

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**EFFECTO DE BACTERIAS LÁCTICAS PARA MEJORAR EL SISTEMA
INMUNOLÓGICO EN ABEJAS (*APIS MELLIFERA*) Y REDUCIR LA CARGA
DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV)**

POR

DANIEL ANTONIO SALAMANCA LOYOLA

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

**CONCEPCIÓN - CHILE
2024**

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**EFFECTO DE BACTERIAS LÁCTICAS PARA MEJORAR EL SISTEMA
INMUNOLÓGICO EN ABEJAS (*APIS MELLIFERA*) Y REDUCIR LA CARGA
DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV)**

POR

DANIEL ANTONIO SALAMANCA LOYOLA

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

**CONCEPCIÓN - CHILE
2024**

Aprobada por:

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

Guía

Profesor Asociado, Diego Silva V.
Ing. En Biotecnología Vegetal, Mg, Cs. Agr.

Asesor

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

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.
Ing, Asociado, Mg. Cs.

Decano

RECONOCIMIENTOS

Estudio financiado por el proyecto FIA PYT 2017-0241.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Resumen	1
Summary	1
Introducción	2
Materiales y métodos	5
Resultados y discusión	11
Conclusión	21
Bibliografía	21

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV) luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación viral en abejas tratadas con diferentes concentraciones del Consorcio probiótico.....	12
Figura 2 Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV) luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación viral en abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas conformadoras del probiótico bacteriano.....	14
Figura 3 Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV) luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación viral en abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas y consorcios del probiótico bacteriano	15
Figura 4 Expresión del gen Abaecina luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación con el virus de las alas deformadas (DWV) en abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas y consorcios del probiótico bacteriano.....	17
Figura 5 Expresión del gen Defensina luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación con el virus de las alas deformadas (DWV) en abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas y consorcios del probiótico bacteriano.....	18
Figura 6 Probabilidad de sobrevivencia de abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas y Consorcio probiótico e inoculadas con DWV en condiciones controladas.....	20
Tabla 1 Cepas conformadoras del Consorcio probiótico.....	6

Tabla 2	Secuencia de nucleótidos de cebadores de genes de defensa de <i>Apis mellifera</i> y virus de las alas deformadas (DWV-A) utilizados en qRT-PCR.....	8
---------	--	---

EFFECTO DE BACTERIAS LÁCTICAS PARA MEJORAR EL SISTEMA INMUNOLÓGICO EN ABEJAS (*APIS MELLIFERA*) Y REDUCIR LA CARGA DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV)

EFFECT OF DAIRY BACTERIA TO IMPROVE THE IMMUNE SYSTEM IN BEES (*APIS MELLIFERA*) AND REDUCE THE LOAD OF THE DEFORMED WING VIRUS (DWV)

Palabras índice adicionales: abejas melíferas, DWV-A, consorcio bacteriano.

RESUMEN

Apis mellifera L. se caracteriza por la producción de miel y su uso en la polinización de diversas plantas. Actualmente, se ven afectadas por factores bióticos y abióticos, lo cual puede provocar altas tasas de mortalidad, que en parte son atribuibles a patógenos propios de la especie, como el virus de las alas deformadas (DWV). En la actualidad, solo existen alternativas que se enfocan en el control del vector, el ácaro *Varroa destructor*. Así surge la opción del estudio de la microbiota intestinal de *A. mellifera*, evaluando el efecto de un consorcio probiótico, formado por 6 bacterias, reproducidas y ajustadas en condiciones controladas, y suministradas por ingesta *ad libitum* en *A. mellifera*, para evaluar actividad antiviral frente a DWV-A, efecto en el sistema inmune y sobrevivencia. Se aplicaron concentraciones de 60.000, 6.000 y 600 UFC abeja⁻¹, donde la concentración más elevada, logró reducir significativamente la carga del DWV-A en abejas inoculadas con el virus. Asimismo, se determinó la actividad antiviral de las cepas 5,5 y 20,4. Se observó un aumento de la respuesta inmune, relacionada con la sobreexpresión de los genes codificantes para los péptidos antimicrobianos abaecina y defensina, lo cual fue concordante con el aumento de la sobrevivencia de *A. mellifera*. Estos resultados dejan en evidencia el uso potencial de probióticos en *A. mellifera*.

SUMMARY

Apis mellifera L. is characterized by the production of honey and its use in the pollination of various plants. Currently, they are affected by biotic and abiotic factors,

which can cause high mortality rates, which are in part attributable to pathogens specific to the species, such as deformed wing virus (DWV). Currently, there are only alternatives that focus on the control of the vector, the *Varroa destructor* mite. Thus, the option arises of studying the intestinal microbiota of *A. mellifera*, evaluating the effect of a probiotic consortium, formed by 6 bacteria, reproduced and adjusted under controlled conditions, and supplied by *ad libitum* intake in *A. mellifera*, to evaluate antiviral activity. against DWV-A, effect on the immune system and survival. Concentrations of 60,000, 6,000 and 600 CFU bee⁻¹ were applied, where the highest concentration managed to significantly reduce the load of DWV-A in bees inoculated with the virus. Likewise, the antiviral activity of strains 5.5 and 20.4 was determined. In addition, an increase in the immune response was observed, related to the overexpression of the genes encoding the antimicrobial proteins Relish and Dorsal, which was consistent with the increase in the survival of *A. mellifera*. These results demonstrate the potential use of probiotics in *A. mellifera*.

INTRODUCCIÓN

Las colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Himenóptera: Apis) son insectos sociales, caracterizados principalmente por la producción de miel, y en una menor escala, jalea real, propóleo, veneno, polen y cera, potencialmente útiles para el ser humano (Cornara *et al.*, 2017). Asimismo, estos insectos son esenciales para llevar a cabo una polinización controlada, efectuada en la producción de diversos frutales, cultivos, semillas y hortalizas, que conllevan implicaciones sustanciales para la economía global y los ecosistemas naturales (Abbasi *et al.*, 2021; Joseph *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta el papel económico y ambiental que juegan las abejas, estas actualmente se están viendo afectadas por una serie de factores bióticos y abióticos, provocando altas tasas de descenso en la población de las colmenas (Brodschneider *et al.*, 2019; Hristov *et al.*, 2020), atribuibles al trastorno de colapso de colonias (CCD, por sus siglas en inglés), el cual describe la pérdida a gran escala de abejas que se han observado en todo el mundo (Neumann & Carreck, 2015), lo que podría ser explicado por un uso indiscriminado de insecticidas (Cens *et al.*, 2022), pesticidas (O'Neal *et al.*, 2018; Sheldon *et al.*, 2019), o escasez alimentaria

(Requier *et al.*, 2017). Como consecuencia de lo anteriormente mencionado, se genera un aumento en la susceptibilidad a parásitos y enfermedades, como el ácaro exótico ectoparásito *Varroa destructor* (Hernandez *et al.*, 2022), el cual es la amenaza más perjudicial para *A. mellifera*, impactando directamente en su salud y con ello en el rendimiento de la colonia (Traynor *et al.*, 2020). Una infestación de *V. destructor* en otoño, en conjunto con las infecciones secundarias asociadas al ácaro (Genersch *et al.*, 2010), son el factor más importante en pérdidas de colonias, asociándose con más del 85% de los casos de mortalidad durante el invierno en regiones templadas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2010). Además, *V. destructor*, es un vector biológico de virus en las abejas, siendo uno de los más relevantes el virus de las alas deformadas (DWV) (Paxton *et al.*, 2022), existiendo una correlación directa entre el número de ácaros *V. destructor* y la carga viral que posee *A. mellifera* (Flores *et al.*, 2021; Francis *et al.*, 2013).

Actualmente, se han identificado alrededor de 24 virus en las abejas melíferas en todo el mundo (De Miranda *et al.*, 2013), en donde estudios revelan que *A. mellifera* convive en todos los ciclos de vida con DWV, como una infección latente de forma natural, con niveles bajos, sin síntomas aparentes en las abejas (Chen *et al.*, 2005). Asimismo, ante cualquier factor de estrés, puede debilitar las barreras de defensa antiviral de las abejas, y, en consecuencia, el desarrollo y aumento de la carga viral en ellas (Nazzi & Pennacchio, 2018). Un factor de estrés está dado por la dieta de *V. destructor*, puesto que consume la grasa corporal y la hemolinfa, tanto de abejas adultas como inmaduras (Ramsey *et al.*, 2019), proceso de alimentación en el cual se inhibe el sistema inmune de la abeja atacada (Koleoglu *et al.*, 2018), provocando una abundancia del DWV, que aumenta hasta 72 horas después de la herida experimental o la exposición al ácaro *V. destructor* (Kuster *et al.*, 2014). En síntesis, el DWV se magnifica por el parasitismo de *Varroa destructor* (Khongphinitbunjong *et al.*, 2016).

