

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA CONDUCTUAL DE NODRIZAS DE *APIS*  
*MELLIFERA* L. INFECTADAS CON LA VARIANTE A DEL VIRUS DE LAS ALAS  
DEFORMADAS (DWV-A)**

**POR**

**SEBASTIAN ANDRES SALAZAR IBAÑEZ**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
AGRÓNOMO**

**CHILLÁN-CHILE  
2024**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA CONDUCTUAL DE NODRIZAS DE *APIS*  
*MELLIFERA* INFECTADAS CON LA VARIANTE A DEL VIRUS DE LAS ALAS  
DEFORMADAS (DWV-A)**

**POR**

**SEBASTIAN SALAZAR IBÁÑEZ**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN-CHILE  
2024**

Aprobado por:

Profesor Asociado, Yolanda Marisol Vargas C.  
Ing. Agrónomo. Dr.

---

Guía

Profesor asociado, Nolberto Arismendi S.  
Ing. Agrónomo. M. Sc. Dr.

---

Asesor

Profesor Asociado, Diego Silva  
Ing. Biotecnología Vegetal. M. Sc.

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.  
Ing. Agrónomo. M. Sc.

---

Decano

## **RECONOCIMIENTOS**

Estudio financiado por el proyecto FONDECYT N°1241994, ANID, Chile

## TABLA DE CONTENIDOS

|                             | <b>Página</b> |
|-----------------------------|---------------|
| Resumen.....                | 1             |
| Summary.....                | 2             |
| Introducción.....           | 2             |
| Materiales y métodos.....   | 5             |
| Resultados y discusión..... | 9             |
| Conclusiones.....           | 17            |
| Referencias.....            | 18            |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

|          |                                                                                                                                                                                                                                                           | Página |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1 | Índice de preferencia olfativa para <i>A. mellifera</i> no inoculadas (N-DWV) e inoculadas (I-DWV) con la variante A del virus de las alas deformadas al alcohol bencílico <i>versus</i> etanol en ensayos de tubo Y.....                                 | 10     |
| Figura 2 | Índice de preferencia olfativa para <i>A. mellifera</i> no inoculadas (N-DWV) e inoculadas (I-DWV) con la variante A del virus de las alas deformadas al alcohol bencílico <i>versus</i> aceite esencial de <i>M. piperita</i> en ensayos de tubo Y ..... | 11     |
| Figura 3 | Carga viral de DWV-A en cabeza de <i>A. mellifera</i> a diferentes edades en que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) .....                                                                                                                  | 12     |
| Figura 4 | Carga viral de DWV-A en antena de <i>A. mellifera</i> a diferentes edades en que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) .....                                                                                                                  | 12     |
| Figura 5 | Expresión de genes codificantes para OBP5 en antenas de adultos de <i>A. mellifera</i> a diferentes edades y que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) con el virus DWV-A .....                                                               | 14     |
| Figura 6 | Expresión de genes codificantes para OBP 11 en antenas de adultos de <i>A. mellifera</i> a diferentes edades y que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) con el virus DWV-A.....                                                              | 14     |

|          |                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 7 | Expresión relativa de genes codificantes de Neurexina (AmNrx-1) para proteínas neuronales en cabezas de adultos de <i>A. mellifera</i> inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) con el virus DWV-A a diferentes edades.....   | 16 |
| Figura 8 | Expresión relativa de genes codificantes de Neuroligina (AmNlg-1) para proteínas neuronales en cabezas de adultos de <i>A. mellifera</i> inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N DWV) con el virus DWV-A a diferentes edades..... | 16 |
| Tabla 1  | Secuencia de partidores utilizados en la cuantificación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR).....                                                                                                          | 8  |

## **ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA CONDUCTUAL DE NODRIZAS DE *APIS MELLIFERA* L. INFECTADAS CON LA VARIANTE A DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV-A)**

ALTERATION ON THE BEHAVIORAL RESPONSE BY NURSES OF *APIS MELLIFERA* L. INFECTED WITH VARIANT A OF THE DEFORMED WINGS VIRUS (DWV-A)

**Palabras índice adicionales:** Abejas melíferas, feromonas, conducta, proteínas OBP, Neurexinas, Neuroliginas.

### **RESUMEN**

El polietismo temporal de *Apis mellifera* L. distribuye tareas según la edad, siendo las abejas nodrizas (5-15 días) responsables de labores internas en la colmena. La conducta de estos insectos está coordinada por el olfato. Sin embargo, en *abejas* infectadas por la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A), se observa una disminución en la capacidad olfativa y en la expresión de genes que codifican para proteínas de unión a odorantes (OBP), lo que podría alterar su comportamiento. Por tanto, se evaluó la respuesta conductual de *A. mellifera* infectadas con DWV-A ante diferentes estímulos. Abejas recién emergidas (1 día) fueron inoculadas y no inoculadas (control) con DWV-A. A los 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación, se realizaron pruebas en tubos Y con estímulos de alcohol bencílico (componente de feromona de larvas) y etanol. En *A. mellifera* inoculadas y evaluadas a los 10, 15 y 20 días, el 60%, 73% y 53% no mostraron preferencia por ningún estímulo, mientras que solo un 10%, 13% y 23% prefirió el componente de feromona de larvas. En contraste, las *A. mellifera* control mostraron una preferencia mayor al componente de feromona. Estos resultados sugieren que la infección con DWV-A afecta la respuesta conductual, comprometiendo la cohesión de la colmena.

## SUMMARY

The temporal polyethism of *Apis mellifera* L. involves task distribution based on age, with nurse bees (5 - 15 days old) primarily responsible for internal hive tasks. The behavior of these insects is coordinated by olfaction. However, bees infected with the variant A of the deformed wing virus (DWV-A) exhibit reduced olfactory capacity and OBP gene expression, potentially altering their behavior. This study evaluated the behavioral response of *A. mellifera* infected with DWV-A to different stimuli. Newly emerged bees (1 day old) were inoculated and not inoculated (control) with DWV-A. At 5, 10, 15, and 20 days post-inoculation, Y-tube tests were conducted using stimuli of benzyl alcohol (larval pheromone component) and hexane. In bees inoculated with DWV-A and evaluated at 10, 15, and 20 days, 60%, 73%, and 53% showed no preference for any stimulus, while only 10%, 13%, and 23% preferred the larval pheromone component. In contrast, control bees showed a higher preference for the pheromone component. These results suggest that DWV-A infection affects behavioral response, potentially compromising hive cohesion.

## INTRODUCCIÓN

La polinización de los cultivos es un proceso crucial para los ecosistemas y la producción agrícola (Aguilar *et al.*, 2006; Potts *et al.*, 2016) ya que permite la viabilidad de plantas con flor, estando directamente relacionada a la cantidad, calidad y diversidad de semillas producidas y la obtención del fruto (Chautá-Mellizo *et al.*, 2012; Vergara y Badano, 2009; Vilhena *et al.*, 2012).

Existen distintos métodos de polinización, puede ser de forma abiótica, mediante el transporte del polen por el viento o el agua, o de forma biótica, transportado por animales (Bonilla, 2016). La polinización biótica es de gran importancia económica en el mundo, de ella dependen el 87% de las especies cultivadas, lo cual representa el 35% del suministro global de alimentos (Hoehn *et al.*, 2008; Klatt *et al.*, 2013; Mallinger y Gratton, 2014).

Se estima que el 60,3% de todas las polinizaciones son efectuadas por los insectos, imponiéndose como el grupo de polinizadores más importantes tanto para especies cultivadas como silvestres (Bonilla, 2016., Fründ *et al.*, 2013). Entre los

insectos polinizadores, se destaca el rol que cumplen las *A. mellifera* como insecto polinizador, el cual cumple un papel fundamental en la agricultura que ha sido ampliamente demostrado para todo tipo de cultivo (Rader *et al.*, 2013; Garibaldi *et al.*, 2013).

Una característica esencial de las *A. mellifera* es su agudo sentido del olfato que le permiten desarrollar un comportamiento social altamente cooperativo, con funciones bien definidas dentro y fuera de la colmena como son el cuidado de crías, forrajeo, mantención de la colmena, limpieza, entre otros. El sistema olfativo de las *A. mellifera* ubicado en las sensilas de las antenas (Groot *et al.*, 2016) es fundamental para la detección quimiosensorial de feromonas y aromas que dan lugar a la gestión y mantención de la cohesión interna de la colonia (Li y Liberles, 2015; Groot *et al.*, 2016). No obstante, algunos patógenos que afectan a *A. mellifera* son perjudiciales para su comportamiento individual y el funcionamiento de la colmena.

