsheim K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41:278-294
 - Büchler R, Drescher W, Tornier I. 1992. Grooming behaviour of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Experimental and Applied Acarology* 16:313–319.
 - Calderón RA, Zamora LG, Van Veen JW, Quesada MV. 2007. A comparison of the reproductive ability of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in worker and drone brood of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental and Applied Acarology* 43:25-32.
 - Calis JNM, Fries I, Rylie SC. 1999. Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30: 111–124.
 - Camazine S. 1986. Differential reproduction of the *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae) on Africanized and European honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* 75: 801-803
 - Campbell EM, Budge GE, Bowman AS. 2010. Gene-knockdown in the honey bee mite *Varroa destructor* by a non-invasive approach: studies on a glutathione S-transferase. *Parasites & Vectors* 3:73.

- Carneiro FE, Torres RR, Strapazzon R, Ramírez SA, Guerra JC Jr, Koling DF, Moretto G. 2007. 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. *Neotropical Entomology* 36(6):949-952.
- Carreck NL, Ball BV, Martin SJ. 2010. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research* 49: 93-94.
- Carter NP. 2007. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nature Genetics* 39:S16-S21.
- Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, and Brown M. 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *Journal of Invertebrate Pathology* 91:69-73.
- Chen CYJ, Jin S and Goodwin PH. 2000. An improved method for the isolation of total RNA from *Malva pusilla* tissues infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Phytopathology* 148: 57-60.
- Chen YP, Higgins JA and Feldlaufer MF. 2005. Quantitative analysis by real-time reverse transcription-PCR of deformed wing virus infection in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 71: 436-441.
- Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF. 2006a. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 606-611.
- Chen YP, Evans JD, Feldlaufer M. 2006 b. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 92:152-159.
- Chen YP, Siede R. 2007. Honey bee viruses. *Advances in Virus Research* 70:33- 80.
- Colony Collapse Disorder Progress Report <http://www.ars.usda.gov/is/br/ccd/ccdprogressreport2012.pdf>
- Contzen C, Garede A, Lamprecht I, Schmolz E. 2003. Calorimetric and biochemical investigations on the influence of the parasitic mite *Varroa destructor* on the development of honeybee brood. *Thermochimica Acta* 415:115-121.
- Coordinación General de Ganadería. 2010. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. SAGARPA. *Claridades Agropecuarias* 199:3-34
- Cornuet JM, Beaumont MA, Estoup A, Solignac M. 2006. Inference on microsatellite mutation processes in the invasive mite, *Varroa destructor*, using reversible jump Markov chain Monte Carlo. *Theoretical Population Biology* 69(2):129-144.
- Correa-Benitez A. 2004. Historia de la Apicultura en México. *Imagen veterinaria*. 4(1):4-9
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, van Engelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai JH, Cui LW, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS and Lipkin WI. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee Colony Collapse Disorder. *Science* 318: 283-287.
- Crailsheim K. 1998. Trophallactic interactions in the adult honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 29(1-2): 97-112.
- Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MM, Yohn CT, Tobin KP, Kashuk C, Mathews DJ, Shah NA, Eichler EE, Warrington JA, Chakravarti A. 2001. High-throughput variation detection and genotyping using microarrays. *Genome Research* 11: 1913-1925
- Dahle, B. 2010. The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *Journal of Apicultural Research* 49:124-125.
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L and Neumann P. 2012a. Predictive Markers of Honey Bee Collapse Disorder. *PLoS One* 7(2): e32151.
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L and Neumann P. 2012b. Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* 78(4):981.

- Dainat B, Neumann P. 2013. Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *Journal of Invertebrate Pathology* 112: 278-280.
- De Guzman LI, Rinderer TE, Stelzer JA. 1997. DNA evidence of the origin of *Varroa jacobsoni* Oudemans in the Americas. *Biochem Genet* 35:327-335.
- De Guzman LI, Rinderer TE, Stelzer JA, Anderson D. 1998. Congruence of RAPD and mitochondrial DNA markers in assessing *Varroa jacobsoni* genotypes. *Journal of Apicultural Research* 37:49-51.
- De Guzman LI, Rinderer TE. 1999a. Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees. *Apidologie* 30: 85-95.
- De Guzman LI, Rinderer TE, Stelzer JA. 1999b. Occurrence of two genotypes of *Varroa jacobsoni* Oud. in North America. *Apidologie* 30: 31-36.
- De Jong D, De Andrea Roma and Gonçalves LS. 1982. A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. *Apidologie* 13: 297-303.
- De Jong D, de Jong PH. 1983. Longevity of Africanized honeybees (Hymenoptera: Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes: Varroidae). *Journal of Economic Entomology* 76:766–768.
- De Jong D, Gonçalves LS, Morse RA. 1984. Dependence on climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* 20: 117-121.
- De Jong, D. 1997. Mites: *Varroa* and other parasites of brood. In: Morse R.A. and Flottum K. (Eds.), *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. Root Pub. Co., Medina, Ohio, pp. 279-327.
- De Jong DE and Soares AEE. 1997. An isolated population of Italian bees that has survived *Varroa jacobsoni* infestation without treatment for over 12 years. *American Bee Journal* 137: 742-745.
- De Mattos IM and Chaud-Netto J. 2011. Effects of natural infestations of the mite *Varroa destructor* on the development of Africanized honeybees workers (*Apis mellifera*). *Sociobiology* 58(1): 85-93.
- De Mattos IM and Chaud-Netto J. 2012. Analysis of mortality in Africanized honey bee colonies with high levels of infestation by *Varroa destructor*. *Sociobiology* 59: 1-12.
- De Miranda JR, Fries I. 2008. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology* 98:184 –189.
- De Miranda JR, Cordoni G, Budge G. 2010a. The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate pathology* 103: s30-s47.
- De Miranda JR, Genersch E. 2010b. Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S48-S61.
- De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge GE, Chejanovsky N, Chen YP, Gauthier L, Genersch E, de Graaf DC, Ribiere M, Ryabov E, De Smet L, van der Steen JJM. 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52(4):
- Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T. 2002. Comparison of relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of β -1, 3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivum*. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 347-356.
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Manch K, Budzinski H, Cluzeau S, Pham-Delegue MH. 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48:242-250
- Delfinado M 1963. Mites of the honeybee in South East Asia. *Journal of Apicultural Research* 2: 113-114.
- Delfinado-Baker M. 1988. Variability and biotypes of *Varroa jacobsoni* Oudemans. *American Bee Journal* 128:567–568.