El DWV, pertenece al género Iflavirus, en donde contiene genomas de ARN monocatenario de sentido positivo, con un solo marco de lectura abierto (ORF) grande que codifica las proteínas de la cápside en el extremo 5' y las proteínas no estructurales en el extremo 3', terminando con una cola poli-A de 3' (Chen *et al.*,

2012; Lanzi *et al.*, 2006; Valles *et al.*, 2017), formando una estructura de partículas icosaédricas, sin envoltura, de aproximadamente 30 nm de diámetro (Eberle *et al.*, 2012). La infección del DWV en títulos suficientemente elevados resulta en la propagación por todo el cuerpo, generando síntomas reconocibles como la deformación de las alas, disminución del peso y tamaño corporal, igualmente se aprecia la reducción de la esperanza de vida de las abejas (DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015; Reyes-Quintana *et al.*, 2019). La transmisión del DWV, es tanto horizontal, propagándose por vía oral-fecal, trofalaxia o fuente de alimentos contaminados, como vertical, puesto que el virus, infecta los tejidos ováricos de la reina y se disemina en los huevos en desarrollo antes de la oviposición (Chen *et al.*, 2008; Yañez *et al.*, 2020).

Se han identificado tres variantes bien definidas del virus de las alas deformadas: DWV-A, DWV-B (o VDV-1) y DWV-C (Kevill *et al.*, 2017), de las cuales, la variante DWV-B es la más correlacionada con la pérdida de colonias a nivel mundial, debido a su capacidad más virulenta, en comparación con la variante DWV-A (Natsopoulou *et al.*, 2017). Para la apicultura chilena, la variante DWV-A es la más prevalente y dominante, con un 71%, en comparación a la variante DWV-B, con una prevalencia del 3%, limitando actualmente las recombinaciones entre estas variantes, mientras que la variante DWV-C no ha sido detectada (Riveros *et al.*, 2020).

En la actualidad, se han evaluado diversos tratamientos o medicamentos para tratar la infección por el virus en las abejas melíferas, en donde el manejo se ha enfocado principalmente en el control de *V. destructor* (Jack & Ellis, 2021). Aunque, de igual forma se han estudiado vías alternativas para el control de DWV, como es el caso de la ingesta de una dieta de alta calidad de polen, o el consumo suplementario de fitoquímicos benéficos, que normalmente están presentes en la miel (Dolezal *et al.*, 2019; Palmer-Young *et al.*, 2017).

Estudios recientes, destacan el papel de la microbiota intestinal como posible mecanismo inmunológico para el control de infecciones virales. Por ello se ha estudiado la microbiota intestinal de *A. mellifera*, la cual presenta nueve especies bacterianas, que se caracterizan por ser microaerófilos, anaeróbicas facultativas y

adaptadas al huésped (Moran *et al.*, 2012), en donde, a través de la secuenciación del gen 16S rRNA, se identificó en mayor abundancia *Lactobacillus* Firm-5, seguido de *Lactobacillus* Firm-4, *Gilliamella apícola*, *Snodgrassella alvi*, *Bifidobacterium* spp., mientras que en menor abundancia y prevalencia *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Apibacter adventoris* y *Parasaccharibacter apium* (Kwong & Moran, 2016); estas bacterias cumplen diversos roles, como la estimulación del sistema inmune o la fermentación de azúcares y carbohidratos (Kwong *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017). La interacción entre diversas bacterias, pueden lograr una adecuada desenvolvura en la aptitud de *A. mellifera*, estimulando su sistema inmunológico y con ello el aumento en la eficiencia de la defensa contra patógenos (De Souza *et al.*, 2009; Evans & Armstrong, 2006), en específico estimular los péptidos antimicrobianos (AMP) que son parte esencial del sistema inmunológico innato de los insectos (Wu *et al.*, 2018), entre los cuales se encuentran los genes abaecina y defensina, genes sensibles a las altas cargas virales del DWV (Aronstein *et al.*, 2012; Balakrishnan *et al.*, 2021).

Las bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son usados usualmente como probiótico en mamíferos (Gaggia *et al.*, 2011), y se ha estudiado su capacidad para inhibir patógenos en *A. mellifera*. Para ello, dichas bacterias se han aislado desde su intestino, ubicadas predominantemente en el recto, pertenecientes al filo Firmicutes y Actinobacterium (Zheng *et al.*, 2018). Específicamente, se ha visto que la utilización de estas cepas confiere un efecto positivo en el control de la infección por *Nosema ceranae*, al igual, han logrado producir un aumento en promedio del 50 % aproximadamente de la población de cría, recolección de polen y miel cosechable en alzas, además de un aumento de la microbiota intestinal en las nuevas generaciones de abejas de alrededor del 4 % (Alberoni *et al.*, 2018; Baffoni *et al.*, 2016).

Dado esto, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la ingesta de bacterias lácticas, en la sobrevivencia, sistema inmune y la actividad antiviral de adultos de *A. mellifera* inoculadas con el virus de las alas deformadas (DWV-A).

MATERIALES Y METODOS

Obtención de bacterias

Las bacterias utilizadas en este estudio (Tabla 1), fueron obtenidas en el marco de un proyecto FIA PYT 2017-0241.

Tabla 1. Cepas conformadoras del Consorcio probiótico.

Origen	Identificación	Código
Los Lagos	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	5,5
Los Lagos	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	5,7
Los Ríos	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	13,1
Los Lagos	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	14,4
Los Lagos	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	15,1
Los Lagos	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	20,4

Obtención de abejas

Insectos adultos de *A. mellifera* para el ensayo fueron colectadas desde el apiario experimental ubicado en el centro experimental “El Nogal” (36°35`58.25`` S-72°04`51.77`` W), Universidad de Concepción, Chillan, Chile. Se colectaron marcos con abejas de colmenas sanas, los cuales presentaron una postura uniforme por ambos lados, posteriormente fueron trasladados a una cámara con condiciones controladas, con temperatura de 33° C $\pm$ 2; 60 % $\pm$ 3 HR, para que la cría terminara su desarrollo y emergiera. Esta actividad tuvo la finalidad de controlar la edad de las abejas a utilizar en los ensayos, teniendo un delta máximo de 48 horas de emergencia.

Preparación del inóculo viral

Se obtuvo un aislado de la variante-A del virus de las alas deformadas (DWV-A) de colonias inoculadas. Un grupo de 20 abejas se homogeneizó en una bolsa stomacher con solución salina tamponada con fosfato (1x PBS) durante 90 s a alta velocidad en una licuadora de laboratorio stomacher 80 (Seward, Londres, Reino Unido). Las muestras se centrifugaron a 1,500 g durante 10 minutos, seguido de 10,000 g durante 10 minutos, ambos a 4 ° C. El sobrenadante se purificó por filtración con un filtro de 0.22 μ m (PES, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Posteriormente, se utilizó 200 μ L del sobrenadante, del cual se extrajo ARN, se sintetizó ADNc y finalmente se realizó la cuantificación de la carga viral del inóculo.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para la cuantificación de la carga viral (DWV) y la expresión de los genes del sistema inmune, cada cuerpo de abeja colectada en cada punto de muestreo durante los ensayos, fue macerado en una solución tampón salina PBS, se colectaron 200 μ L del macerado, el cual se utilizó para la extracción de ARN, siguiendo lo descrito por (Silva *et al.*, 2021) y las instrucciones proporcionadas por E.Z.N.A. Kit de ARN total (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, EE. UU.).