Entre los patógenos que afectan a *A. mellifera*, se encuentra el virus de las alas deformadas (DWV, Deformed wing virus), un virus con 3 variantes conocidas a día de hoy (A, B y C), todas de gran relevancia en el mundo. En los últimos 40 años se ha propagado rápidamente y ha sido reportado en más del 50% de todas las colonias en 32 países, además de afectar a 8 órdenes de artrópodos (Martin y Brettell, 2019), siendo la variante B la predominante en Europa (Kevill *et al.*, 2019; McMahon *et al.*, 2016). En Chile, la variante A es la predominante (Vargas *et al.*, 2017) y a pesar de estar descrita la variante B, su prevalencia y cargas virales son bajas (Riveros *et al.*, 2020).

Este patógeno causa deformación de las alas, distensión abdominal, alteraciones del sistema nervioso central y periférico (Iqbal y Mueller, 2007), alteraciones del comportamiento (Lanzi *et al.*, 2006; Grozinger *et al.*, 2019) y compromete el correcto funcionamiento del sistema olfativo asociado a la sensibilidad e interpretación de los aromas (Forêt y Malezka, 2006; Silva *et al.*, 2021), afectando a funciones fisiológicas vitales como la detección de comida, evitar depredadores y patógenos (Groot *et al.*, 2016). Recientemente se demostró la capacidad de la variante A del virus (DWV-A) de replicarse en regiones basales del epitelio antenal (Kim *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que la presencia del

ácaro *Varroa destructor* A. genera aumentos en las cargas virales de DWV-A, provocando disminuciones en la expresión de genes responsables de la memoria y el aprendizaje, como la proteína postsináptica neurexina (AmNrx-1) y presináptica neuroligina (AmNlg-1) (Morfin *et al.*, 2020). Sin embargo, la disminución de estos genes se ha observado en la interacción de estos patógenos, sin determinar si el virus por sí solo es capaz de alterar su expresión.

Recientemente, Silva *et al.* (2021) demostraron que la presencia de este patógeno se asocia a una disminución de la expresión génica de proteínas de unión a odorantes (OBPs, del inglés Odorant-Binding Proteins). En *A. mellifera*, se han encontrado 21 OBPs de las cuales 9 son de expresión específica en antenas (Forêt y Malezka., 2006; Silva *et al.*, 2021). Se ha documentado la contribución de estas proteínas en la sensibilidad del sistema olfativo (Leal, 2013) y su rol en la realización de actividades dentro de la colmena. La OBP5 se asocia particularmente al proceso de cuidado de larvas (Pelletier *et al.*, 2010). Esta proteína es de gran importancia pues se relaciona directamente con la labor nodriza de *A. mellifera*. Así mismo, las OBP5 y OBP11 tienen afinidad con los compuestos volátiles generados por larvas enfermas que solicitan ser cuidadas por *A. mellifera* nodrizas (Zhao *et al.*, 2013). Algunos de los volátiles específicos generados por crías enfermas son el acetato de fenetilo, etanol fenílico y alcohol bencílico (Plettner *et al.*, 2017), siendo de estos tres el alcohol bencílico el compuesto más competitivo por el sitio de reconocimiento de la proteína OBP5 (Zaho *et al.*, 2013). La OBP2 es una proteína asociada a la selectividad de aromas vegetales (Briand *et al.*, 2001) y al rol de las *A. mellifera* nodrizas y al cuidado interno de la colmena. Por otra parte, la OBP12 se expresa en las antenas en todos los estadios de *A. mellifera*, lo que sugiere un importante rol de reconocimiento de aromas dentro y fuera de la colmena (Nie *et al.*, 2018). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la expresión génica de estas proteínas se ve disminuida en presencia de altas cargas virales en las antenas, junto a lo cual se evidenció una disminución de la sensibilidad olfativa a diferentes aromas en las *A. mellifera* infectadas (Silva *et al.*, 2021).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de DWV-A sobre la conducta de nodrizas de *A. mellifera*

frente a un estímulo de la feromona de alarma de las larvas y la expresión de genes asociados a la preferencia olfativa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Preparación del inóculo**

Se obtuvo un aislado DWV-A desde colonias infectadas. Un grupo de 20 *A. mellifera* se homogeneizó en una bolsa stomacher con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (1x PBS) durante 90 s a alta velocidad en un equipo stomacher 80 (Seward, Londres, Reino Unido).

Las muestras se centrifugaron a 1.500 *g* durante 10 min, seguido de 10.000 *g* durante 10 min, ambos a 4 °C. El sobrenadante se purificó por filtración con un filtro de 0.22 µm (PES, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Posteriormente, se utilizaron 200 µL del sobrenadante para la extracción de ARN, la síntesis de ADNc y la cuantificación posterior de la carga viral del inóculo.

### **Inoculación de *A. mellifera***

Los ejemplares de *A. mellifera* adultas para el ensayo fueron obtenidos del apiario experimental ubicado en el centro experimental "El Nogal" (36 ° 35'58.25 " S - 72 ° 04'51.77 " W), Universidad de Concepción, Chillan, Chile.

Los marcos de cría se mantuvieron en condiciones controladas en una sala de cría (30 °C ± 1; 60% ± 3 HR). Posteriormente, las *A. mellifera* obreras recién emergidas (24 h de edad) fueron cuidadosamente recolectadas y confinadas al azar en jaulas de plástico.

Se establecieron dos tratamientos. Un grupo de *A. mellifera* inoculadas (tratamiento I-DWV) oralmente con 5 µL de una suspensión viral ( $1.0 \times 10^9$  número de copias por abeja) en una solución de sacarosa al 50%. Otro grupo de *A. mellifera* no inoculadas con la suspensión viral (tratamiento N-DWV), como control. Luego, 50 *A. mellifera* obreras se mantuvieron en jaulas de plástico (3 réplicas por tratamiento) con 3 g de sustituto de polen y se suministró jarabe de sacarosa 60% *ad libitum*. Posteriormente, a los 5, 10, 15 y 20 días post inoculación viral (dpi) se realizaron los ensayos de elección, tomando a 30 *A. mellifera* al azar de las tres repeticiones.

### **Preparación de estímulos**

Para los ensayos conductuales se utilizaron como estímulos, el aceite esencial de *Mentha piperita* L. y un estándar puro de alcohol bencílico, los cuales se obtuvieron de manera comercial.

### **Bioensayos olfatométricos**

La respuesta conductual de *A. mellifera* a los volátiles del aceite esencial de *M. piperita* y el alcohol bencílico se realizó utilizando un olfatómetro de tubo en Y de vidrio (21 cm de largo con un diámetro interno de 3 cm), con cámaras de olor de vidrio (15 cm de largo con un diámetro interno de 3 cm) que se conectaron al extremo de los brazos del tubo en Y para administrar el estímulo utilizando aire filtrado a 280 mLmin<sup>-1</sup> con una bomba de aire de presión positiva. Se aplicó un volumen de 10 µL de cada estímulo diluido en etanol a una concentración de 100 µLmL<sup>-1</sup> (Liu *et al.*, 2023) a una tira de papel de filtro (1 × 7,5 cm). Se dejaron evaporar los solventes durante 30 s y luego se colocaron dentro de una cámara de olor. Se utilizaron treinta *A. mellifera* obreras de 5, 10, 15 y 20 días de edad (120 *A. mellifera* obreras en total) por ensayo y condición de salud (I-DWV o N-DWV) (n=320). A cada abeja obrera se le permitió moverse libremente dentro del olfatómetro durante 6 minutos. La primera elección de cada insecto en ese período de tiempo en cualquiera de los brazos del tubo en Y se consideró una elección. La distribución de elección se definió como: elección positiva al brazo donde se aplicó el estímulo, elección negativa al brazo sin estímulo y no elección cuando al final del tiempo de evaluación el insecto no elige las zonas anteriormente mencionadas. Las *A. mellifera* obreras fueron sometidas a pruebas de elección entre alcohol bencílico *versus* aire y aceite esencial *versus* alcohol bencílico (n total = 640). Después de la elección de cada abeja, se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