- Delfinado-Baker M and Houck MA. 1989. Geographic variation in *Varroa jacobsoni* (Acari, Varroidae): application of multivariate morphometric techniques. *Apidologie* 20:345-358
- Desai SD, Eu YJ, Whyard S, Currie RW. 2012. Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion. *Insect Molecular Biology* 21: 446-455.
- Di Pasquellae G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet JL, Alux C. 2013. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLOS One* 8(8): e72016
- Di Prisco G, Zhang X, Pennacchio F, Caprio E, Li J, Evans JD, Degrandi-Hoffman G, Hamilton M, Chen YP. 2011. Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees, *Apis mellifera*. *Viruses* 3: 2425-2441.
- Downey DL, Winston ML. 2001. Honey bee colony mortality and productivity with single and dual infestations of parasitic mite species. *Apidologie* 32: 567-575.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.
- Eguaras, M, Marcangeli J, Oppedisano M and Fernandez N. 1995. Mortality and reproduction of *Varroa jacobsoni* in resistant colonies of honey bees (*Apis mellifera*) in Argentina. *Bee Sci.* 3: 174-178.
- Ellengren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5(6): 435-445.
- Emsen B, Petukhova T and Guzman-Novoa E. 2012. Factors limiting the growth of *Varroa destructor* populations in selected honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11: 4519-4525.
- Emsen B, Guzmán-Novoa E, Kelly PG. 2014. Honey production of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies with high and low *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) infestation rates in eastern Canada. *The Canadian Entomologist* 146: 236-240.
- Evans, JD. 2000. Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology* 9:1433-1449.
- Evans JD and Lopez DL. 2002. Complete mitochondrial DNA sequence of the important mite honey bee pest, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology* 27:69-78.
- Evans JD, Aronsteint K, Chen YP, Hetru C, Imier JL, Jiang H, Kanos M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D. 2006. Immune pathways and defense mechanisms in honey bee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*; 15(5):645-656.
- Evans JD, Spivak M. 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(1):S62-S72.
- Evans JD, Schwarz RS. 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in microbiology* 19(12): 614-620.
- Fedorova AA, Azzami K, Ryabchikova EI, Spitsyna YE, Silnikov VN, Ritter W, Gross HJ, Tautz J, Vlassov VV, Beier H and Zenkova MA. 2011. Inactivation of a non-enveloped RNA virus by artificial ribonucleases: Honey bees and acute bee paralysis virus as a new experimental model for in vivo antiviral activity assessment. *Antiviral Research* 91: 267-277.
- Flores J, Ruiz J, Puerta F, Campano F, Padilla F, Bustos M. 1998. El Grooming en *Apis mellifera iberica* frente a *Varroa jacobsoni* Oud. *Archivos de Zootecnia* 47:213-218.
- Free JB. 1957. The transmission of food between worker honeybees. *The British Journal of Animal Behaviour* 4:94-101.
- Free JB. 1959. The transfer of food between the adult members of a honey community. *Bee World* 40:193-201.
- Freiberg M, De Jong D, Message D and Cox-Foster D. 2012. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 11: 3310-331.

- Fries I, Camazine S, Sneyd J. 1994. Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World* 75: 5–28.
- Fries I, Imdorf A and Rosenkranz P. 2006. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee colonies (*Apis mellifera*) colonies in Nordic climate. *Apidologie* 37: 564-570.
- Fries I and Bommarco R. 2007. Possible host-parasite adaptations in honey bees infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 38: 525-533.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) FAOSTAT faostat3.fao.org/browse/Q/*/E 2012, 2013
- Fuchs S. 1990. Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* 21: 193-199.
- Gajic B, Radulovic Z, Stevanovic J, Kulisic Z, Vucicevic M, Simeunovic P, Stanimirovic Z. 2013. Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis. *Experimental and Applied Acarology* 61:97-105.
- Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68:810-821.
- Garbian Y, Maori E, Kalev H, Shafir S, Sela I. 2012. Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and *Varroa destructor*: *Varroa* gene silencing reduces *Varroa* population. *PLOS Pathogens* 8(12):e1003035.
- Garcia-Fernandez P, Rodriguez RB, Orantesbermejo FJ, 1995. Influence of climate on the evolution of the population-dynamics of the *Varroa* mite on honeybees in the south of Spain. *Apidologie* 26(5):371–380.
- Garrido C, Rosenkranz P. 2003. The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*. *Experimental and Applied Acarology* 31: 269–273.
- Garrido C, Rosenkranz P, Paxton RJ, Gonçalves LS. 2003. Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie* 34:535-541.
- Gauthier L, Tenchteva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Edouard MC, Bergoin M. 2007. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 38:426 – 436.
- Genersch E. 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(1): 87-97
- Genersch E and Aubert M. 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research* 41: 54.
- Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, Berg S, Ritter W, Mühlen W, Gisder S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P. 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41: 332-352.
- Gifford C. 2011. Colony Collapse Disorder : The Vanishing Honeybee (*Apis mellifera*). University of Colorado.
- Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE. 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* 491: 105–108.
- Gisder S, Aumeier P, Genersch E. 2009. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology* 90:463– 467.
- Gonçalves LS. 1986. The *Varroa* research program in the honey bee laboratory of the University of Sao Paulo in Ribeirao Preto. *Apidologie* 17: 371-374.
- Gregory, PG, Evans JD, Rinderer T, de Guzman L. 2005. Conditional immune gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science* 5:7.
- Griffiths AJF, Miller JH, Susuki DT, Lewontin RC and Gelbart WM. An introduction to Genetic Analysis. 6^a Ed. Freeman and Co, 2008

- Greenhall JA, Zapala MA, Cáceres M, Libiger O, Barlow C, Schork NJ, Lockhart DJ. 2007. Detecting genetic variation in microarray expression data. *Genome Research* 17(8): 1228-1235.
- Grovob OF, Pulenetz NM, Sofronov GLL. 1980. Geographical variability of the sizes of the dorsal scutellum in females of *Varroa jacobsoni* Oud. In Proc. XXVIIth Int. Beekeeping Congr., Athens 346-350.
- Guerra JCV, Issa MRC, Carneiro FE, Strapazzon R, Moretto G. 2010. RAPD identification of *Varroa destructor* genotypes in Brazil and other regions of the Americas. *Genetics and molecular Research* 9(1): 303-308.
- Guzman-Novoa E, Sánchez A, Page RE and García T. 1996. Susceptibility of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) and their hybrids to *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 27: 93-103.
- Guzman-Novoa E, Vandame R and Arechavaleta ME. 1999. Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apidologie* 30: 173-182.
- Guzman-Novoa, E.; Eccles, L.; Calvete, Y.; McGowan, J.; Kelly, P. G. and Correa-Benitez, A. 2010. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, 41: 443-450.
- Guzmán-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Espinosa-Montaño LG, Correa-Benítez A, Anguiano-Baez R, Ponce-Vázquez R. 2012. First detection of four viruses in honey bee (*Apis mellifera*) workers with and without deformed wings and *Varroa destructor* in Mexico. *Journal of Apicultural Research*. 51(4): 342-346.
- Guzmán-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Correa-Benítez A, Espinosa-Montaño LG, Uribe-Rubio JL. 2013. A scientific note on the first detection of black queen cell virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Mexico. *Apidologie* 44(4): 382-384.
- Hamiduzzaman MM, Sinia A, Guzmán-Novoa E, Goodwin PH. 2012. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 237-243.
- Hamilton MB. *Population Genetics*. Wiley-Blackwell. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK 2009.
- Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. 2013. GSVA: Gen set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 14:7-
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel F, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336:348–350.
- Higes M, Garcia-Palencia P, Martin-Hernandez R, Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* 94:211–217.
- Huber M, Mündlein A, Dornstauder E, Schneeberger C, Tempfer CB, Mueller MW, Schmidt WM. 2002. Accessing single nucleotide polymorphism in Genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays. *Analytical Biochemistry* 303(1): 25-33
- Hunter W, Ellis J, van Engelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, Williams M, Sela I, Maori E, Pettis J, Cox-Foster D, Paldi N. 2010. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *Plos Pathogens* 6:e1001160.
- Issa MRC. 1989. Enzyme patterns in *Varroa* and *Apis* from Brazil and Germany. *Apidologie* 20:506.

- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszack P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451; 990-993.
- Kantartzki, SK. 2013. *Microstaellites: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*
- Korst PJAM, Velthuis HHW. 1982. The nature of trophallaxis in honeybees. *Insectes Sociaux* 29(2): 209-221.
- Kovac H, Crailsheim K. 1988. Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation. *Journal of Apicultural Research* 27:230–238.
- Kowtal S and Arbol DP. 2009. Impact of *Varroa destructor* infestation on the body weight of developing honeybee brood and emerging adults. *Pakistan Entomologist* 31(1): 67-70.
- Kraus, B. and Hunt, G. 1995. Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud. populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Apidologie* 126: 283–290.
- Lanzi G, de Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, Camazine SM, Rossi C. 2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology* 80:4998-5009.
- Laurino D, Manino A, Patetta A, Porporate M. 2013. Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *Bulletin of Insectology* 66(1): 119-126.
- Lavine MD, Strand MS. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:1295-1309.
- Le Conte, Y., G. de Vaublanc, D. Crauser, F. Jeanne, J.-C. Rouselle, and J.-M. Be´card. 2007. Honey bee colonies that survived *Varroa destructor* in France. *Apidologie* 38: 566D572
- Le Conte Y, Ellis M, Ritter W. 2010. *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie* 41: 353-363.
- Le Conte Y, Navajas M. 2008. Climate change: impact on bee populations and their illness. *Revue scientifique et technique (international Office of Epizootics)* 27: 485-497.
- Lewin, B. 2003. *Genes VIII*. Benjamin Cummings; United States ed edition.
- Locke B, Le Conte Y, Crauser D, Fries I. 2012. Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. *Ecology and Evolution* 2(6): 1144-1150
- Maggi MD, Sardella NH, Ruffinengo SR, Eguaras MJ. 2009. Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitology Research* 105:1629-1636.
- Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Edelbaum O, Tanne E, Sela I. 2007. Isolation and characterization of IAPV, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for intra- and inter-species recombination. *Journal of General Virology* 88:3428–3438.
- Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev, H, Tsur E, Glick E, Sela I. 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Molecular Biology* 18(1):55-60.
- Martin SJ. 2001. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology* 38:1082–1093.
- Martin SJ, Ball BV, Carreck NL. 2010. Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 72-79.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S and Schroeder DC. 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336: 1304-1306.
- Martin, SJ, Ball BV, Carreck NL. 2013. The role of deformed wing virus in the initial collapse of varroa infested honey bee colonies in the UK. *Journal of Apicultural Research* 52:251-258.
- Matheson A. 1996. World bee health update. *Bee world* 77(1): 45-51.

- Medina-Flores CA, Guzmán-Novoa E, Aréchiga-Flores CF, Aguilera-Soto JI, Gutiérrez-Piña FJ. 2011. Efecto del nivel de infestación de *Varroa destructor* sobre la producción de miel de colonias de *Apis mellifera* en el altiplano semiárido de México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 2(3): 313-317.
- Medina-Flores CA, Guzmán-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Aréchiga-Flores CF and López-Carlos MA. 2014. Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in Mexico. *Genetics and Molecular Research* 13(3): 7282-7293.
- Meikle WG, Sammataro D, Neumann P, Pflugfelder J. 2012. Challenges for developing biopesticides against *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *Apidologie* 43(5):501-514.
- Möckel N, Gisder S, Genersch E. 2011. Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *Journal of General Virology* 92: 370-373.
- Mondragón L, Spivak M, Vandame R. 2005. A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Apidologie* 36:345-358.
- Moretto G, Gonçalves LS, De Jong D, Bichuette MZ. 1991. The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. infestations in Brazil. *Apidologie* 22:53-56
- Moretto G, Gonçalves LS, De Jong D. 1993. Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. *Brazilian Journal of Genetics* 16:71-77.
- Moretto G, Pillati A, De Jong D, Gonçalves LS, and Cassini FL. 1995. Reduction of *Varroa* infestations in the state of Santa Catarina, in southern Brazil. *American Bee Journal* 135:498-500.
- Moretto G, Mello LJ. 1999. *Varroa jacobsoni* infestation of adult Africanized and Italian honey bees (*Apis mellifera*) in mixed colonies in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 22:321-323.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Van Engelsdorp D, Pettis JS. 2010. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE* 5(3):e9754.
- Muñoz I, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Meana A, Higes M, De la Rúa P. 2008. Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies. *Journal of Apicultural Research*. 47(4): 310-313.
- Murilhas, AM. 2002. *Varroa destructor* infestation impact on *Apis mellifera carnica* capped worker brood production, bee population and honey storage in a Mediterranean climate. *Apidologie* 33:271–281.
- Nation JL, Sanford MT, Milne K. 1992. Cuticular hydrocarbons from *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology* 16:331.
- Navajas M, Fenton B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology. *Experimental and Applied Acarology* 24:751-774.
- Navajas M, Le Conte Y, Solignac M, Cros-Arteil S, Cornuet JM. 2002. The complete sequence of the Mitochondrial Genome of the Honeybee Ectoparasite Mite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). *Molecular Biology and Evolution* 19(12):2313-2317.
- Navajas M, Migeon A, Alaux C, Martin-Magniette M, Robinson G, Evans J, Cros-Arteil S, Crauser D, Le Conte Y. 2008 Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics* 9:301.
- Navajas M, Anderson DL, de Guzman, L, Huang Z, Clement, J, Zhou, T, Le Conte, Y. 2010. New Asian Types of *Varroa destructor* a potencial new threat for world apiculture. *Apidologie*: 181-193.

- Navajas M. 2010. Tracking the colonization history of the invasive species *Varroa destructor*. Trends in Acarology 374-378.
- Nielsen DI, Ebert PR, Page Jr RE, Hunt GJ and Guzman-Novoa E. 2000. Improved polymerase chain reaction-based mitochondrial genotype assay for the identification of the africanized honey bee (Hymenoptera, Apidae). Annals of Entomological Society of America 93:1-6.
- Nordström S, Fries I, Aarhus A, Hansen H, Korpela S. 1999. Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. Apidologie 30:475– 484.
- Ortega Rivas C y Ochoa Bautista R. 2004. Miel y Apicultura en México. Claridades Agropecuarias 128: 3-13.
- Oldroyd BP. 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. Trends in Ecology and Evolution 14: 312-315.
- Ollerton J, Winfree R and Tarrant S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? Oikos 120: 321-326.
- Page RE and Guzman-Novoa E. 1997. The Genetic Basis of Disease Resistance. In: Honey Bee Pests, Predators and Diseases (Morse RA and Flottum K, eds.). AI Root Co., Medina, OH, 469-492.
- Peng YS, Fang Y, Xu S, Ge L. 1987. The resistance mechanism of the Asian honey bee *Apis cerana* Fabr. To an ectoparasite mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. The Journal of Pathology 19:54-60.
- Potts SG, Blesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. 2010. Global pollinator declines: drivers and impacts. Trends in Ecology and Evolution 25:345–353.
- Rath W. 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 30: 97-110.
- Ribière M, Triboulot C, Mathieu L, Aurieres C, Faucon JP and Pepin M. 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. Apidologie 33: 339-351.
- Ribière M, Ball M, Aubert M. 2008. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In M. Aubert (Ed.) Virology and the honey bee. European Communities, Luxembourg, 15-84.
- Richards EH, Jones B, Bowman A. 2011. Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*. effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. Parasitology 138: 602-608.
- Ritter W and De Jong D. 1984. Reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. In Europe, the Middle East and tropical South America. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 95:55-57.
- Rocha HC and Almeida-Lara C. 1994. Flutuação populacional do ácaro *Varroa jacobsoni* O. em colméias de abelhas africanizadas, pp. 97-100. In: Congresso Iberolatinoamericano de Apicultura, 5. 1994. Cordoba. Anais. Cordoba: Sociedade Rural Rio Cuatro.
- Romero-Vera C, Otero-Colina G. 2002. Effect of single and successive infestation of *Varroa destructor* and *Acarapis woodi* on the longevity of worker honey bees *Apis mellifera*. American Bee Journal. 142(1): 54-57.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology 103:96 –119.
- Rothenbuhler WC. 1964 Resistance to American foulbrood in honey bees: I. Differential survival of larvae of different genetic lines. American Zoologist 4:111-123.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Anidno R, DeRisi JL. 2011. Temporal analysis if the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of know virus, Nosema and Crithidia. PLoS One 6(6): 1-18.
- Ruttner F and Maul V. 1983. Experimental analysis of reproductive interspecies: Isolation of *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* Fabr. Apidologie 14: 309-327.