La calidad y el rendimiento del ARN se determinó con un espectrómetro (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

A fin de cuantificar la carga viral y la expresión de los genes del sistema inmune, se utilizó cebadores específicos (Tabla 2). 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 μ L, incluidos 20 ng de ADNc, 530 nM de cada cebador y agua de grado molecular filtrada estéril para alcanzar los 15 μ L. Las condiciones de reacción térmica que se utilizaron fueron de: 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 (β -actina), como describe Pfaffl (2001). De igual forma, para determinar la carga viral de las abejas, 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 en serie ($1,0 \times 10^1$ a $1,0 \times 10^9$) del número de copias virales de ADNc purificado.

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de cebadores de genes de defensa de *Apis mellifera* y virus de las alas deformadas (DWV-A) utilizados en qRT-PCR.

Primers		Secuencias	Referencia
DWV-A	F	TATCTTCATTAAAGCCACCTGGAA	Yang & Cox-Foster, 2005
	R	TTTCCTCATTAACTGTGTCGTTGAT	
B-Actina	F	ATGCCAACACTGTCCCTTTCTGG	Yang & Cox-Foster, 2005
	R	GACCCACCAATCCATACGGA	
Abaecina	F	CAGCATTCGCATACGTACCA	Evans, 2006
	R	GACCAGGAAACGTTGGAAAC	
Defensina	F	TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	Yang & Cox-Foster, 2005
	R	TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	

Primers: DWV-A: Virus de las alas deformadas variante A; F: Forward; R: Reverse.

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 de normalización del gen de β -actina (Yang & Cox-Foster, 2005). Luego, 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.

Preparación las cepas bacterianas de forma individual conformadoras del Consorcio probiótico

Para la alimentación de las abejas, cada bacteria que compone el Consorcio probiótico (Constituido de 6 bacterias) fue trabajada individualmente, pero en un proceso igualitario para todas. Para ello fueron sembradas en agar MRS, y se incubaron durante 24 horas en condiciones de temperatura controladas de 30°C. Transcurrido este tiempo, se extrajo una muestra de la bacteria, la cual fue enriquecida en 30 mL de caldo Man Rogosa Sharp (MRS), en tubos eppendorf, para su posterior desarrollo y reproducción de cada bacteria, para ello fueron nuevamente incubadas por 24 horas. Posteriormente, se cuantifico el crecimiento bacteriano, a través de un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 600 nm, para lo cual se le realizó una dilución, donde se tomaron 100 µL de bacteria y 900 µL de solvente, para este caso fue utilizado NaCl al 90 %. Dado que, para la alimentación de las abejas, las bacterias fueron igualadas en concentraciones. Finalmente, las bacterias, fueron incorporadas en la dieta de las abejas como alimentación *ad libitum*, en donde se mezclaron 2 partes de bacterias por una parte de jarabe de azúcar al 60 %.

Determinación de la dosis mínima efectiva

Las abejas recién emergidas fueron inoculadas individualmente con diferentes concentraciones del Consorcio probiótico (constituido por las 6 bacterias evaluada) denominado “C9”, las cuales tuvieron un periodo de ayuno de una hora, para su posterior administración de 60.000, 6.000 y 600 UFC abeja⁻¹ del probiótico prototipo (sin formular). Pasado 48 horas, las abejas tratadas fueron inoculadas de manera individual con el virus de las alas deformadas (DWV-A) a una concentración de 1x10⁹ número de copias genómicas abejas⁻¹, disuelto en sacarosa al 60%. En total y para todos los ensayos del presente estudio, se inocularon 60 abejas por repetición, en un total de cuatro repeticiones para cada tratamiento (n=240 abejas por tratamiento).

Luego, el Consorcio probiótico a sus diferentes concentraciones fue suministrado *ad libitum* a los 5, y 10 días después de la primera inoculación con el Consorcio probiótico. Para determinar la carga de DWV-A en el tiempo, se

colectaron muestras de abejas tratadas e inoculadas a las 48 horas, 5 y 10 días post-inoculación viral. Posteriormente se les realizó extracción de ARN a las abejas de los diferentes tratamientos, luego síntesis de cDNA y PCR cuantitativa (qPCR) con partidores específicos para DWV-A (Tabla 2).

Evaluación de abejas tratadas con las cepas bacterianas de forma individual conformadoras del Consorcio probiótico

Con el objetivo de determinar si la actividad antiviral es atribuible a una o más bacterias dentro del Consorcio probiótico, se preparó un ensayo de forma similar a como se describió anteriormente, con modificaciones correspondientes. En resumen, las abejas recién emergidas fueron inoculadas individualmente con la dosis mínima efectiva de una de las cepas bacterianas que conforman el Consorcio probiótico, y esto se repitió con cada una de las cepas, así se obtuvieron los siguientes tratamientos: cepa 5,5, 5,7, 13,1, 14,4, 15,1 y 20,4. Luego de 48 horas, las abejas fueron inoculadas de manera individual con un inóculo viral del virus de las alas deformadas (DWV-A) a una concentración de 1×10^9 número de copias genómicas abejas⁻¹ en sacarosa al 60%. Para determinar la efectividad de las cepas para reducir la carga de DWV-A, los tratamientos que incluyen las cepas bacterianas fueron comparadas con un control no inoculado con el patógeno (C.S) y un control inoculado con el patógeno (C.I), ambos sin suministrar las cepas bacterianas. Luego las diferentes cepas del Consorcio probiótico fueron suministradas *ad libitum* nuevamente a los 5 y 10 días después de la primera inoculación con las diferentes cepas del Consorcio probiótico. Para determinar la carga de DWV-A en el tiempo, se colectaron muestras de abejas tratadas e inoculadas a las 48 horas, 5 y 10 días post-inoculación viral. A estas abejas se les realizó la extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa (qPCR) con partidores específicos para DWV-A (Tabla 2).

Actividad antiviral de las cepas con mayor actividad antiviral en comparación del Consorcio probiótico

Posteriormente, se realizó un nuevo ensayo de forma similar a como se describió anteriormente, con modificaciones correspondientes, con el fin de evaluar a las cepas con mayor actividad antiviral obtenidas del ensayo anterior, dicha evaluación

fue tanto de forma individual, cada cepa por separado, como la formación de un nuevo consorcio con dichas cepas (C.N), estos nuevos tratamientos fueron comparados contra el Consorcio probiótico (C9), un control no inoculado con DWV-A (C.S) y un control inoculado con el virus (C.I). De igual forma, se evaluó en este ensayo diferentes parámetros, específicamente el efecto de dichas bacterias frente al DWV-A, como al sistema inmunológico y la sobrevivencia de *A. mellifera*. Finalmente, se les realizó la extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa (qPCR) con partidores específicos para DWV-A (Tabla 2).

Análisis estadístico

Las curvas de sobrevivencia de los tratamientos se trazaron utilizando un estimador de Kaplan-Meier considerando las abejas vivas al final del experimento como datos censurados. Las diferencias entre las curvas de sobrevivencia se estimaron mediante una prueba de rango logarítmico ($p < 0,05$) y los valores de p se corrigieron ($p < 0,05$) con el método de Holm-Bonferroni (Holm, 1979) para comparaciones múltiples por pares con respecto al control no inoculado (C.S) e inoculados (C.I). Para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos, se realizó un análisis de varianza de medias (ANOVA) seguido de una separación de medias *a posteriori*. Luego se utilizó la prueba HSD de Tukey ($p < 0,05$) para separar las medias entre los tratamientos. Todos los tratamientos fueron comparados con un control no inoculado (C.S): abejas sin tratar ni inocular con el patógeno, y un control solo inoculado con el virus (C.I): abejas inoculadas con el patógeno, pero sin ser tratadas por el Consorcio probiótico.