### **Extracción de ARN y síntesis de ADNc**

Para la cuantificación de la carga viral (DWV) y la expresión de los genes neuronales, AmNrx-1 y AmNlg-1 y los genes que codifican OBP 5 y 11, se extrajo ARN desde muestras individuales. Se seleccionaron entre 2 - 5 *A. mellifera* dependiendo de la distribución de estos en las elecciones realizadas en el ensayo olfatométrico. Posterior a ello cada individuo fue diseccionado en tres; cuerpo,

cabeza y antena. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó a cada órgano antes nombrado. La extracción de ARN desde cabeza y antena se llevó a cabo según Kim *et al.* (2019) y Mondet *et al.* (2015) con modificaciones dependiendo del órgano. En resumen, tanto las cabezas como las antenas se enfriaron a -80 °C y luego se molieron agregando 200 µL de Trizol™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y 1 y 5 µL de Carrier RNA para cabeza y antena, respectivamente, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Al homogeneizado se le añadió etanol absoluto (100%) y 200 µL de cloroformo, y se incubó a 4 °C por 10 min. Luego se centrifugó dos veces, durante 5 min y 7 min a  $10.000 \times g$  a 4 °C y, finalmente, se recolectó el sobrenadante para la extracción de ARN. Por otra parte, la extracción de ARN desde cuerpo de *A. mellifera* se realizó según lo descrito por Vargas *et al.* (2017). En resumen, cada cuerpo de abeja (sin antena ni cabeza) fue macerado en una solución tampón salina PBS, se colectaron 200 µL del macerado que fueron utilizados para la extracción de ARN. La extracción del ARN se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por E.Z.N.A. Kit de ARN total I (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, EE. UU.). La calidad y el rendimiento del ARN se determinaron en un espectrofotómetro (Infinite 200 PRO NanoQuant, Tecan Group, Männedorf, Suiza). El ARN extraído se utilizó posteriormente para la síntesis de la primera cadena de ADNc, mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

### **Análisis de expresión génica**

Para cuantificar la carga viral y la expresión de los genes neuronales, *AmNrx-1* y *AmNlg-1* y los genes OBPs, se utilizaron cebadores específicos (Tabla 1). La reacción de qPCR se llevó a cabo utilizando 1x de KAPA SYBR FAST Universal 2x qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras se llevaron a un volumen de reacción de 15 µL, incluidos 20 ng de ADNc, 530 nM de cada cebador y agua de grado molecular filtrada estéril para alcanzar los 15 µL. Las condiciones de reacción térmica fueron: 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s

y 72 °C durante 30 s. Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y los datos se analizaron con el software MxPro (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). La expresión relativa de cada gen se calculó después de la normalización con un gen endógeno ( $\beta$ -actina), como describe Pfaffl (2001). De igual forma, para determinar la carga viral en cada segmento de las *A. mellifera* (cuerpo, cabeza y antenas) se realizó la cuantificación absoluta de DWV-A. En resumen, se utilizó una curva estándar que utiliza un producto de PCR purificado (Wizard®VR SV gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI, EE. UU.), perteneciente a la secuencia diana viral (Riveros *et al.*, 2020). Luego, el amplicón purificado se cuantificó mediante espectrofotometría (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, EE. UU.) para calcular el número de copias, según Wu *et al.* (2017). Luego se generaron curvas estándar lineales (95-100% de eficiencia) utilizando una dilución

Tabla 1. Secuencia de partidores utilizados en la cuantificación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR)

| Partidor  | Secuencia                                                  | Referencia                  |
|-----------|------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| AmNrx-1   | F- CTGCTTCGAGCGACGACTAT<br>R- ACGACCGGATGGATGATTGG         | Morfin <i>et al.</i> , 2019 |
| AmNlg-1   | F- ATGTCGAGGATGCTGCGACTGGA<br>R-CTACCTGTGCACTATCTCCTGTTGTA | Biswas <i>et al.</i> , 2008 |
| DWV-A     | F-TATCTTCATTAAAGCCACCTGGAA<br>R-TTTCCTCATTAAGTGTGTCGTTGAT  | Yang y Cox-Foster,<br>2005  |
| AmelOBP5  | F- ATGCGGAAATCGTGCTTGCA<br>R- TGCCATTACTCACGGGAAGA         | Li <i>et al.</i> , 2015     |
| AmelOBP11 | F- TGAGGATGTCTGAAGCTACGGAA<br>R- CACGGAGCAATAAACGCTATGG    | Li <i>et al.</i> , 2015     |
| B-actina  | F- ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG<br>R- GACCCACCAATCCATACGGA       | Yang y Cox-Foster,<br>2005  |

Los datos se expresaron como el número de copias de DWV-A por abeja considerando las diluciones que se realizaron en la síntesis de ADNc y la reacción de qPCR.

en serie ( $1,0 \times 10^1$  a  $1,0 \times 10^9$ ) del número de copias virales de ADNc purificado. Posteriormente, los valores de Ct se representaron frente a los valores del número de copias ( $\log_{10}$ ).

Por lo tanto, el número de copias de la muestra se estimó utilizando los valores de Ct y las comparaciones con la ecuación lineal de la curva estándar y los valores

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Bioensayos olfatométricos

En las *A. mellifera* que fueron sometidas a la prueba de preferencia olfativa al componente de la feromona (alcohol bencílico) *versus* etanol (F vs E) se observa que la respuesta al ensayo fue superior en el día 20 para *A. mellifera* N-DWV y muy similares para el día 5 (Figura 1). Por otra parte, se observa que en el ensayo del componente de la feromona *versus* aceite esencial (F vs AE), para *A. mellifera* N-DWV, la mayor respuesta a la feromona fue el día 10 frente a las *A. mellifera* I-DWV, en cambio el día 5 y 20 las respuestas fueron muy similares (Figura 2).

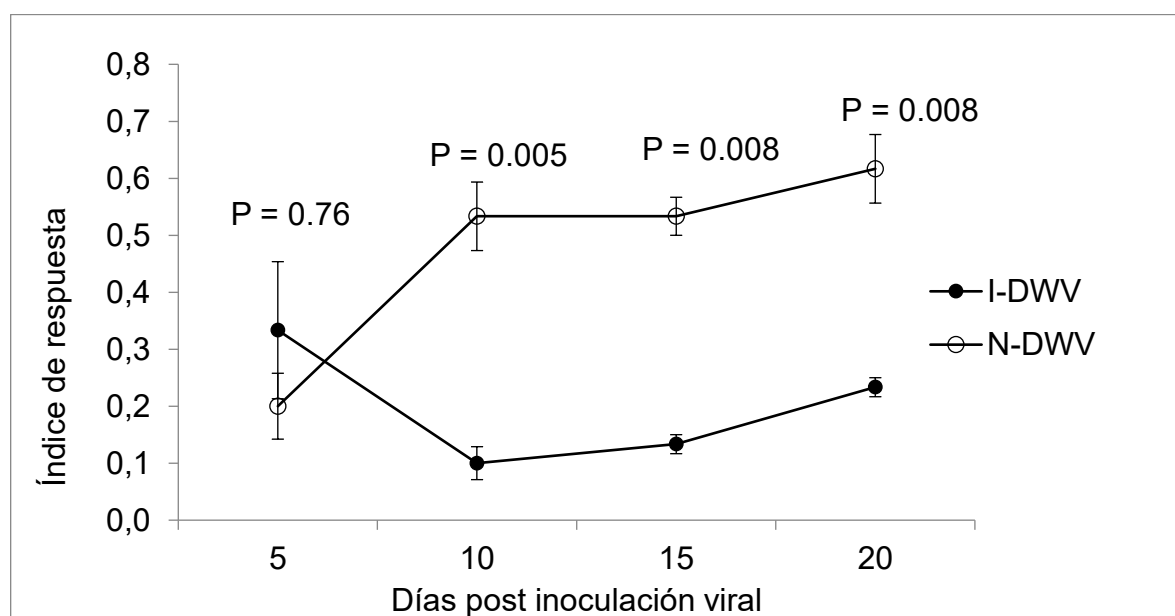
Por otra parte, para ambos ensayos (Figura 1 y 2), en *A. mellifera* inoculadas con la suspensión viral se observaron valores menores a 0,5 en el índice de respuesta, indicando que las *A. mellifera* no prefieren ningún estímulo.