- Salvy M, Martin C, Bagnères AG, Provost E, Roux M, Le Conte Y, Clément JL. 2001. Modifications of the cuticular hydrocarbon profile of *Apis mellifera* worker bees in the presence of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in brood cells. *Parasitology* 122:145–159.
- Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. 2000. A whole genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26): 14668-14673.
- Sammataro D, Gerson U, Needham G. 2000. Parasitic Mites of Honey Bees: Life History, Implications and Impact. *Annual Review of Entomology* 45: 519-548.
- Seeley TD. 2007. Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie* 38: 19-29.
- Schleif R. *Genetics and Molecular Biology*. 2nd Edition The Johns Hopkins University Baltimore, Maryland 1993
- Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D. 2005a. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic *Varroa* mite. *Journal of General Virology* 86:2281–2289.
- Shen M, Yang X, Cox-Foster D and Cui L. 2005b. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 342:141-149.
- Solignac M, Vautrin D, Pizzo A, Navajas M, Le Conte Y, Cornuet JM. 2003. Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes* 3: 556- 559.
- Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D, Le Conte Y, Anderson D, Evans J, Cros-Arteil S, Navjas M. 2005. The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272:411-419.
- Stort AC, Gonçalves LS, Malaspina O, Moura-Duarte FA. 1981. Study on Sinecar effectiveness in controlling *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 12(3): 289-291.
- Strapazzon R, Carneiro FE, Guerra Jr JCV and Moretto G. 2009. Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 8(3): 990-997.
- Sylvester, H., Rinderer, T.E. 1987. Fast Africanized bee identification system (FABIS) manual. *Am. Bee J.* 127: 511-516.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Teixeira EW, Chen YP, Message D, Boncristiani HF, Pettis JS and Evans JD. 2012. Israeli acute paralysis virus in Africanized honey bees in southeastern Brazilian Apiaries. *Journal of Apicultural Research* 51: 282 – 284.
- Teixeira EW, Chen YP, Message D, Pettis JS and Evans JD. 2008. Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 117-119.
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology* 70:7185-7191.
- Thompson GJ, Yockey H, Lim J, Oldroyd B.P. 2007. Experimental manipulation of ovary activation and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers: testing hypotheses of reproductive regulation. *Journal of Experimental Zoology* 307: 600–610.

- Todd JH, de Miranda JR, Ball BV. 2007. Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie* 38: 354–367.
- Topolska G, Gajda A, Pohorecka K, Bober A, Kasprzak S, Skubida M, Semkiw P. 2010. Winter colony losses in Poland. *Journal of Apicultural Research* 49:126-128.
- UNEP 2010 UNEP Emerging Issues: Global honey, bee colony disorders and other threats to insect pollinators.
- Van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM, Belzunces LP. 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 5:1-13.
- Van Engelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes J. 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: A report commissioned by the apiary inspectors of America. *American Bee Journal* 147:599–603.
- Van Engelsdorp D, Hayes Jr J, Underwood RM, Pettis J. 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLOS One* 3(12): e4071.
- Van Engelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, 2009. Colony collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* 4(8): e6481
- Van Engelsdorp D, Hayes Jr J, Underwood RM, Caron D, Pettis J. 2011. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research* 50: 1-10.
- Vetharaniam I, Barlow ND. 2006. Modelling biocontrol of *Varroa destructor* using a benign haplotype as a competitive antagonist. *New Zealand Journal of Ecology* 30(1): 87-102.
- Waage JK and Mumford JD. 2008. Agricultural biosecurity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 863-876.
- Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, DeRisi JL. 2002. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *PNAS* 99(24):15687–15692.
- Warrit N, Smith DR, Lekprayoon C. 2006. Genetic subpopulations of *Varroa* mites and their *Apis cerana* hosts in Thailand. *Apidologie* 37:19-30.
- White GF. 1913. Sacbrood, a disease of bees. *U.S. Dept. Agr., Bur. Ent. Cir.* 169: 1-5.
- Wilson-Rich N, Stephanie T. Dres, Philip T. Starks. 2008. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54: 1392–1399.
- Winston L. 1987. *The biology of the honeybee Apis mellifera*.
- Yang X, Cox-Foster DL. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 102:7470 –7475.
- Yang X, Cox-Foster DL. 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence microbial challenge. *Parasitology* 134:405-412.
- Yue C, Genersch E. 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology* 86:3419 –3424.
- Yue C, Schröder M, Gisder S, Genersch E. 2007. Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of General Virology* 88:2329 –2336.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.