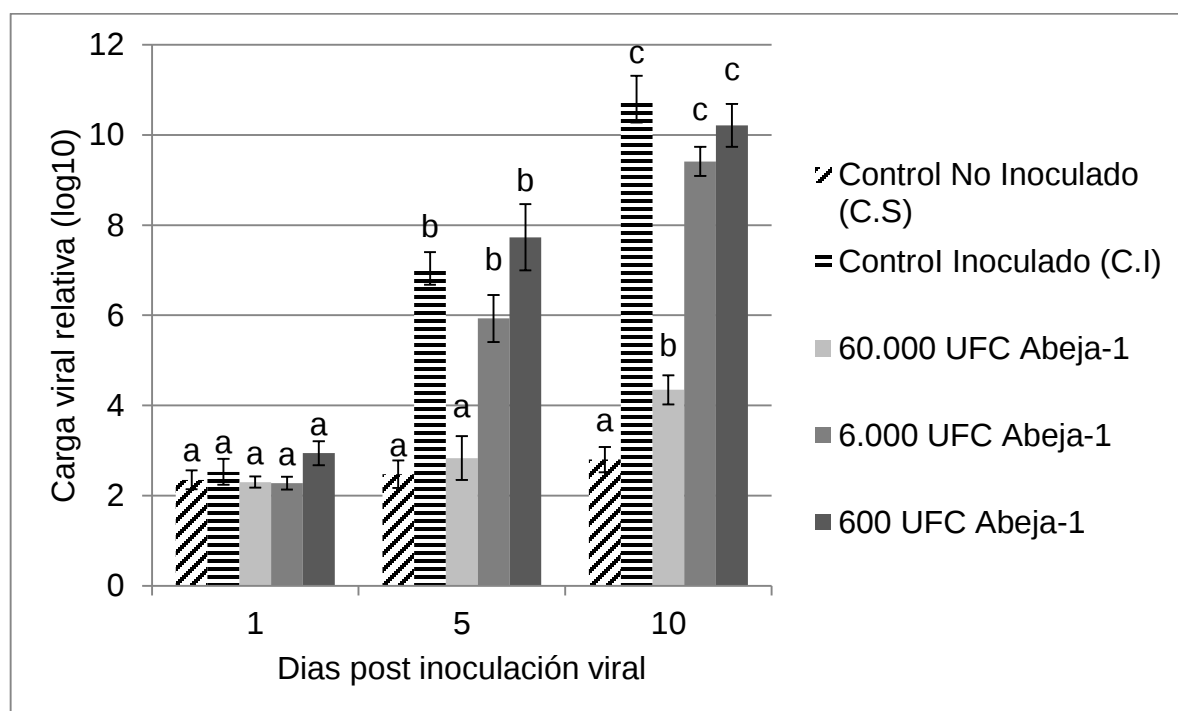
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de dosis mínima efectiva

Basado en los datos al término del ensayo, 10 días post-inoculación viral (abejas de 15 días de edad), solo el tratamiento con la concentración más elevada del Consorcio probiótico (60.000 UFC abeja⁻¹), logro reducir en un 59,7 % (1×10^4 número de copias genómicas por abeja) la carga del DWV-A en abejas inoculadas, al ser comparadas con aquellas no tratadas con este Consorcio probiótico e inoculadas con el virus (1×10^{10} número de copias genómicas por abeja) (Figura 1). No obstante, en las demás concentraciones evaluadas, no se observaron

diferencias estadísticas entre estos tratamientos y el control inoculado, en donde encontramos que a 6.000 UFC abeja⁻¹ se controló solo un 12,8 % (1×10^9 número de copias genómicas por abeja) y en la menor concentración de 600 UFC abeja⁻¹ sólo se controló un 5.8 % (1×10^{10} número de copias genómicas por abeja) del DWV-A. Por ende, se consideró que la concentración mínima en la cual se observa un control significativo de la infección causada por el DWV-A es de 60.000 UFC abeja⁻¹.

Figura 1. Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV-A) luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación viral en abejas tratadas con diferentes concentraciones del Consorcio probiótico.



Análisis de varianza (ANOVA), interacción entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las concentraciones del Consorcio probiótico (60.000; 6.000 y 600 UFC abeja⁻¹), y el control no inoculado (C.S) y el control inoculado (C.I) se muestran en diferentes simbologías y colores.

El uso de múltiples bacterias de forma simbiote, es utilizado tanto en el presente estudio, logrando el control del DWV-A, como en otros trabajos para así obtener mayores beneficios (GarcíaVicente *et al.*, 2023). Daisley *et al.* (2023), demostraron que a través del uso combinado de 3 cepas lactobacilos, como fuente de suplementación para *A. mellifera*, fomentó el desarrollo de las bacterias intestinales endógenas de las abejas, en conjunto con un control de patógenos, como *V.*

destructor y DWV (Daisley *et al.*, 2023). De igual forma, Tejerina *et al.* (2020) administraron *Lactobacillus salivarius* A3iob, cepa que logró reducir el patógeno *Nosema* spp. a niveles leves de infestación, menores a 2×10^4 esporas por abeja, además de un control promedio del 65 % para *V. destructor* (Tejerina *et al.*, 2020). Asimismo, el control inoculado con el DWV-A y no tratado con el Consorcio probiótico del presente estudio, alcanzó una carga viral de 1×10^{10} número de copias genómicas por abeja, superando el umbral reconocido para lograr infecciones de DWV tanto asintomáticas como sintomáticas de 10^9 copias del genoma de DWV (Posada Florez *et al.*, 2019).

Abejas tratadas con las cepas bacterianas de forma individual conformadoras del Consorcio probiótico

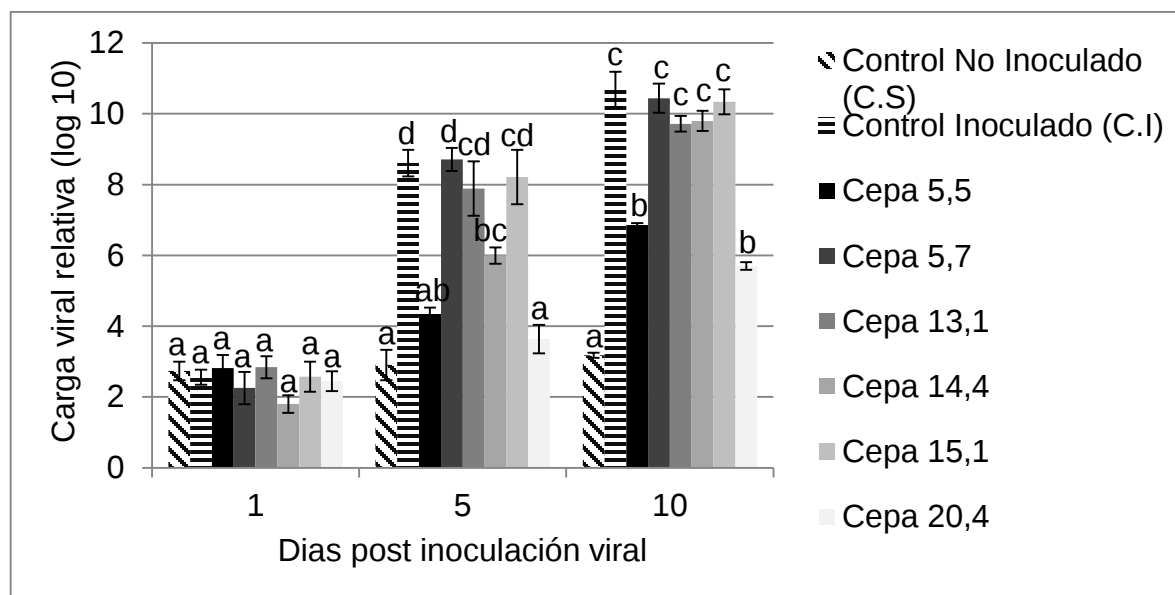
Tras el análisis y evaluación de las seis cepas conformadoras del Consorcio probiótico, se determinó al término del ensayo una actividad antiviral atribuible a las cepas 5,5 y 20,4, dado que ambas redujeron significativamente la carga viral del DWV-A. Dicha reducción es marcada a los 10 días post-inoculación viral, en donde para la cepa 20,4 se notó una reducción del 46,4 % (1×10^5 número de copias genómicas por abeja), y la cepa 5,5, la cual tuvo una disminución del 36,3 % (1×10^6 número de copias genómicas por abeja), en comparación con el tratamiento control inoculado, que son abejas sin tratar con el Consorcio probiótico, pero inoculadas con el virus (1×10^{10} número de copias genómicas por abeja) (Figura 2). Por otra parte, para las abejas inoculadas con DWV-A que fueron tratadas con las otras cepas 5,7, 13,1, 14,4 y 15,1, produjeron una reducción de la carga viral que osciló entre 3.01 % y 8.52 % (Entre 1×10^{10} y 1×10^9 número de copias genómicas por abeja). Así, se consideró que solo las cepas 5,5 y 20,4 presentan un mayor control sobre el patógeno.