En tanto, para *A. mellifera* no inoculadas con la suspensión viral se observó un índice de respuesta superior a 0,5, indicando que los compuestos evaluados (Alcohol bencílico y aceite esencial de *M. piperita*) eran atractivos para el insecto. No obstante, para el aceite esencial solo se observaron valores de índice superiores a 0,5 a los 10 y 15 DPI viral (Figura 2). Silva *et al.* (2021), lograron relacionar altos niveles de carga del virus DWV-A y su efecto en el funcionamiento antenal de *A. mellifera*, donde se encontró una disminución significativa de la respuesta electrofisiológica de la antena luego de 8 dpi viral, frente a un estímulo de aceite esencial de *M. piperita*. Por otra parte, Shah *et al.* (2009) encontraron que el virus altera la estructura celular en regiones críticas del cerebro, incluidos los neuropilos responsables de la visión y el olfato, lo cual también estaría comprometiendo funciones fisiológicas. Además, se sabe que el DWV-A altera la expresión de distintos genes, así como es capaz de replicarse en distintas secciones de los

lóbulos de percepción sensorial, a la vez que afecta el metabolismo energético del cerebro incidiendo en su memoria a largo plazo (Chen et al., 2021). Por lo tanto, hay evidencia robusta que sostiene que el virus es capaz de afectar las capacidades y el funcionamiento fisiológico de órganos sensoriales de la abeja, lo que podría ser la explicación del porqué se observa esta alteración en las respuestas conductuales del presente estudio (Figura 1 y 2).

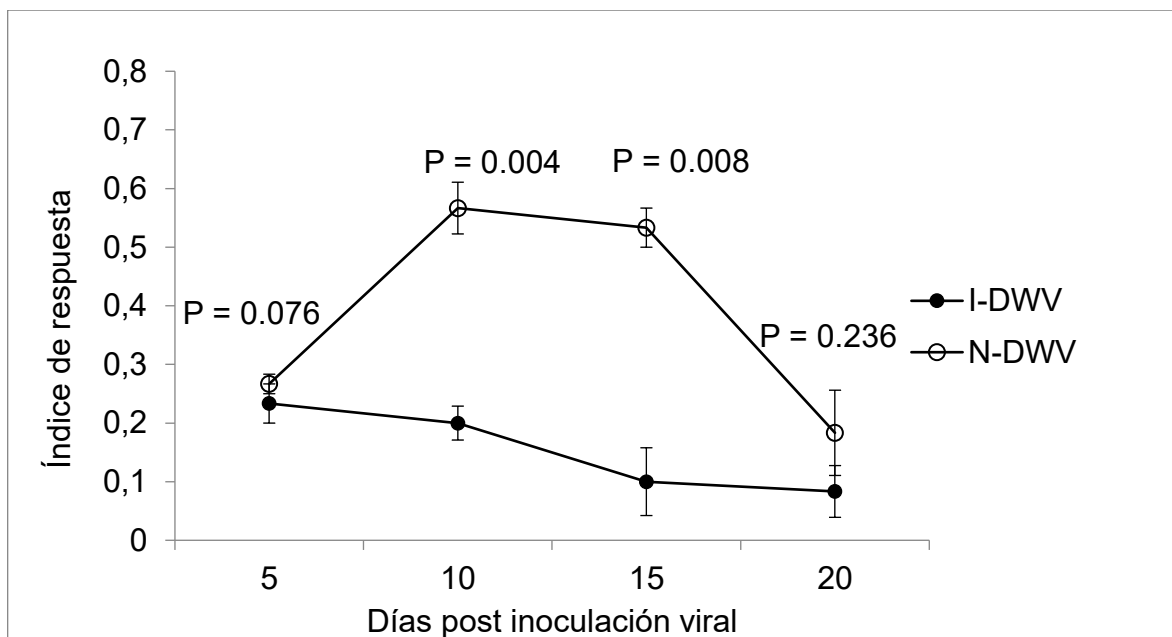
Por otra parte, se puede observar que *A. mellifera* N-DWV muestran conductas correctamente relacionadas al polietismo temporal, donde *A. mellifera* con bajas cargas virales (N-DWV) perciben mayoritariamente el componente de la feromona entre los días 10 y 15, relacionado a la conducta nodriza (Figura 2). A partir del día 15 las *A. mellifera* comenzarían sus labores de recolectoras, por lo tanto, las *A. mellifera* dejan de trabajar dentro de la colmena para dedicarse a la recolección de néctar y polen, percibiendo mayoritariamente aromas florales. Finalmente, en el día 20 dejan de preferir al componente de la feromona, por lo que los resultados de las *A. mellifera* N-DWV demuestran conductas correctamente relacionadas al

Figura 1. Índice de preferencia olfativa para *A. mellifera* no inoculadas (N-DWV) e inoculadas (I-DWV) con la variante A del virus de las alas deformadas al alcohol bencílico *versus* etanol en ensayo de tubo Y



$P < 0,05$ , según la prueba de Chi-cuadrado, junto al eje X indican diferencias significativas entre *A. mellifera* no inoculadas e inoculadas para cada edad. IC 95%: Intervalo de confianza 95%.

Figura 2. Índice de preferencia olfativa para *A. mellifera* no inoculadas (N-DWV) e inoculadas (I-DWV) con la variante A del virus de las alas deformadas al alcohol bencílico *versus* aceite esencial de *M. piperita* en ensayo de tubo Y



$P < 0,05$ , según la prueba de Chi-cuadrado, junto al eje X indican diferencias significativas entre *A. mellifera* no inoculadas e inoculadas para cada edad. IC 95%: Intervalo de confianza 95%.

desarrollo fisiológico de las *A. mellifera*.

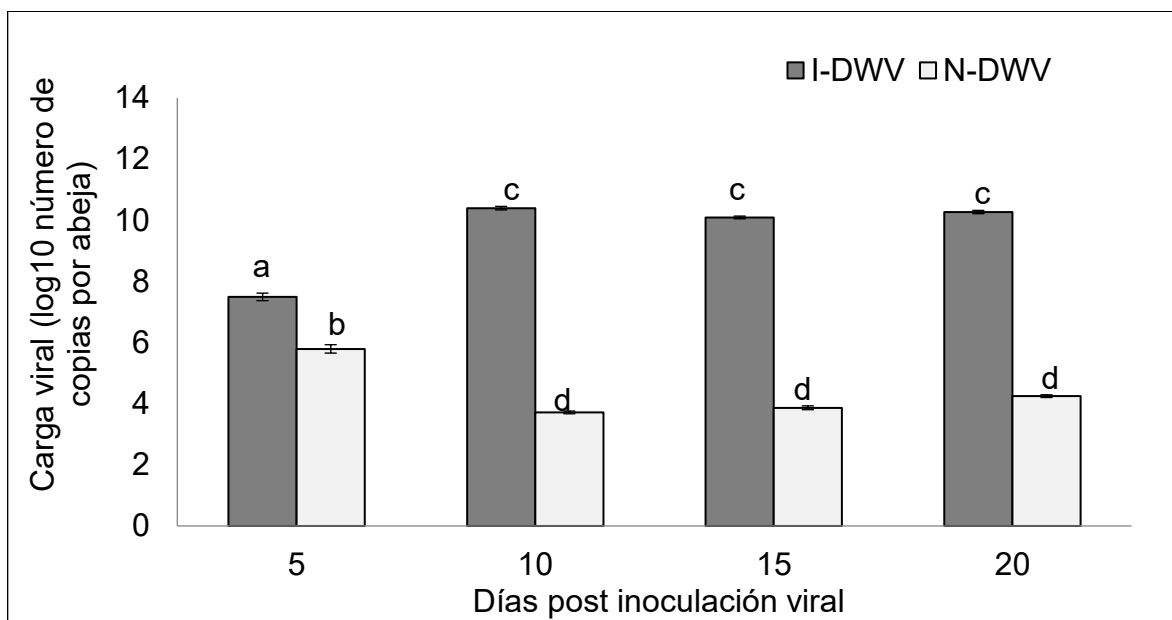
En resumen, el ensayo olfatométrico permitió comparar la respuesta sensorial de las *A. mellifera* I-DWV y N-DWV y muestra con precisión cómo potencialmente el virus afecta la respuesta conductual en ensayos de olfatometría y como podría afectar a nivel de campo.

### Análisis de la carga viral y la expresión de genes

**Carga viral del DWV-A.** Respecto al análisis de la carga viral en las distintas secciones del cuerpo de la abeja, se observó que todas aquellas *A. mellifera* I-DWV presentan un aumento en las cargas virales desde el día de inoculación hasta el día final del ensayo. Si bien la carga viral detectada en las *A. mellifera* varió significativamente entre las *A. mellifera* I-DWV y N-DWV para la cabeza, también fueron influenciados por la edad de las *A. mellifera* (Wilks  $\lambda = 0,09$  ;  $F = 157,76$ ;  $df = 6/414$ ;  $P < 0,001$  ) (Figura 3 y 4).