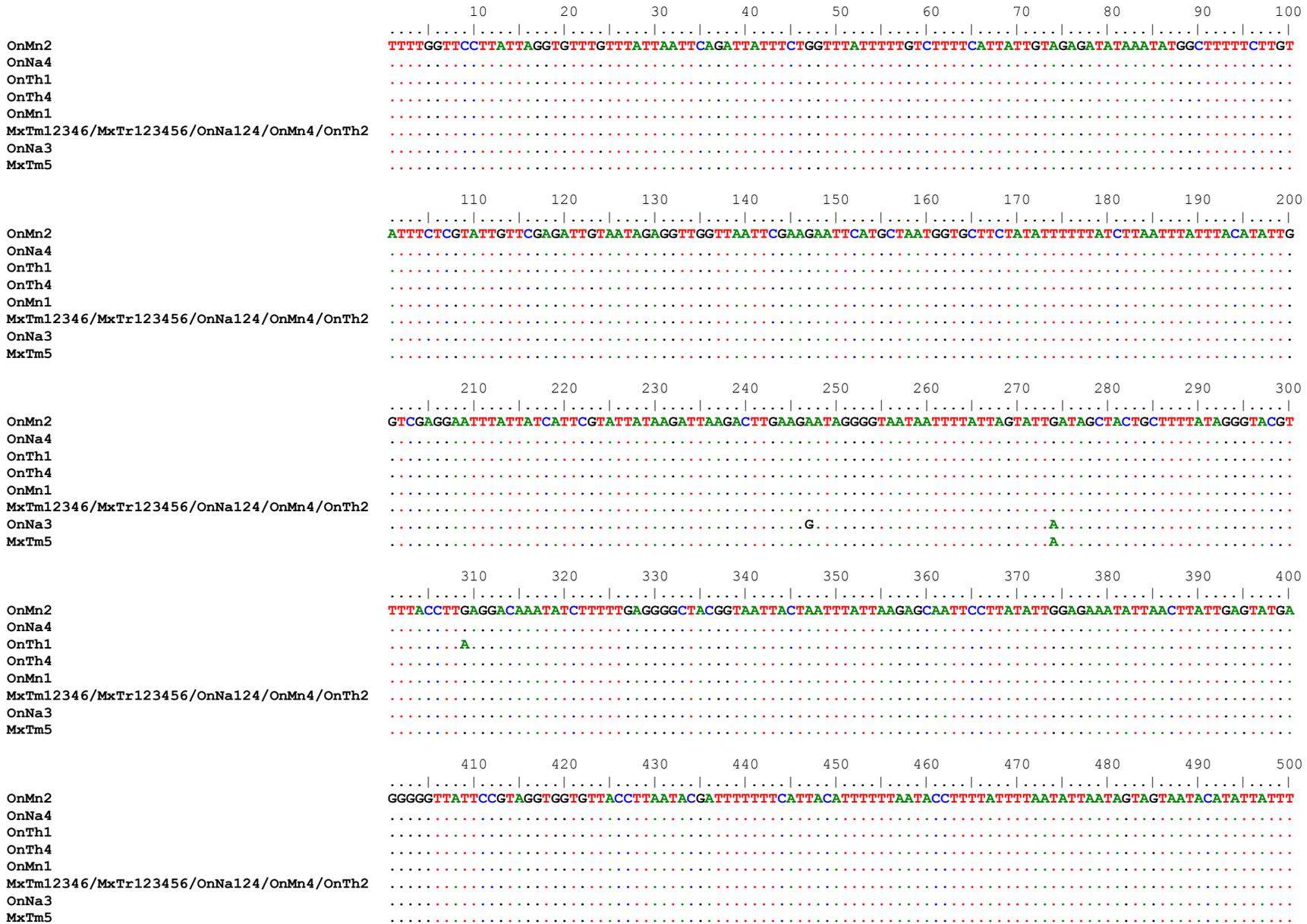
Lista de abreviaturas

μL	microlitro
A. cerana	<i>Apis cerana</i>
A. mellifera	<i>Apis mellifera</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP6	Subunidad 6 de la ATP sintasa F0 de <i>Varroa destructor</i>
ATP8	Subunidad 8 de la ATP sintasa F0 de <i>Varroa destructor</i>
CCD	Colony Collapse Disorder
CO-I	citocromo oxidasa C subunidad 1
CO-II	citocromo oxidasa C subunidad 2
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide - Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CYTB	citocromo b de <i>Varroa destructor</i>
dH ₂ O	Agua destilada
DEAE-C	Diethylaminoethyl-cellulose
FABIS	Fast Bee Identification System
HPT	Horas post tratamiento
M	Molar
mL	mililitro
mM	mili Molar
NaOAc	Oxaloacetato de sodio
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
OBA	Ontario Beekeeping Association
PBS	Phosphate Buffer Solution – Tampón fosfato salino
pUC18	plásmido de <i>E. coli</i>

Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Relative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCC	Síndrome del Colapso de la Colonias
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis
SSR	Simple secuencia repeat
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TTT	Tech Transfer Team
VAD	Virus de las alas deformes
VC	Virus de Cachemira
VCE	Virus de la cría ensacada
VCRN	Virus de las celdas reales negras
VIPA	Virus Israelí de la parálisis aguda

ANEXOS

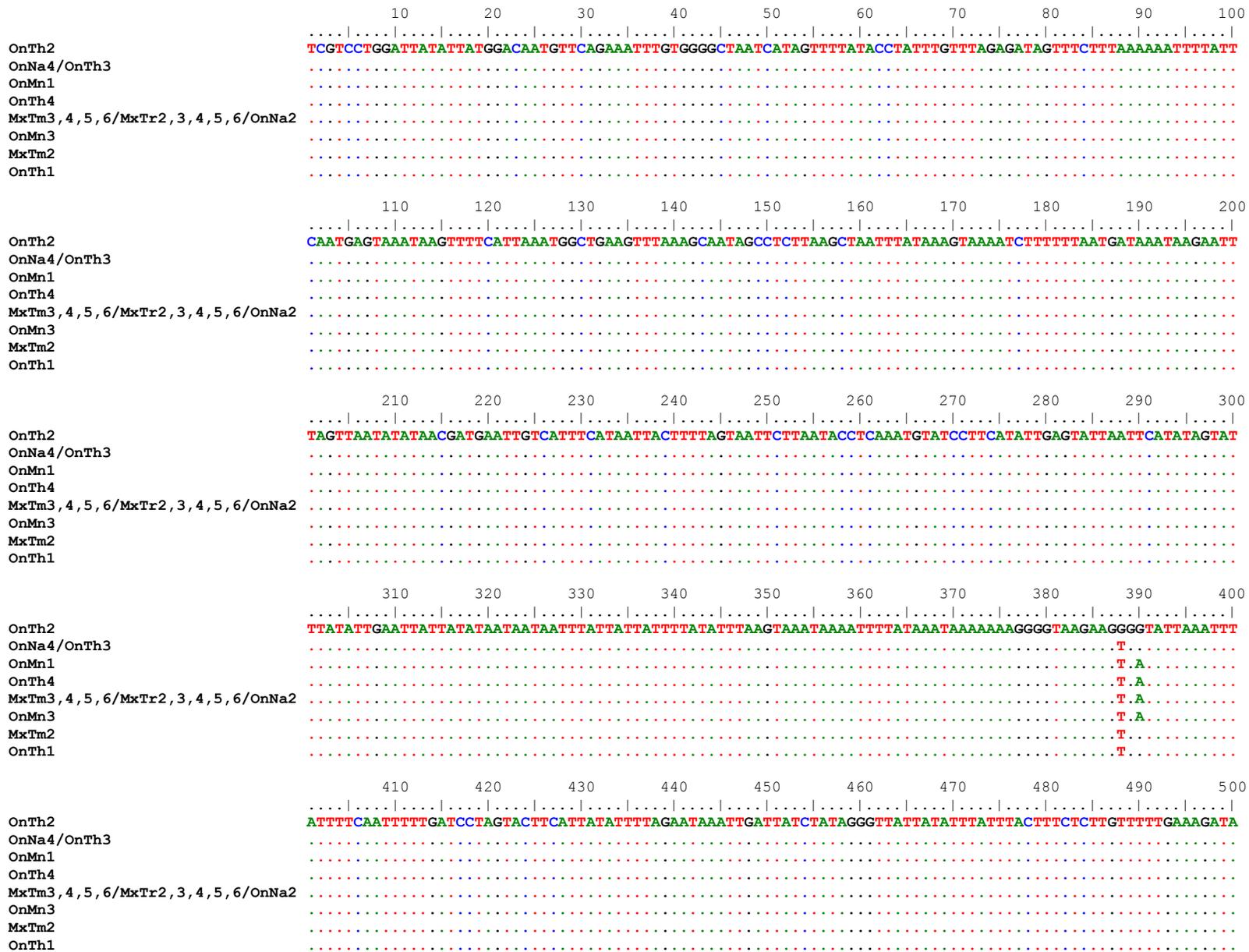
1. Variantes genéticas encontradas en las muestras de ácaros *Varroa destructor* colectados en México y Canadá para el gen *cytb*.