El presente ensayo demostró un control principalmente por parte de las cepas 20,4 y 5,5, desde el día 5 post-inoculación viral, en promedio de un 53,6 % (1×10^4 número de copias genómicas por abeja), en comparación al nivel de infección alcanzado por el tratamiento control inoculado (C.I) (1×10^9 número de copias genómicas por abeja). A diferencia de otros estudios, en donde para lograr una reducción del DWV, han utilizado hongos poliporosos o fitoquímicos, como timol,

nicotina, catalpol, entre otros, logrando su objetivo 7 o 12 días después de realizar tratamientos contra el virus (Palmer-Young *et al.*, 2017; Stamets *et al.*, 2018).

Asimismo, cabe mencionar que al igual que en otros estudios relacionados, se han utilizado marcos con cría, con cargas virales bajas de DWV-A, sin *Varroa* u otros patógenos (Al Naggar *et al.*, 2023; Phokasem *et al.*, 2022; Ryabov *et al.*, 2019), obteniendo como base del colmenar, la carga viral obtenida del tratamiento no inoculado (C.S) en el muestreo realizado en el día 1 (1×10^2 número de copias genómicas por abeja), dado que este tratamiento, en el tiempo mencionado, no fue intervenido, además de que tuvo una dieta exclusiva de jarabe de azúcar, sin bacterias, ni fue inoculado con el DWV-A a lo largo del estudio. Dicha carga viral, demuestra la presencia del DWV-A en el colmenar experimental, y la alta prevalencia del virus a lo largo de Chile (Riveros *et al.*, 2020).

Figura 2. Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV-A) luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación viral en abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas de forma individual conformadoras del Consorcio probiótico.



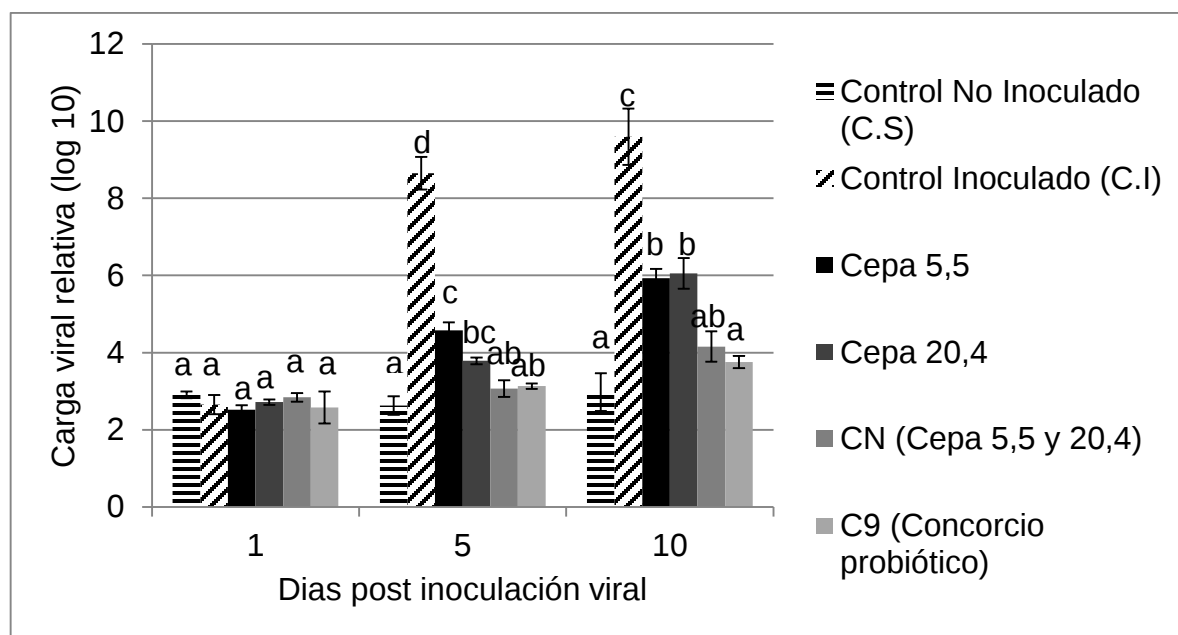
Análisis de varianza (ANOVA), interacción entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Las cepas del Consorcio probiótico (5,5; 5,7; 13,1; 14,4; 15,1 y 20,4), el control no inoculado (C.S) y el control inoculado (C.I) se muestran en diferentes simbologías y colores.

Actividad antiviral de las cepas 5,5 y 20,4 en comparación al Consorcio probiótico

Al término del ensayo, basado en el análisis de los datos obtenidos y posterior cuantificación de la carga viral en *A. mellifera*, se demostró que en todas aquellas abejas que fueron inoculadas con el DWV-A, presentaron un aumento de la carga viral, aumento que se observó en abejas de 10 días post-inoculación, llegando el control inoculado con DWV-A (C.I) a alcanzar una carga viral de 1×10^{10} número de copias genómicas por abeja. Se obtuvo que entre el Consorcio probiótico (C.9) y una mezcla equitativa (30.000 UFC abeja⁻¹ por cepa) de las cepas 5,5 y 20,4 (C.N), para así aplicar la dosis mínima efectiva (60,000 UFC abeja⁻¹), no se obtuvieron diferencias estadísticas entre estos dos tratamientos (Figura 3), logrando reducir la carga del DWV-A, al ser comparadas con el control inoculado (C.I), específicamente en 60.8 % para C9 (1×10^3 número de copias genómicas por abeja) y de 56.7 % para C.N (1×10^4 número de copias genómicas por abeja).

Figura 3. Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV-A) luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación viral en abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas y consorcios del probiótico bacteriano.



Análisis de varianza (ANOVA), interacción entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Cepas bacterianas individuales (5,5 y 20,4), consorcio compuesto por las bacterias 5,5 y 20,4 (C.N), Consorcio probiótico compuesto por 6 bacterias (C9), control no inoculado (C.S) y el control inoculado (C.I) se muestran en diferentes simbologías y colores.

En tanto, en abejas tratadas con cada cepa por separado, se controló en menor medida la carga viral, con la cepa 5,5 controlando la carga viral en un 38.1 % (1×10^5

número de copias genómicas por abeja) y la cepa 20,4 en 36.8 % (1×10^6 número de copias genómicas por abeja) respecto al tratamiento inoculado con DWV-A (C.I) sin tratar con ninguna cepa o consorcio bacteriano (Figura 3). En síntesis, se asume que un mayor control de la carga viral está dado principalmente por la combinación de dos o más cepas, comprendiendo su uso concretamente para los parámetros evaluados durante el ensayo.