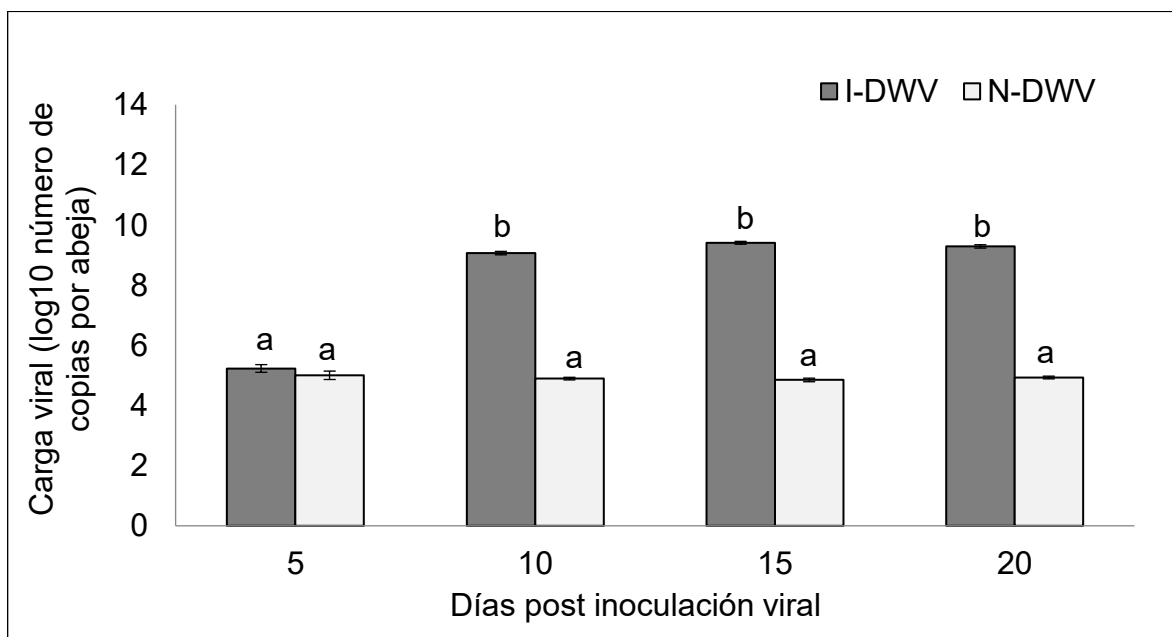
Para el análisis de las cargas virales en la cabeza de las *A. mellifera* (Figura 3), estas fueron significativamente más altas ( $P < 0,05$ ) en las *A. mellifera* I-DWV,

Figura 3. Carga viral de DWV-A en cabeza de *A. mellifera* a diferentes edades en que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV)



Letras diferentes indica diferencias significativas de acuerdo con pruebas de Bonferroni ( $P < 0.05$ ) ( $n=216$ ).

Figura 4. Carga viral de DWV-A en antena de *A. mellifera* a diferentes edades en que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV)



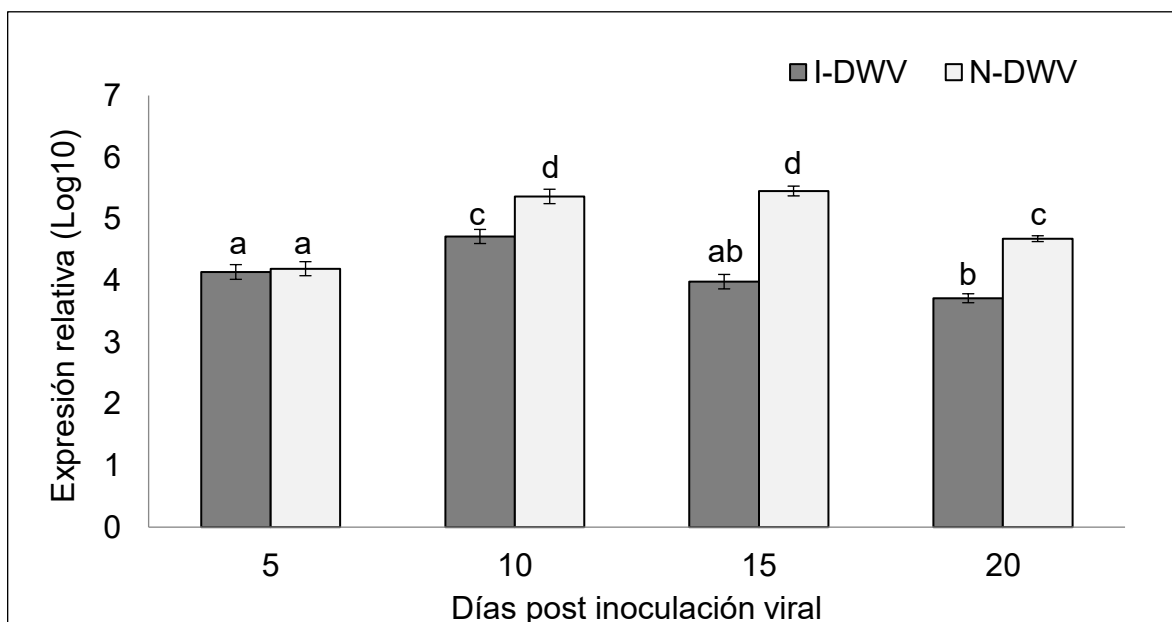
Letras diferentes indica diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con pruebas de Bonferroni ( $P < 0.05$ ) ( $n=216$ ).

observándose un aumento de un 73% mayor del número de copias virales por abeja, en edades entre 10 y 20 días de edad, en comparación con las *A. mellifera* N-DWV, donde se observó una carga viral basal al inicio del ensayo de  $1,0 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^5$  número de copias virales por abeja hasta el fin del experimento, sin reportar cambios en la carga viral (Figura 3). Así también, las cargas virales en antenas (Figura 4) de *A. mellifera* variaron entre los tratamientos, donde se detectaron cargas virales para antenas I-DWV de  $1,0 \times 10^5$  en el día 5 a  $1,0 \times 10^9$  número de copias por abeja en los días 10, 15 y 20 dpi, representando un aumento de un 65% en comparación con *A. mellifera* N-DWV, que mostraron cargas virales de  $1,0 \times 10^5$  número de copias por abeja a lo largo de todo experimento.

**Expresión de genes OBP.** En el análisis de la expresión de los genes que codifican para las OBP en las antenas de las *A. mellifera*, se observó que para el gen AmelOBP5, a los días 10, 15 y 20 se redujo la expresión génica en todas aquellas *A. mellifera* I-DWV con el virus comparado con las *A. mellifera* N-DWV (Figura 5). Por otra parte, para los genes que codifican la OBP 11 se observó una disminución de la expresión relativa del gen para los días 10, 15 y 20, observándose la mayor diferencia para los días 15 y 20 de un 41% y 39% respectivamente, respecto a las *A. mellifera* N-DWV (Figura 6).