	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
OnMn2	TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGTAAGAAGAAATTTGATAAGGTTCCTTTTCATCCTTACTATACTTATAAGGATATTTAGGTAT									
OnNa4									
OnTh1A.....									
OnTh4									
OnMn1									
MxTm12346/MxTr123456/OnNa124/OnMn4/OnTh2									
OnNa3									
MxTm5									

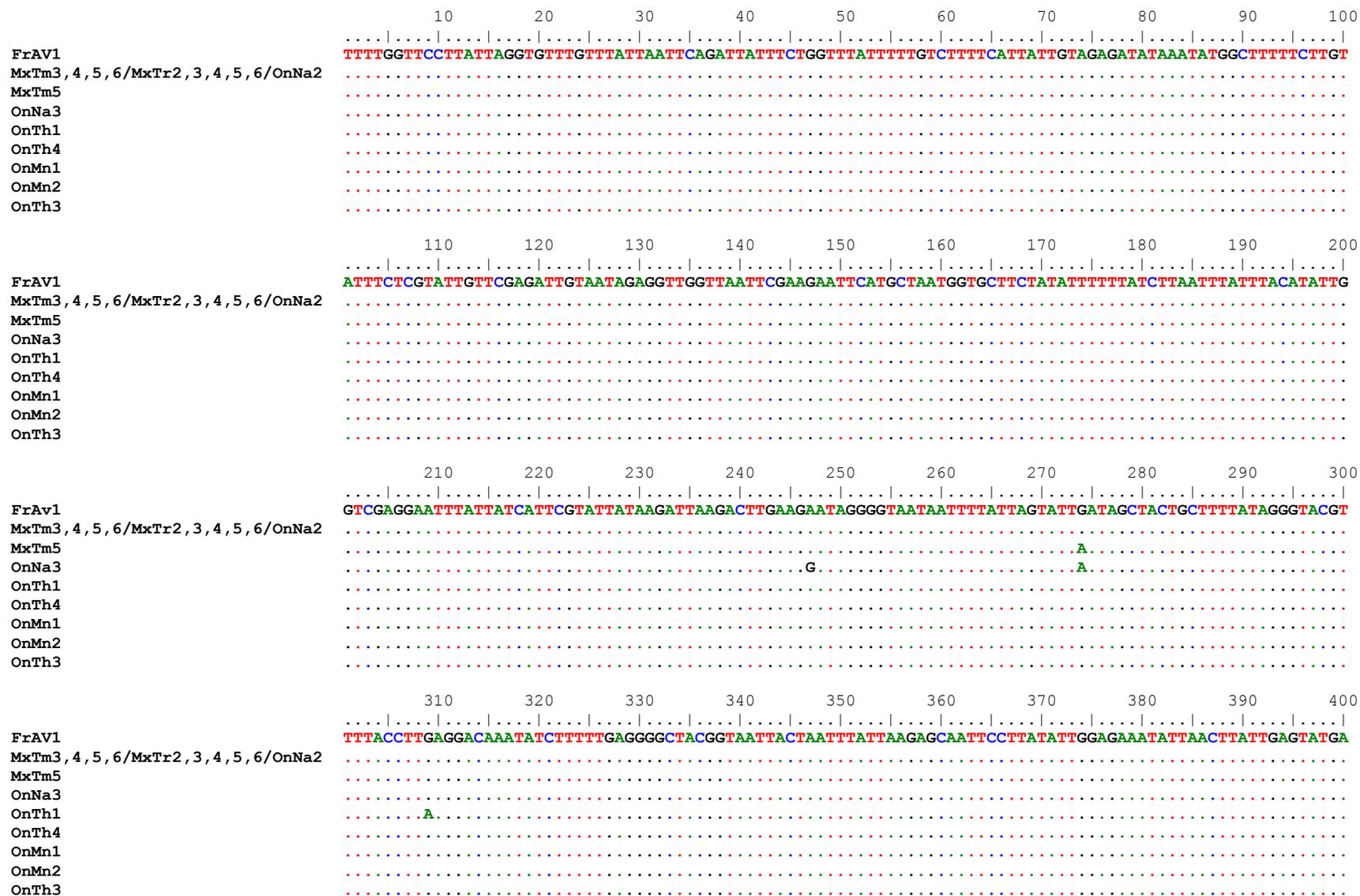
	610	620	630	640	650	660	670	680
OnMn2	TATCATTTTATTAAATAGTATTATATATGTAGTGTAAATTAAACCTTATATATTTATAGATCCTGAAATTTTAATCCCCCTAAT							
OnNa4	.A.....-.....C.A.....C.A.....T.-G.....							
OnTh1	.A.....A.....A.....T.G.....							
OnTh4	.A.....G.....A.....T.G.....							
OnMn1	.A.....A.....A.....T.T.G.....							
MxTm12346/MxTr123456/OnNa124/OnMn4/OnTh2	.A.....A.....A.....T.G.....							
OnNa3	.A.....A.....T.G.....							
MxTm5	.A.....A.....T.G.....							

2. Variantes genéticas encontrados en las muestras de ácaros *Varroa destructor* colectados en México y Canadá para el gen *cytII-ATP*.



	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
OnTh2									
OnNa4/OnTh3	AAGTCTCGTGAATATATTTATTTATTTACTGCAAGATATTTATGAAGAAATTGTTAATTTTAAAAATAAATAAGATATTAGTTATTTAT									
OnMn1									
OnTh4									
MxTm3, 4, 5, 6/MxTr2, 3, 4, 5, 6/OnNa2									
OnMn3G									
MxTm2									
OnTh1									
	610	620	630	640	650					
OnTh2									
OnNa4/OnTh3	TTATTACTATATTTTATTTAATAGGAAT-AAATTATTAGGGTTATTACCT									
OnMn1G									
OnTh4A									
MxTm3, 4, 5, 6/MxTr2, 3, 4, 5, 6/OnNa2									
OnMn3G.....GG									
MxTm2G.....GG									
OnTh1GG									

3. Sitios polimórficos encontrados en las secuencias de los ácaros colectados en México y Canadá en comparación con la secuencia del fragmento del gen *cytb* reportado en el genoma mitocondrial completo de varroa descrito por Navajas *et al.* (2002).



410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

FrAv1 GGGGGTTATTCGGTAGGTGGTGTACCTTAAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATACCTTTATTTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT

MxTm3,4,5,6/MxTr2,3,4,5,6/OnNa2

MxTm5

OnNa3

OnTh1

OnTh4

OnMn1

OnMn2

OnTh3

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

FrAv1 TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGTAAAGAAGAAATATGATTAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTATAAGGATATTTTAGGTAT

MxTm3,4,5,6/MxTr2,3,4,5,6/OnNa2

MxTm5

OnNa3

OnTh1 A

OnTh4

OnMn1

OnMn2

OnTh3

610 620 630 640 650 660 670 680

FrAv1 TATAATTTTATTAATAGTATTTATATATGTAGTGTAAATTAACCTTATATATTATAGATCCTGAAAAATTTTATCCCGCTAAT

MxTm3,4,5,6/MxTr2,3,4,5,6/OnNa2

MxTm5

OnNa3

OnTh1

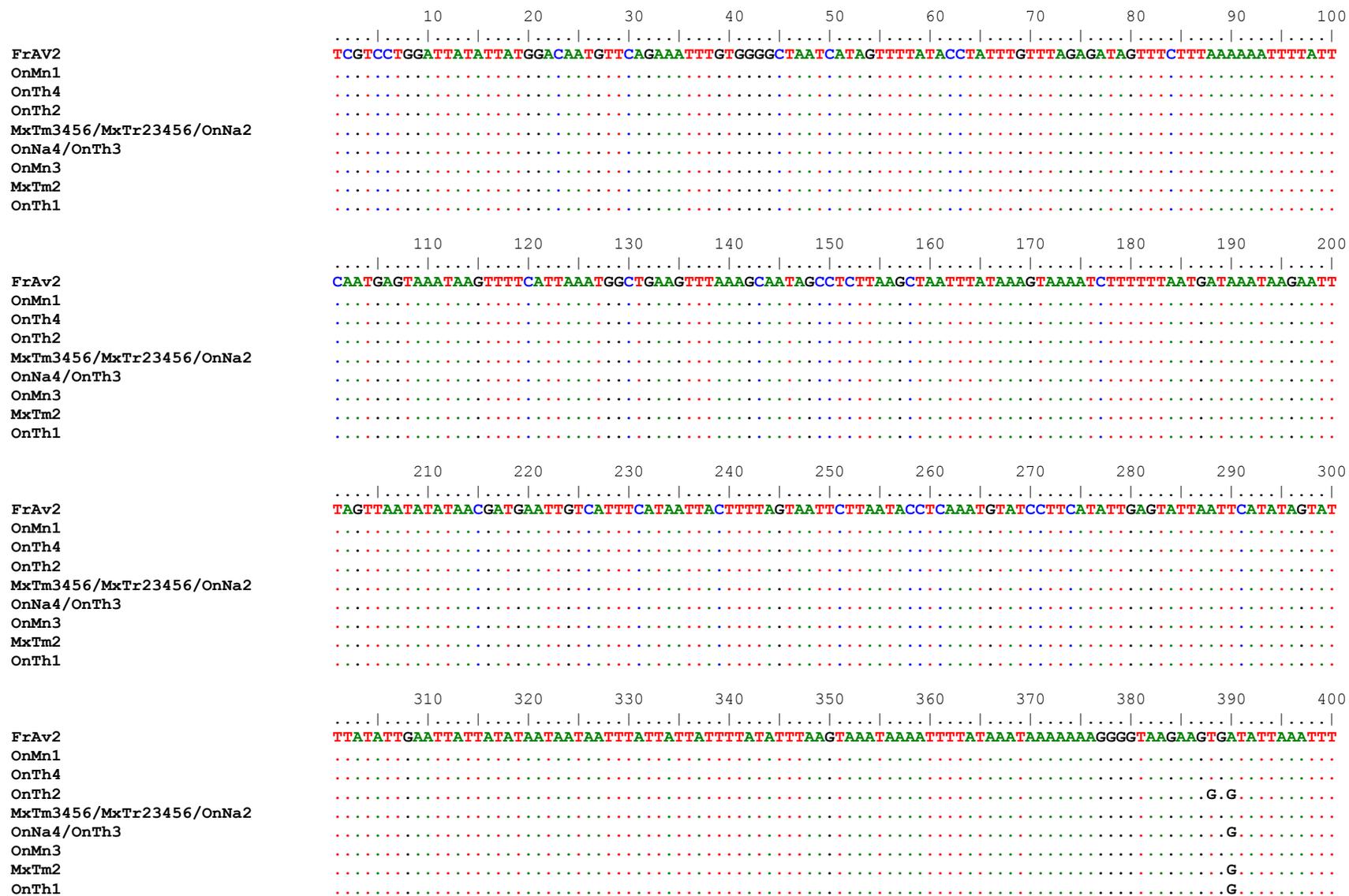
OnTh4 G

OnMn1 T

OnMn2 C C C A A C

OnTh3 C C C A C

4. Sitios polimórficos encontrados en las secuencias de los ácaros colectado en México y Canadá en comparación con la secuencia del fragmento del gen *cytII-ATP* reportado en el genoma mitocondrial completo de varroa descrito por Navajas *et al.* (2002).



```

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
FrAv2      A T T T T C A A T T T T G A T C C T A G T A C T T C A T T A T A T T T A G A A T A A A T T G A T T A T C T A T A G G G T T A T T A T A T T T A T T A C T T T C T C T G T T T T T G A A G A T A
OnMn1      .....
OnTh4      .....
OnTh2      .....
MxTm3456/MxTr23456/OnNa2 .....
OnNa4/OnTh3 .....
OnMn3      .....
MxTm2      .....
OnTh1      .....

```

```

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
FrAv2      A A G T C C G T G T A A T A T A T T T A T A T T A T A T T A C T G C A A G A T A T T A T A T G A A G A A A T T G T A G T T A A T T T T T A A A A A T A A A T A A G A T A T T A G T T A T T T A T
OnMn1      .....
OnTh4      .....
OnTh2      .....
MxTm3456/MxTr23456/OnNa2 .....
OnNa4/OnTh3 .....
OnMn3      .....
MxTm2      .....
OnTh1      .....

```

```

      610      620      630      640      650
FrAv2      T T A T T A C T A T A T T T T T A T T A A T A G G A A T A A A T T A T T T A G G G T T A T T A C C T
OnMn1      ..... A . T A . . T A . . G . T A . T G . C
OnTh4      ..... A .....
OnTh2      .....
MxTm3456/MxTr23456/OnNa2 .....
OnNa4/OnTh3 .....
OnMn3      ..... G . . . . G G .
MxTm2      ..... G . . . . G G .
OnTh1      ..... G . . . . G G .

```



```

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
Ixodes ricinus
Ac J1-3  GGGGGTTATTCAGTGGTGAATAAATACACTCACTCGATTTTTTTCATTACATTTTATTTTA CTTTTTACTACTACAAAGTAGTAATAATACATATTATA
Ac J1-4  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Am J1-6  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Ac J1-2  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Am J1-1  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Ac V1-1  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Ac C3-1  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Ac C2-1  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATACAAAGTAGTAATACATATTATT
Ac V1-3  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Ac V1-4  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Ac V1-2  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
OnMn2    GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
BRL-USA1 GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
OnTh3    GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
OnTh1    GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
OnTh4    GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
OnNa3    GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
OnMn1    GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
FrAv1    GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Am K1-1  GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
MxTm12346/MxTr123456/OnNa124/OnMn4/OnTh2 GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
Peshter1-SuviDo GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT
MxTm5    GGGGGTTATTCAGTGGTGGTGTACCTTAATACGATTTTTTTCATTACATTTTAAATA CTTTTTATTTAATATTAATAGTAGTAATACATATTATT

```

```

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
Ixodes ricinus
Ac J1-3  ATAAATCCATGAAAAGGGTCTAGAAATCCTTAGGATTAATAATTAATAATTTGATAAAATCCCTTCCACCCCTTACTCACAGTAAAGATATTCTGGGAT
Ac J1-4  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Am J1-6  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Ac J1-2  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Am J1-1  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Ac V1-1  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Ac C3-1  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Ac C2-1  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Ac V1-3  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Ac V1-4  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Ac V1-2  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
OnMn2    TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
BRL-USA1 TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
OnTh3    TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
OnTh1    TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
OnTh4    TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
OnNa3    TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
OnMn1    TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
FrAv1    TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Am K1-1  TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
MxTm12346/MxTr123456/OnNa124/OnMn4/OnTh2 TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
Peshter1-SuviDo TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --
MxTm5    TTTTACATGAAGATGGGTCAAGAAATCCTTAGGGGTAAGAAGAAATATTGATAAGGTTCCCTTTCATCCTTACTATACCTTATAAGGATATTTTAGG --