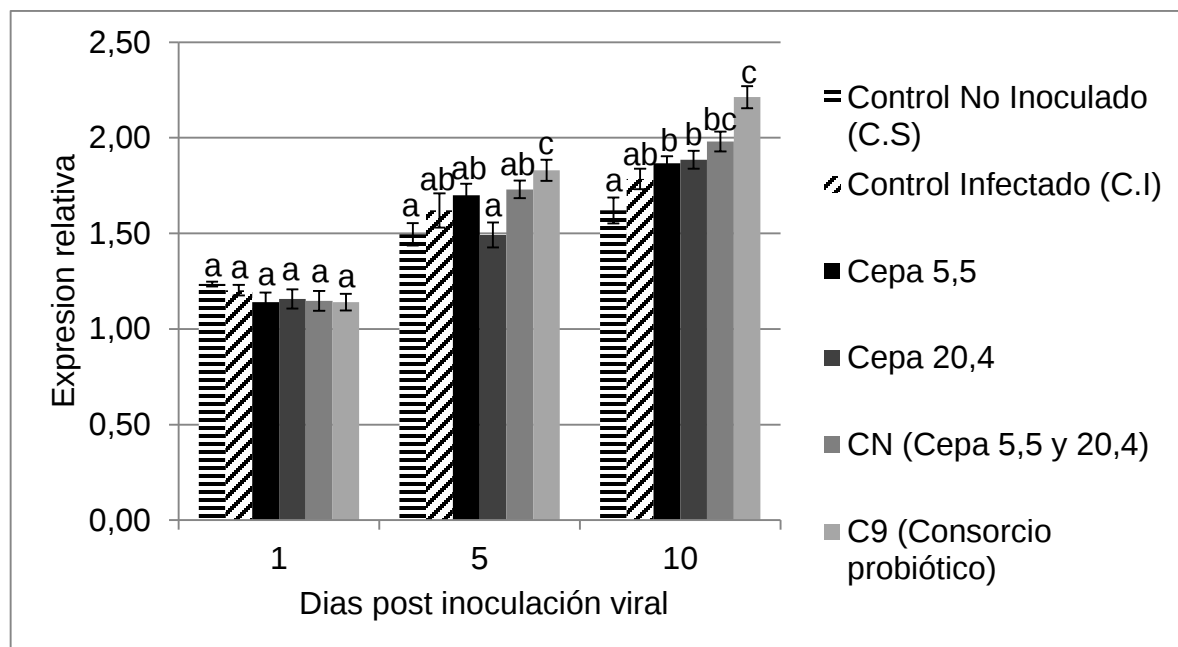
La microbiota de *A. mellifera* se compone por nueve especies bacterianas, que representan a un conjunto de cepas que se relacionan (Moran *et al.*, 2012), las cuales, no están presentes al momento de emerger (Powell *et al.*, 2014), comenzando la colonización bacteriana intestinal a través de diversas interacciones de las abejas, en donde las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* inician su desarrollo 3 días después de emergencia (Dong *et al.*, 2020), tras lograr una abundancia de dichas bacterias, las cepas *Lactobacillus* se ven reducidas durante el periodo de invernada, al igual, las cepas *Bifidobacterium*, que disminuyen su concentración 25 días después de la emergencia de *A. mellifera* (Dong *et al.*, 2020; Olofsson & Vásquez, 2008). Asimismo, es de amplio conocimiento, que el DWV se encuentra vigente durante todo el ciclo de vida de *A. mellifera*, desde huevo hasta senescencia (Chen *et al.*, 2005), de igual forma, su diseminación se amplía en casi todo el cuerpo de las abejas sintomáticas, afectando antenas, cabeza, patas, alas, tórax y abdomen principalmente (Boncristiani *et al.*, 2009), al contario de abejas asintomáticas, puesto que según Yue & Genersch (2005), quienes demostraron que el DWV en abejas que no presentan deformidades, las partículas virales solo se detectan en el tórax y/o abdomen, en donde se encuentra la microbiota de *A. mellifera* (Yue & Genersch, 2005). Los títulos virales siguen al alza durante la temporada de invierno, a pesar de observarse y verificarse una disminución del número de *V. destructor*, principal vector del DWV (Paxton *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022), lo cual, puede deberse a la disminución de las bacterias anteriormente mencionadas, generando una microbiota intestinal perturbada, que en consecuencia genera una disminución de la supervivencia de *A. mellifera* expuesta al DWV, como lo indica Dosch *et al.* (2021), quienes además, demuestran de forma contraria a lo anteriormente mencionado, que *A. mellifera* al poseer una microbiota

intestinal normal, lo que se considera $>10^8$ bacterias por intestino, aumenta la supervivencia de las abejas frente al DWV, pero de igual forma, la carga viral de DWV logró altos niveles, indiferente de poseer una microbiota normal o perturbada (Dosch *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2017), por ende, a través de nuestro estudio, se pudo observar que la incorporación de bacterias a la microbiota intestinal de *A. mellifera*, genera un control sobre el DWV-A.

Determinación de la expresión de los genes abaecina y defensina

Al analizar la expresión de los genes abaecina y defensina, relacionados con el sistema inmune innato de *A. mellifera* y que codifican para péptidos antimicrobianos, posterior a la inoculación con el DWV-A, se observó que para el caso del gen abaecina, a los 10 días post inoculación viral hubo una estimulación de la expresión en todos los tratamientos en los cuales se suministró bacterias a las abejas, comparado con aquellos tratamientos que no las recibieron (C.S y C.I) (Figura 4).

Figura 4. Expresión del gen abaecina luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación con el virus de las alas deformadas (DWV-A) en abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas y consorcios del probiótico bacteriano.



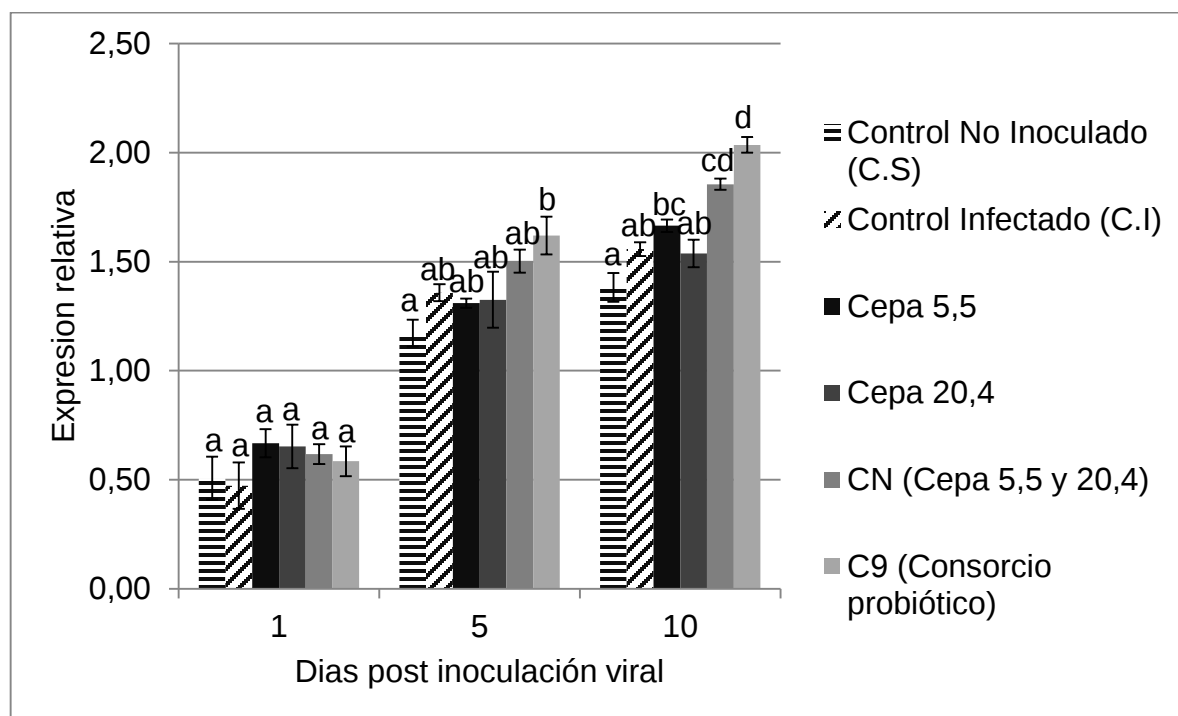
Análisis de varianza (ANOVA), interacción entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Cepas bacterianas individualmente (5,5 y 20,4), consorcio compuesto por las bacterias 5,5 y 20,4 (C.N), Consortio probiótico compuesto por 6 bacterias (C9), y el control no inoculado (C.S) y el control inoculado (C.I), se muestran en diferentes simbologías y colores.

En efecto, en el tratamiento compuesto por las 6 bacterias (C9), se observó un aumento de un 36,4 % en la expresión del gen abaecina, a los 10 días pos inoculación viral, en comparación al tratamiento no inoculado ni tratado con bacterias (C.S), y de un 23,5 % en comparación al tratamiento inoculado con el DWV-A y no tratado con bacterias (C.I) (Figura 4).

Asimismo, para el gen defensina, los tratamientos Consorcio probiótico compuesto por las 6 bacterias (C9) y el consorcio compuesto de las bacterias 5,5 y 20,4 (C.N), aumentaron la expresión del gen en un 30,8 % y 19,2 % respectivamente, en comparación al tratamiento control inoculado con el DWV-A y no tratado con bacterias (C.I), a los 10 dpi (Figura 5).

Figura 5. Expresión del gen defensina luego de 1, 5 y 10 días post-inoculación con el virus de las alas deformadas (DWV-A) en abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas y consorcios del probiótico bacteriano.



Análisis de varianza (ANOVA), interacción entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Cepas bacterianas individualmente (5,5 y 20,4), consorcio compuesto por las bacterias 5,5 y 20,4 (C.N), Consorcio probiótico compuesto por 6 bacterias (C9), y el control no inoculado (C.S) y el control inoculado (C.I), se muestran en diferentes simbologías y colores.