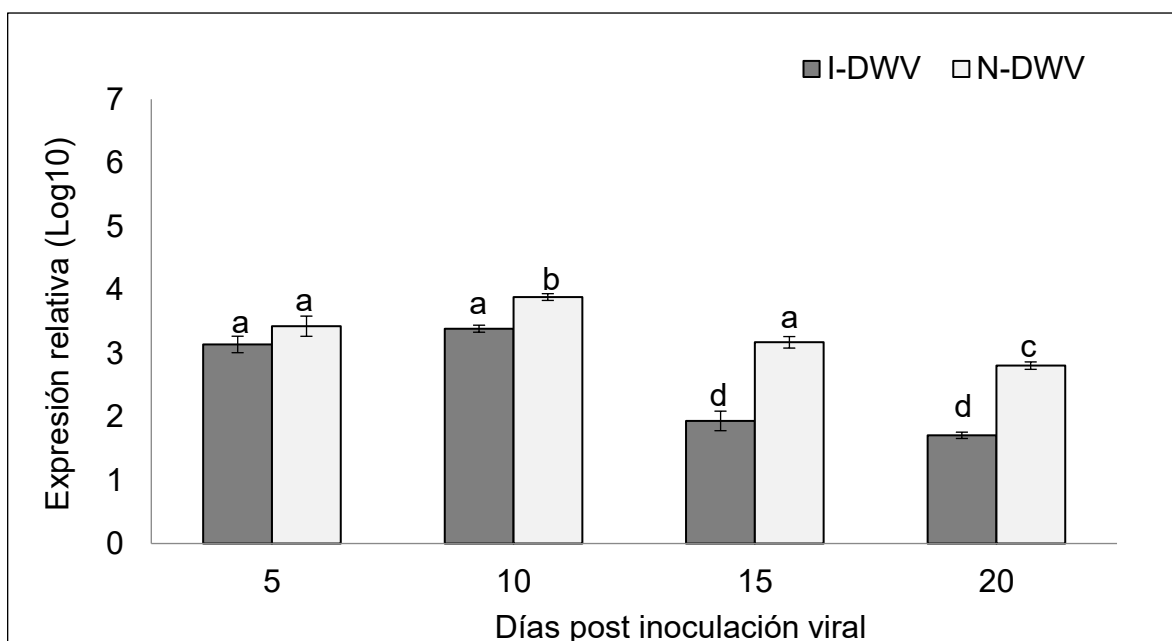
Las OBP se han descrito como algunas de las moléculas más importantes para el reconocimiento de aromas, actuando como el primer puente entre el ambiente y los insectos (Nakamura *et al.*, 2016). A su vez, la respuesta conductual de las *A. mellifera* es influenciada por la capacidad de percibir aromas, lo cual estaría vinculado a los niveles de expresión de los genes que codifican las OBP. El odorante, unido a una OBP es reconocido por un receptor de membrana neuronal que transduce una señal química en eléctrica, la cual se interpreta en el cerebro de las *A. mellifera*. Por otra parte, la disminución o el silenciamiento de las proteínas OBP afectan la respuesta al compuesto asociado a esta OBP, tal como observaron Zhou *et al.* (2004) donde se determinó que mutantes de *Drosophila melanogaster* M. con deficiencia en la expresión del gen de la OBP LUSH, generó cambios en su comportamiento, provocando una atracción hacia el etanol, difiriendo de las especies silvestres. Por otra parte, las OBPs son clave en la comunicación de los

Figura 5. Expresión de genes codificantes para OBP5 en antenas de adultos de *A. mellifera* a diferentes edades y que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) con el virus DWV-A.



Letras diferentes indica diferencias significativas de acuerdo con pruebas de Bonferroni ( $P < 0.05$ ) en expresión relativa de genes de AmelOBP5 (OBP5)

Figura 6. Expresión de genes codificantes para OBP 11 en antenas de adultos de *A. mellifera* a diferentes edades y que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) con el virus DWV-A.



Letras diferentes indica diferencias significativas de acuerdo con pruebas de Bonferroni ( $P < 0.05$ ) en expresión relativa de genes de AmelOBP11 (OBP 11)

insectos. En efecto, se han encontrado en altos niveles en las sensilas de las antenas de *Bombyx mori* L., y se ha demostrado que BmorPBP2, BmorGOBP2 y BmorABPx, 3 proteínas OBP, se unen al componente de feromonas sexuales (Zhou *et al.*, 2009). En *Culex quinquefasciatus* S., la OBP CquiOBP1 se logra unir a feromonas de oviposición formando un ligando con esta proteína (Faro de Brito *et al.*, 2016).

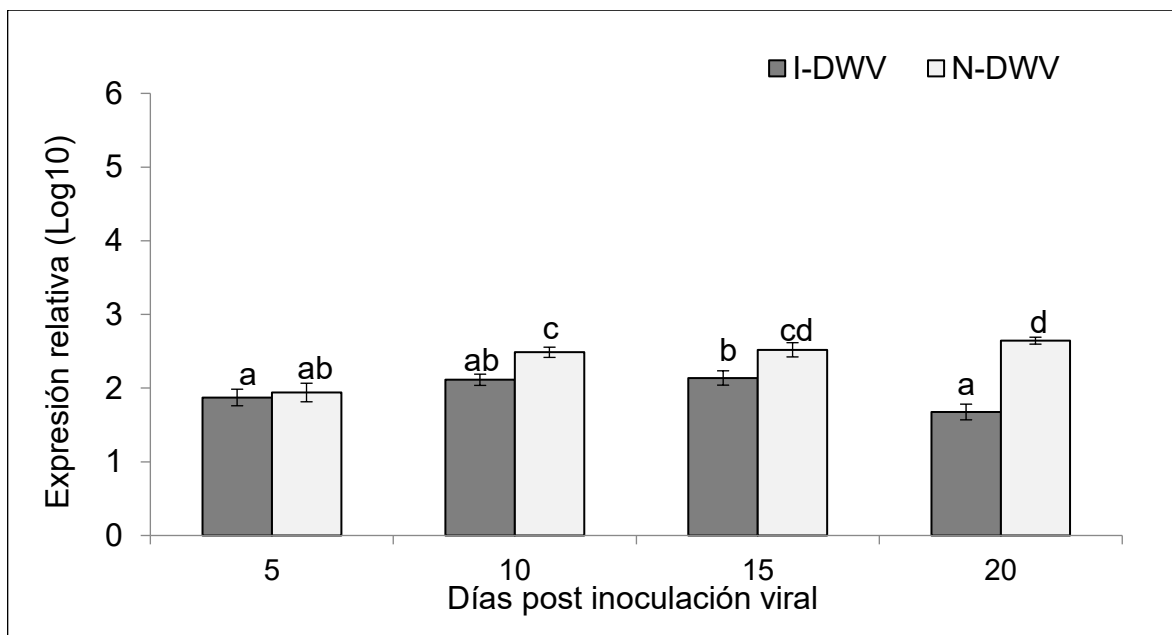
Silva *et al.* (2021) demostraron que DWV-A condujo a una disminución de la expresión de los genes OBP 5 y 11, lo cual se relaciona directamente con la disminución de los genes que codifican las OBPs evaluadas en este estudio.

Por tanto, las disminuciones de la preferencia olfativa hacia el alcohol bencílico observadas en este estudio pueden estar siendo generadas por la disminución de la expresión de los genes que codifican las proteínas OBP5 y OBP11. Esta disminución comprometería el normal funcionamiento de las colmenas dado que las OBPs son claves para coordinar la conducta de las nodrizas. El que las nodrizas no prefieran el alcohol bencílico, indicaría un cambio en su conducta normal e implicaría que dejan de atender de forma correcta a las larvas. Así, este estudio señala cómo la conducta de *A. mellifera* se vería comprometido antes del día 20.

**Expresión de genes neuronales, AmNrx-1 y AmNlg-1.** Al analizar los genes neuronales en cabeza de *A. mellifera* se logró identificar que *A. mellifera* inoculadas con el patógeno presentaron una disminución de la expresión génica para el gen post-sináptico AmNrx-1, donde se observó una disminución para los días 10, 15 y 20 de 16%, 16% y 35% respectivamente, en comparación con las *A. mellifera* no inoculadas (Figura 7), observándose la mayor diferencia de la expresión relativa el día 20.

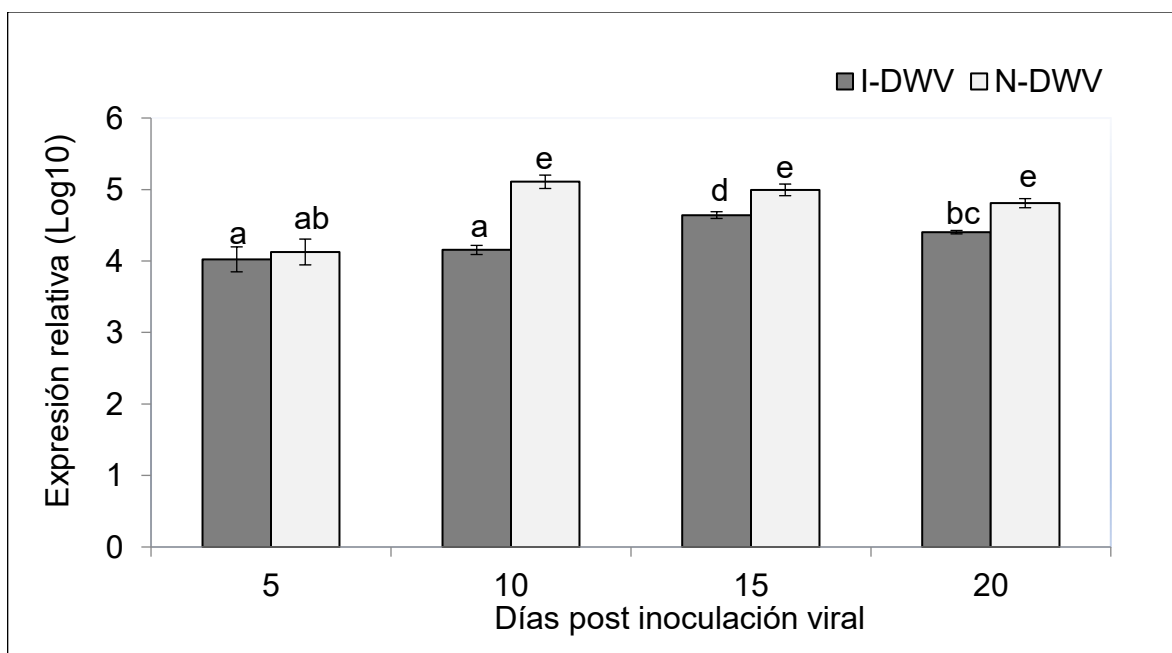
Así mismo, para el gen pre-sináptico AmNlg-1 (Figura 8) se observó que para los días 10, 15 y 20 aquellas *A. mellifera* que fueron inoculadas con el virus presentaron una disminución en la expresión génica del 18%, 8% y 9%, respectivamente (Figura 8). Las proteínas AmNrx-1 y AmNlg-1 se encargan de la sinapsis neuronal de las *A. mellifera* y de procesos claves como el aprendizaje y la memoria, demostrado en ensayos de respuesta de extensión de la probóscide (PER) (Iqbal y Mueller 2007).