```

610 620 630 640 650 660 670 680

6. Resultados del alineamiento de las secuencias del fragmento cytb de *Thitarodes gonggaensis* (KP718817.1) como grupo externo versus las secuencias correspondientes del genoma mitocondrial de *V. destructor* reportado por Evans y Lopez (AY163547.1), Navajas *et al.* (AJ293124.2) y de las secuencias obtenidas de las muestras de ácaros colectados en México y Canadá.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Thitarodes gonggaensis
BRL-USA1 TTTTGGGTCCTTATTAGGTATTGTTTAAATCACCCAATTAATACGGATTATTTTTAACTATACATTATTCAGCAAAATATGACTTAGCTTTTATAGA
Ac V1-4 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Ac V1-2 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Ac V1-1 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Ac V1-3 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Ac C3-1 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Ac C2-1 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Peshter1 SuviDo TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
FrAv1 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Am K1-1 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Am J1-1 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Ac J1-2 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Am J1-6 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Ac J1-4 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
Ac J1-3 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
MxTm12346/MxTr123456/OnNa124/OnMn4/OnTh2 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
MxTm5 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
OnNa3 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
OnTh1 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
OnTh4 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
OnMn1 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
OnMn2 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT
OnTh3 TTTTGGTTCCTTATTAGGTGTTTGTTTAAATCAGATTAATTCGGTTATTTTTGTCTTTTCATTATTGTAGAGATATAAATATGGCTTTTTCTTGT

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
Thitarodes gonggaensis
BRL-USA1 GTTAATCATATTTGTCGAAATGTAAACTATGGTTGATTAATTCGTACATTACATCAAAATGGCGTTCATTTTTTTTCAATTTGATTTACATTCAATTTG
Ac V1-4 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
Ac V1-2 GTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGATTAATTCGAAGAAATTCATGCTAATGGAGCTTCTATATTTTTTATTTTAAATTTATTTACATATTG
Ac V1-1 GTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGATTAATTCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATTTTAAATTTATTTACATATTG
Ac V1-3 GTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATTTTAAATTTATTTACATATTG
Ac C3-1 GTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATTTTAAATTTATTTACATATTG
Ac C2-1 GTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATTTTAAATTTATTTACATATTG
Peshter1 SuviDo ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
FrAv1 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
Am K1-1 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
Am J1-1 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
Ac J1-2 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
Am J1-6 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
Ac J1-4 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
Ac J1-3 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
MxTm12346/MxTr123456/OnNa124/OnMn4/OnTh2 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
MxTm5 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
OnNa3 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
OnTh1 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
OnTh4 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
OnMn1 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
OnMn2 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG
OnTh3 ATTTTCGATATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGGTTGGTTAAATCGAAGAAATTCATGCTAATGGTGCCTTCTATATTTTTTATCTTAAATTTATTTACATATTG

```



```

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
Ixodes ricinus  ATCCCTTTAATTCACAT  TAAATTTTA  ATTTCA  TCAGCAGATGTAATT  CATT  CATGAACAGTTCCATCATTAGGGATAAAAAATAGA
BRL-USA2       TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
OnTh2         TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
OnNa4/OnTh3   TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
OnMn1         TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
OnTh4         TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
FrAv2         TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
MxTm3,4,5,6/MxTr2,3,4,5,6/OnNa2  TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
OnMn3         TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
MxTm2         TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG
OnTh1         TTTATATTGAATTATTATATAATAAATAAATTTTATTATTATTTTATATTTAAGTCAATAAAATTT  TTAATAAAATAAAAAAGG

```

```

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
Ixodes ricinus  TGCCGTTCCTGGTCGCCTTAAATCAGTCTTTTCCCTTGGCTTCACGCCAGGTTTATTTTGGACAATGTTCTGAAATTTGTGGAGCAAAATCATAGATTT
BRL-USA2       GG  TAGGAAGTGATATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
OnTh2         GG  TAAGAAGGGGTATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
OnNa4/OnTh3   GG  TAAGAAGTGGTATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
OnMn1         GG  TAAGAAGTGATATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
OnTh4         GG  TAAGAAGTGATATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
FrAv2         GG  TAAGAAGTGATATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
MxTm3,4,5,6/MxTr2,3,4,5,6/OnNa2  GG  TAAGAAGTGATATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
OnMn3         GG  TAAGAAGTGATATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
MxTm2         GG  TAAGAAGTGGTATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG
OnTh1         GG  TAAGAAGTGGTATT  AAATTTATTTTC  AATTTTTG  ATCCTAG

```

```

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
Ixodes ricinus  ATACCTATTCTCTTGAATTAACATCTTCAAAATAATTTTATTAAATGACTAAAATCTTTTTCATTGAATGGCTGAAATATTTAAGCATTTGGTCTCTTAAA
BRL-USA2       TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
OnTh2         TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
OnNa4/OnTh3   TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
OnMn1         TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
OnTh4         TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
FrAv2         TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
MxTm3,4,5,6/MxTr2,3,4,5,6/OnNa2  TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
OnMn3         TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
MxTm2         TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA
OnTh1         TACTTC  ATTATATTTTAGAATAAATTGATT  ATCT  ATAGGGTTATTATA

```

```

      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
Ixodes ricinus  CCACCTTTATAGTGAATCACCTTCAATGGAAAACTAGTTAAAAATTTTATAACATTAGAATGTCAATCTAAAATTACTTTTATATGTGTTTTTTAAATCC
BRL-USA2       TCGGATTTACTTTC  CTTGTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
OnTh2         TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
OnNa4/OnTh3   TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
OnMn1         TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
OnTh4         TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
FrAv2         TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
MxTm3,4,5,6/MxTr2,3,4,5,6/OnNa2  TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
OnMn3         TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
MxTm2         TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA
OnTh1         TTTATTTACTTTCTCTTGTTTTTGAAAGA  TAAAGTCTCGTG  TAATATATTTATATTTATTTACTGCAAAGATATTATATGA

```

	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
<i>Ixodes ricinus</i>	TC AAC TTTT CCTA TAAA TTGA ATTT TTTT ATCT ATTT TATTT CAAT TTTT ATTA AATA TTTT CTTT AATT AATT								TATATTTT TTTAT	AATAA
BRL-USA2	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
OnTh2	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
OnNa4/OnTh3	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
OnMn1	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
OnTh4	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
FrAv2	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
MxTm3, 4, 5, 6/MxTr2, 3, 4, 5, 6/OnNa2	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
OnMn3	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
MxTm2	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					
OnTh1	AGAAA TTGT AGTT AATT				TTTTAAAA TAAAT AAGAT ATTAGT TATTT TATTT TATT ACTA TATTT TTTT TATTT AATAG					

<i>Ixodes ricinus</i>	AAACTAAA
BRL-USA2	GAAT-AAA
OnTh2	GAAT-AAA
OnNa4/OnTh3	GAAT-AAA
OnMn1	GAATAAAA
OnTh4	GAAT-AAA
FrAv2	GAAT-AAA
MxTm3, 4, 5, 6/MxTr2, 3, 4, 5, 6/OnNa2	GAAT-AAA
OnMn3	GAAT-AAA
MxTm2	GAAT-AAA
OnTh1	GAAT-AAA

8. Resultados del alineamiento de las secuencias del fragmento cytlII-ATP de *Thitarodes gonggaensis* (KP718817.1) como grupo externo versus las secuencias correspondientes del genoma mitocondrial de *V. destructor* reportado por Evans y Lopez (AY163547.1), Navajas *et al.* (AJ293124.2) y de las secuencias obtenidas de las muestras de ácaros colectados en México y Canadá.