En el presente estudio, la administración de lactobacterias produjo la sobre expresión de genes que codifican para los péptidos antimicrobianos abaecina y defensina en

A. mellifera. Resultados similares fueron obtenidos por Wang *et al.* (2022), quienes administraron la bacteria *L. helveticus* KM7 en *A. cerana* logrando la sobre expresión de los genes abaecina y defensina, al igual que Evans y López (2004), que expusieron a *A. mellifera* en estado larva a una mezcla de bacterias no patógenas, obteniendo al finalizar el estudio altos niveles de expresión del gen abaecina. Por lo tanto, el uso de bacterias como alimentación suplementaria se presenta como un sustituto potencial para estimular el sistema inmune de *A. mellifera*.

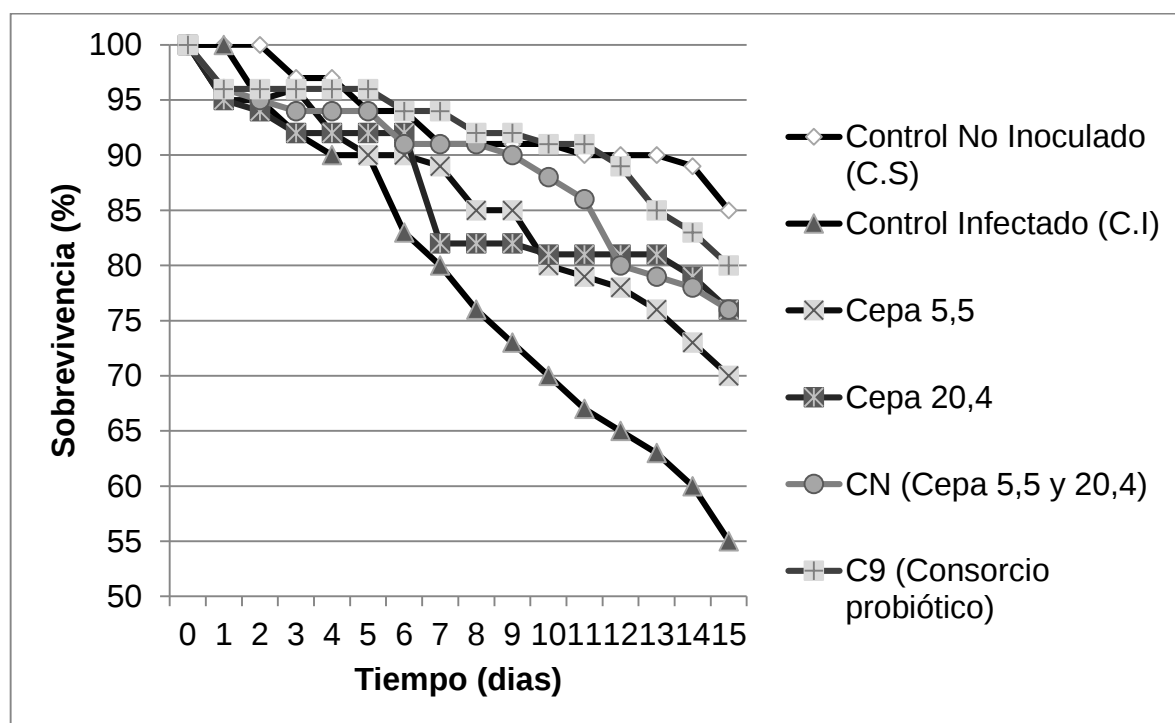
Probabilidad de sobrevivencia de abejas tratadas con lactobacterias e inoculadas con DWV-A.

La mezcla de las cepas 5,5 y 20,4 (C.N) y el Consorcio probiótico formado por las 6 cepas evaluadas en este estudio (C9), estimularon la sobrevivencia de las abejas, cuando estas fueron inoculadas y presentaron altas cargas virales de DWV-A, dichos tratamientos alcanzaron tasas de sobrevivencia del 88 % y del 90 %, respectivamente, al finalizar el ensayo (Figura 6). De igual forma, al día 6, el 90 % de las abejas seguían vivas, en todos los tratamientos que se les suministró bacterias y el control no inoculado (C.S), logrando diferencias significativas con el control inoculado con DWV-A y sin ser tratado con bacterias (C.I), el cual comenzó un descenso en el número de abejas notorio en comparación con el resto de los tratamientos. Al término del ensayo, 10 días post-inoculación viral (Abejas de 15 días de edad) las abejas inoculadas con el virus y tratadas con los tratamientos C.N y C9 sobrevivieron un 38 % y 45 % más que el control inoculado con DWV-A y no tratado con bacterias (C.I) (Figura 6).

La microbiota intestinal es clave para la salud de *A. mellifera*, pero está sujeta a múltiples alteraciones, como el uso de pesticidas, que terminan debilitando a las abejas, acortan su periodo de vida y provocando una mayor susceptibilidad a diversos patógenos (Kakumanu *et al.*, 2016; Motta *et al.*, 2018), en donde resalta *V. destructor*, principal vector de DWV (Hubert *et al.*, 2017, Khongphinitbunjong *et al.*, 2016). Dicho virus, en el presente estudio fue administrado de forma oral, por ende, se provocó una infección concentrada en el tracto digestivo principalmente, no generando síntomas visibles en *A. mellifera* (Mockel *et al.*, 2011), de igual forma, se

sabe que una inoculación posterior a la emergencia de las abejas es menos mortal, en comparación a una infestación en etapa larvaria con el DWV (Zanni *et al.*, 2023). Asimismo, se ha demostrado a lo largo del presente estudio, que el uso de bacterias lácticas, genera un efecto benéfico en *A. mellifera*, controlando y/o disminuyendo los niveles del DWV-A, logrando tasas de sobrevivencia mayores al 88%, datos similares a los manifestados por Pachla *et al.* (2021) quienes utilizaron bacterias lácticas propias de *A. mellifera* como suplemento en ellas mismas, consiguiendo promover la longevidad de las abejas y disminuir las tasas de mortalidad (Pachla *et al.*, 2021), esto está fuertemente relacionado al uso de bacterias endógenas de *A. mellifera*, dado que poseen una mejor proliferación en su intestino, en comparación con las bacterias no nativas de las abejas (Motta *et al.*, 2022).

Figura 6. Probabilidad de sobrevivencia de abejas tratadas con diferentes cepas bacterianas y Consorcio probiótico e inoculadas con DWV-A en condiciones controladas.



Curvas de Kaplan-Meier. Cada curva representa un control no inoculado, abejas no inoculadas con DWV-A y sin tratamiento de bacterias (C.S), control inoculado, abejas inoculadas con DWV-A y sin tratar de bacterias (C.I), abejas inoculadas con DWV-A y tratadas con bacterias de la cepa 5,5 (5,5), abejas inoculadas con DWV-A y tratadas con bacterias de la cepa 20,4 (20,4), abejas inoculadas con DWV-A y tratadas con bacterias de la cepa 5,5 y 20,4 (C.N) y abejas inoculadas con DWV-A y tratadas con el probiótico completo, conformado por las 6 cepas trabajadas en este estudio (C9). Barras que no se tocan, indican diferencias significativas.

CONCLUSIONES

1. La dosis mínima efectiva a aplicar del Consorcio probiótico para obtener una reducción significativa del virus de las alas deformadas (DWV-A) en *A. mellifera* es de 60.000 UFC abeja⁻¹.
2. La ingesta de bacterias lácticas aumenta la expresión de los genes que codifican para los péptidos antimicrobianos abaecina y defensina, en abejas infectadas con el virus de las alas deformadas (DWV-A).
3. La ingesta de bacterias lácticas aumenta la sobrevivencia de *A. mellifera* infectadas con altas cargas del virus de las alas deformadas (DWV-A).