Figura 7. Expresión relativa de genes codificantes de Neurexina (AmNrx-1) para proteínas neuronales en cabezas de adultos de *A. mellifera* inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) con el virus DWV-A a diferentes edades.



Letras diferentes indica diferencias significativas de acuerdo con pruebas de Bonferroni ( $P < 0.05$ )

Figura 8. Expresión relativa de genes codificantes de Neuroligina (AmNlg-1) para proteínas neuronales en cabezas de adultos de *A. mellifera* inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N DWV) con el virus DWV-A a diferentes edades.



Letras diferentes indica diferencias significativas de acuerdo con pruebas de Bonferroni ( $P < 0.05$ )

Estas proteínas se pueden asociar a la respuesta conductual ya que participan en el traspaso de información una vez que esta llega como estímulo al cerebro (Faro de Brito *et al.*, 2016). Además, la disminución en la expresión de estos genes podría comprometer la salud de la colmena. Andino y Hunt (2011) informaron que los ácaros dañados (presuntamente masticados por las *A. mellifera* obreras) es un buen indicador del comportamiento de acicalamiento. Por otra parte, Morfin *et al.* (2019) demostraron que la proporción de ácaros dañados está ligado a la expresión de AmNrx-1 en *A. mellifera*, por lo que una regulación a la baja de este gen, como lo observado en esta investigación, provocaría disminuciones en conductas de acicalamiento, empobreciendo la sanidad y comprometiendo la salud de la colmena.

Además, Morfin *et al.* (2020) encontraron regulaciones a la baja de AmNrx-1 y AmNlg-1 como efecto del patógeno *V. destructor* en las colmenas y concluyeron que la disminución de estos genes podría explicar posibles alteraciones en el comportamiento de las *A. mellifera*. Adicionalmente, en el presente estudio hemos demostrado que en ausencia del ácaro, la expresión de estos genes y la conducta de las *A. mellifera* también pueden verse alterados, solo por la presencia del virus.

Si un patógeno como el DWV-A disminuye la expresión de los genes que codifican para proteínas OBP, que son claves para la percepción olfativa, y proteínas pre y post sinápticas, que son relevantes para el procesamiento de la información, entonces la capacidad de coordinar conductas del insecto se verán alteradas por los aumentos de las cargas virales de DWV-A en los distintos órganos del insecto, en particular, en las antenas y cabeza como demuestra este estudio.

Se sugieren nuevos estudios para relacionar la conducta de las *A. mellifera* con la expresión de estos genes.

## CONCLUSIONES

1. La variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A) altera la respuesta conductual de nodrizas de *A. mellifera* al componente alcohol bencílico, de la feromona de alarma de las larvas.

2. La variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A) provoca una regulación a la baja de la expresión de los genes codificantes de las proteínas de unión a odorantes OBP 5 y OBP 11, en antenas de *A. mellifera*
3. La variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A) provoca una regulación a la baja de la expresión de los genes codificantes para la proteína presináptica neurexina y postsináptica neuroligina, en cabezas de *A. mellifera*

## REFERENCIAS

- Aguilar, R., L. Ashworth., L. Galetto and M.A. Aizen. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecolgy Letters*, 9(8):968-80. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2006.00927.x
- Andino, G. K., and G. J. Hunt., 2011. A scientific note on a new assay to measure honeybeemite-grooming behavior. *Apidologie*, 42 (4), 481-484. DOI: 10.1007/s13592-011-0004-1
- Biswas, S., R.J. Russell., C.J. Jackson., M. Vidovic., O. Ganeshina., J.G. Oakeshott and C. Claudianos. 2008. Bridging the synaptic Gap: neuroligins and neurexin I in *Apis mellifera*. *PLOS one*, 3(10): e3542. DOI: 10.1371/journal.pone.0003542
- Bonilla, M.A. 2016. Capítulo II: El servicio ecosistémico de polinización prestado por las abejas. pp41-58. En: Nates-Parra Guiomar. (Ed.). Iniciativa Colombiana de polinizadores (ICPA). Universidad nacional de Colombia, Instituto Humboldt. Bogotá, Colombia.
- Briand, L., C. Nespoulous., J.C. Huet., M. Takahashi and J.C. Pernellet. 2001. Ligand binding and physico-chemical properties of ASP2, a recombinant odorant-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry*, 268(3):752-60. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.01927.x
- Brito, N. F., M.F. Moreira. and A. C. A. Melo. 2016. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception, *Journal of Insect Physiology*, 95: 51-65 DOI: 10.1016/j.jinsphys.2016.09.008
- Chautá-Mellizo, A., S.A. Campbel., M.A. Bonilla., J.S. Thaler and K. Poveda. 2012. Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. *Basic and Applied Ecology*, 13(6):524-532. DOI: 10.1016/j.baae.2012.08.013

- Chen, P., Y.-H. Lu, Y.-H. Lin, C.-P. Wu, C.-K. Tang, S.-C. Wei and Y.-L. Wu. 2021. Deformed wing virus infection affects the neurological function of *Apis mellifera* by altering extracellular adenosine signaling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 103674. DOI: 10.1016/j.ibmb.2021.103674
- Forêt, S. and R. Maleszka. 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research*, 16(11): 1404–1413. DOI: 10.1101/gr.5075706
- Fründ, J., C.F. Dormann, A. Holzschuh and T. Tscharntke. 2013. Bee diversity effects on pollination depend on functional complementarity and niche shifts. *Ecology*, 94 (9): 2042-2054. DOI: 10.1890/12-1620.1
- Garibaldi, L. A., I. Steffan-Dewenter., R. Winfree., M.A Aizen., R. Bommarco., S.A Cunningham., C. Kremen, L.G. Carvalheiro, L.D. Harder, O. Afik, I. Bartomeus, F. Benjamin, V. Boreux, D. Cariveau, N. P. Chacoff, J. H. Dudenhöffer, B. M. Freitas, J. Ghazoul, S. Greenleaf, J. Hipólito, A. Holzschuh. B. Howlett, R. Isaacs, S. K. Javorek, C. M. Kennedy, K. M. Krewenka, S. Krishnan, Y. Mandelik, M. M. Mayfield, I. Motzke, T. Munyuli, B. A. Nault, M. Otieno, J. Petersen, G. Pisanty, S. G. Potts, R. Rader, T. H. Ricketts, M. Rundlöf, C. L. Seymour, C. Schüepp, H. Szentgyörgyi, H. Taki, T. Tscharntke, C. H. Vergara, B. F. Viana, T. C. Wanger, C. Westphal, N. Williams and A. M Klein. 2013. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, 339(6127):1608–1611. DOI: 10.1126/science.123020
- Groot, A. T., T. Dekker and D. Heckel. 2016. The Genetic basis of pheromone evolution in moths. *Annual Review of Entomology*, 61(1): 99–117. DOI: 10.1146/annurev-ento-010715-023638
- Grozing, C. M. and M.L Flenniken. 2019. Bee viruses: ecology, pathogenicity, and impacts. *Annual Review of Entomology*, 64(1): 205–226. DOI: 10.1146/annurev-ento-011118-111942
- Hoehn, P., T. Tscharntke., J.M. Tylianakis and I. Steffan-Dewenter. 2008. *Functional group diversity of bee pollinators increases crop yield*. Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences, 275(1648): 2283-2291. DOI: 10.1098/rspb.2008.0405
- Iqbal, J. and U. Mueller. 2007. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. Proceedings: *Biological Sciences*, 274(1617):1517–1521. DOI: 10.1098/rspb.2007.0022
- Kevill, J. L., F. S. de Souza., C. Sharples., R. Oliver., D. C. Schroeder and S. J. Martin. 2019. DWV-A lethal to honey bees (*Apis mellifera*): a colony level

- survey of DWV variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 states across the US. *Viruses*, 11(5): 426–426. DOI: 10.3390/v11050426
- Kim, S. H., A. Mercer., A. Mitchell., J.R. de Miranda., V. Ward., F. Mondet and M. Bostina. 2019. Viral infections alter antennal epithelium ultrastructure in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 168, 107252. DOI: 10.1016/j.jip.2019.107252
- Klatt, B. K., A. Holzschuh, C. Westphal, Y. Clough, I. Smit, E. Pawelzik and T. Tscharntke. 2013. *Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 281(1775): 20132440–20132440. DOI: 10.1098/rspb.2013.2440
- Lanzi, G., J. R. de Miranda, M.B. Boniotti, C. E. Cameron, A. Lavazza, L. Capucci, S. M. Camazine and C. Rossi. 2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*, 80(10): 4998–5009. DOI: 10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006
- Leal, W. S. 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58(1):373–391. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153635
- Li, Q and S. D. Liberles. 2015 Aversion and attraction through olfaction. *Current Biology*, 25(3):120-129. DOI: 10.1016/j.cub.2014.11.044
- Liu, J., M. Chen., W. Ma., L. Zheng., B. Zhang., H. Zhao and Y. Jiang., 2023 Composition of strawberry flower volatiles and their effects on behavior of strawberry pollinators, *Bombus terrestris* and *Apis mellifera*. *Agronomy*, 13, 339. DOI: 10.1007/s10886-020-01221-2
- Mallinger, R. E. & Gratton, C. 2014. Species richness of wild bees, but not the use of managed honeybees, increases fruit set of a pollinator-dependent crop. *Journal of Applied Ecology*, 52(2), 323–330. DOI: 10.1111/1365-2664.12377
- Martin, S. J. and L.E. Brettell. 2019. Deformed wing virus in honeybees and other insects. *Annual Review of Virology*, 6(1), 49–69. DOI: 10.1146/annurev-virology-092818-015700 DOI: 10.1146/annurev-virology-092818-015700
- McMahon, D. P., M.E. Natsopoulou., V. Doublet., M. Furst., S. Weging., M.J Brown., A. Gogol-Doring., R.J. Paxton., R.E. Mallinger and C. Gratton. 2016. Species richness of wild bees, but not the use of managed honeybees, increases fruit set of a pollinator-dependent crop. *Journal of Applied Ecology*, 52 (2): 323-330. DOI:10.1111/1365-2664.12377
- Morfin, N., P. H. Goodwin and E.Guzman-Novoa. 2020. The combined effects

- of *Varroa destructor* parasitism and exposure to neonicotinoids affects honey bee (*Apis mellifera* L.) memory and gene expression. *Biology*, 9(9):237. DOI: 10.3390/biology9090237
- Morfin, N., , K. Given., M. Evans., E., Guzman Novoa and G.J. Hunt. 2019. Grooming behavior and gene expression of the Indiana “mite-biter” honey bee stock. *Apidologie*, 51, 267–275 2020. DOI:10.1007/s13592-019-00710-y
- Mondet, F., C. Alaux., D. Severac., M. Rohmer., A. Mercer and Y. Le Conte. 2015. Antennae hold a key to Varroa-sensitive hygiene behaviour in honey bees. *Scientific Reports*, (5): 10454. DOI: 10.1038/srep10454
- Nakamura, A., S. Chahad-Ehlers, A. Lima, C. Hayumi Taniguti, I. Sobrinho, F.R. Torres and R.A. de Brito. 2016. Reference genes for accessing differential expression among developmental stages and analysis of differential expression of OBP genes in *Anastrepha obliqua*. *Scientific Reports*, 6, 17480. DOI: 10.1038/srep17480
- Nie, H., S., Xu., C. Xie., H. Geng., Y. Zhao., J. Li., W.F Huang., Y. Lin., Z. Li and S.Su. 2018. Comparative transcriptome analysis of *Apis mellifera* antennae of workers performing different tasks. *Molecular Genetics and Genomics*, 293: 237–248. DOI: 10.1007/s00438-017-1382-5
- Pelletier, J., A. Guidolin., Z. Syed., A.J. Cornel and W.S. Leal. 2010. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. *Journal of Chemical Ecology*, 2010, 36, 245–248. DOI: 10.1007/s10886-010-9762-x
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2003–2007. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
- Plettner, E., N. Eliash., N.K. Singh, R. Govardhana and V. Soroker. 2017. The chemical ecology of host-parasite interaction as a target of *Varroa destructor* control agents. *Apidologie*, 48(1), 78–92 DOI:10.1007/s13592-016-0452-8
- Potts, S.G., V. Imperatriz-Fonseca., H.T. Ngo., M.A. Aizen., J.C. Biesmeijer., T.D. Breeze., L.V. Dicks., L.A. Garibaldi., R. Hill., J. Settele and A.J. Vanbergen. 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540, 220–229. DOI:10.1038/nature20588
- Rader, R., W. Edwards, D.A. Westcott., S.A. Cunningham and B.G Howlett. 2013. Diurnal effectiveness of pollination by bees and flies in agricultural *Brassica rapa*: Implications forecosystem resilience. *Basic and Applied Ecology*, 14: 20-27. DOI:10.1016/j.baae.2012.10.011

- Riveros, G., N. Arismendi, N. Zapata, D. Evans, I. Pérez, P. Aldea and M. Vargas. 2020. Occurrence, prevalence and viral load of deformed wing virus variants in *Apis mellifera* colonies in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 59, 63–68. DOI: 10.1080/00218839.2019.1670993
- Shah, K. S., Evans, E. C. and Pizzorno, M. C. 2009. Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Virology Journal*, 6(1), 182. DOI: 10.1186/1743-422X-6-182
- Silva, D., R. Ceballos., N. Arismendi., A. Dalmon and M. Vargas. 2021. Variant A of the deformed wings virus alters the olfactory sensitivity and the expression of odorant binding proteins on antennae of *Apis mellifera*. *Insects*, 12, 895. DOI: 10.3390/insects12100895
- Vargas, M., N. Arismendi., G. Riveros., N. Zapata, A. Bruna., M. Vidal., M. Rodríguez and M. Gerding. 2017. Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77, 243–249. DOI: 10.4067/s0718-58392017000300243
- Vergara, C.H. and E.I. Badano., 2009. Pollinator diversity increases fruit production in Mexican coffee plantations: The importance of rustic management systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 129:117-123.
- Vilhena, A.M., L. Rabelo., E.M. Bastos and S.C. Augusto. 2012. Acerola pollinators in the savanna of Central Brazil: temporal variations in oil-collecting bee richness and a mutualistic network. *Apidologie*, 43: 51-62. DOI:10.1007/s13592-011-0081-1
- Wu, Y., X. Dong and T. Kadowaki. 2017. Characterization of the copy number and variants of deformed wing virus (DWV) in the pairs of honey bee pupa and infesting *Varroa destructor* or *Tropilaelaps mercedesae*. *Frontiers of Microbiology*, 8, 1558. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01558
- Yang, X. and D. Cox-Foster. 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 Science of the United States of America, 102, 7470–7475. DOI: 10.1073/pnas.0501860102
- Zhao, H., Y. Luo., J. Lee., X. Zhang., Q. Liang and X. Zeng. 2013. The odorant-binding protein gene OBP11 shows different spatiotemporal roles in the olfactory system of *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana*. *Sociobiology*, 60, 429–435. DOI: 10.13102/sociobiology.v60i4.429-435
- Zhou, J.-J., G., Robertson., X. He., S. Dufour., A.M. Hooper., J.A. Pickett., N. H. Keep and L.M. Field., 2009. Characterisation of *Bombus mori* odorant-binding

Proteins Reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *Journal of Molecular Biology*, 389(3), 529–545. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.04.015

Zhou, J.-J., G.A. Zhang., W. Huang., M.A. Birkett., L.M. Field., J.A. Pickett and P. Pelosi. 2004. Revisiting the odorant-binding protein LUSH of *Drosophila melanogaster*: evidence for odour recognition and discrimination. *FEBS Letters*, 558(1-3), 23–26. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01521-7