REFERENCIAS

1. Abbasi, K. H., Jamal, M., Ahmad, S., Ghramh, H. A., Khanum, S., Khan, K. A., Ullah, M. A., Aljedani, D. M., & Zulfiqar, B. (2021). Standardization of managed honey bee (*Apis mellifera*) hives for pollination of Sunflower (*Helianthus annuus*) crop. Journal of King Saud University - Science, 33(8). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101608>
2. Al Naggar, Y., Shafiey, H., & Paxton, R. J. (2023). Transcriptomic Responses Underlying the High Virulence of Black Queen Cell Virus and Sacbrood Virus following a Change in Their Mode of Transmission in Honey Bees (*Apis mellifera*). Viruses, 15(6), 1284. <https://doi.org/10.3390/v15061284>
3. Alberoni, D., Baffoni, L., Gaggia, F., Ryan, P., Murphy, K., Ross, P., Stanton, C., & Di Gioia, D. (2018). Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. Beneficial microbes, 9(2), 269-278. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0061>
4. Aronstein, K. A., Saldivar, E., Vega, R., Westmiller, S., & Douglas, A. E. (2012). How *Varroa* parasitism affects the immunological and nutritional status of the honey bee, *Apis mellifera*. Insects, 3(3), 601-615. <https://doi.org/10.3390/insects3030601>
5. Baffoni, L., Gaggia, F., Alberoni, D., Cabbri, R., Nanetti, A., Biavati, B., & Di Gioia, D. (2016). Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. Beneficial microbes, 7(1), 45-51. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0085>
6. Balakrishnan, B., Wu, H., Cao, L., Zhang, Y., Li, W., & Han, R. (2021). Immune response and hemolymph microbiota of *Apis mellifera* and *Apis cerana* after

- the challenge with recombinant *Varroa* toxic protein. *Journal of Economic Entomology*, 114(3), 1310-1320. <https://doi.org/10.1093/jee/toab047>
7. Boncristiani, H. F., Di Prisco, G., Pettis, J. S., Hamilton, M., & Chen, Y. P. (2009). Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee, *Apis mellifera*. *Virology Journal*, 6(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-221>
 8. Brodschneider, R., Brus, J., & Danihlík, J. (2019). Comparison of apiculture and winter mortality of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Austria and Czechia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 274, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.01.002>
 9. Cens, T., Chavanieu, A., Bertaud, A., Mokrane, N., Estaran, S., Roussel, J., Ménard, C., De Jesus Ferreira, M. C., Guiramand, J., Thibaud, J. B., Cohen-Solal, C., Rousset, M., Rolland, V., Vignes, M., & Charnet, P. (2022). Molecular Targets of Neurotoxic Insecticides in *Apis mellifera*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2022(21). <https://doi.org/10.1002/ejoc.202101531>
 10. Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., & Pettis, J. S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of invertebrate pathology*, 97(2), 186-188. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.010>
 11. Chen, Y., Higgins, J., & Feldlaufer, M. (2005). Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 436-441. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.436-441.2005>
 12. Chen, Y. P., Becnel, J. J., & Valles, S. M. (2012). RNA viruses infecting pest insects. *Insect Pathology* (pp. 133-170).
 13. Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., & Burlando, B. (2017). Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Front Pharmacol*, 8, 412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00412>
 14. Daisley, B. A., Pitek, A. P., Torres, C., Lowery, R., Adair, B. A., Al, K. F., Niño, B., Burton, J. P., Allen-Vercoe, E., & Thompson, G. J. (2023). Delivery mechanism can enhance probiotic activity against honey bee pathogens. *The ISME Journal*, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01422-z>
 15. De Miranda, J. R., Bailey, L., Ball, B. V., Blanchard, P., Budge, G. E., Chejanovsky, N., Chen, Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E., & De Graaf, D. C. (2013). Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-56. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>

16. De Souza, D. J., Bézier, A., Depoix, D., Drezen, J. M., & Lenoir, A. (2009). Blochmannia endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. BMC microbiology, 9, 1-8. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-29>
17. DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. Current opinion in insect science, 10, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>
18. Dolezal, A. G., Carrillo-Tripp, J., Judd, T. M., Allen Miller, W., Bonning, B. C., & Toth, A. L. (2019). Interacting stressors matter: diet quality and virus infection in honeybee health. Royal Society open science, 6(2), 181803. <https://doi.org/10.1098/rsos.181803>
19. Dong, Z.-X., Li, H.-Y., Chen, Y.-F., Wang, F., Deng, X.-Y., Lin, L.-B., Zhang, Q.-L., Li, J.-L., & Guo, J. (2020). Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages. Microbiological research, 231, 126370. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126370>
20. Dosch, C., Manigk, A., Streicher, T., Tehel, A., Paxton, R. J., & Tragust, S. (2021). The gut microbiota can provide viral tolerance in the honey bee. Microorganisms, 9(4), 871. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040871>
21. Eberle, K. E., Wennmann, J. T., Kleespies, R. G., & Jehle, J. A. (2012). Basic techniques in insect virology. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. 15-74. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386899-2.00002-6>
22. Evans, J. D. (2006). Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. Journal of invertebrate pathology, 93(2), 135-139. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.004>
23. Evans, J. D., & Armstrong, T.-N. (2006). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. BMC ecology, 6, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-4>
24. Evans, J. D., & Lopez, D. L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). Journal of economic entomology, 97(3), 752-756. <https://doi.org/10.1093/jee/97.3.752>
25. Flores, J. M., Gámiz, V., Jiménez-Marín, Á., Flores-Cortés, A., Gil-Lebrero, S., Garrido, J. J., & Hernando, M. D. (2021). Impact of *Varroa destructor* and associated pathologies on the colony collapse disorder affecting honey bees. Research in Veterinary Science, 135, 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.01.001>
26. Francis, R. M., Nielsen, S. L., & Kryger, P. (2013). *Varroa*-virus interaction in collapsing honey bee colonies. PloS one, 8(3), e57540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057540>

27. Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., & Biavati, B. (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in food science & technology*, 22, S58-S66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.003>
28. García-Vicente, E. J., Martín, M., Rey-Casero, I., Pérez, A., Martínez, R., Bravo, M., Alonso, J. M., & Risco, D. (2023). Effect of feed supplementation with probiotics and postbiotics on strength and health status of honey bee (*Apis mellifera*) hives during late spring. *Research in Veterinary Science*, 159, 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.05.001>
29. Genersch, E., von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., & Gisder, S. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3), 332-352. <https://doi.org/10.1051/apido/2010014>
30. Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P. G., & Correa-Benítez, 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(4), 443-450. <https://doi.org/10.1051/apido/2009076>
31. Hernandez, J., Hattendorf, J., Aebi, A., & Dietemann, V. (2022). Compliance with recommended *Varroa destructor* treatment regimens improves the survival of honey bee colonies over winter. *Research in Veterinary Science*, 144, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.025>
32. Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., & Neov, B. (2020). Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Vet Sci*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/vetsci7040166>
33. Hubert, J., Bicianova, M., Ledvinka, O., Kamler, M., Lester, P. J., Nesvorna, M., Kopecky, J., & Erban, T. (2017). Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microbial ecology*, 73, 685-698. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0869-7>
34. Jack, C. J., & Ellis, J. D. (2021). Integrated pest management control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), the most damaging pest of (*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)) colonies. *Journal of Insect Science*, 21(5), 6. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab058>
35. Joseph, J., Santibáñez, F., Laguna, M. F., Abramson, G., Kuperman, M. N., & Garibaldi, L. A. (2020). A spatially extended model to assess the role of landscape structure on the pollination service of *Apis mellifera*. *Ecological Modelling*, 431. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2020.109201>

36. Kakumanu, M. L., Reeves, A. M., Anderson, T. D., Rodrigues, R. R., & Williams, M. A. (2016). Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01255>
37. Kevill, J. L., Highfield, A., Mordecai, G. J., Martin, S. J., & Schroeder, D. C. (2017). ABC assay: Method development and application to quantify the role of three DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees. *Viruses*, 9(11), 314. <https://doi.org/10.3390/v9110314>
38. Khongphinitbunjong, K., de Guzman, L. I., Rinderer, T. E., Tarver, M. R., Frake, A. M., Chen, Y., & Chantawannakul, P. (2016). Responses of *Varroa*-resistant honey bees (*Apis mellifera* L.) to deformed wing virus. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(4), 921-927. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.08.008>
39. Koleoglu, G., Goodwin, P. H., Reyes-Quintana, M., Hamiduzzaman, M. M., & Guzman-Novoa, E. (2018). *Varroa destructor* parasitism reduces hemocyte concentrations and prophenol oxidase gene expression in bees from two populations. *Parasitology research*, 117, 1175-1183. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5796-8>
40. Kuster, R. D., Boncristiani, H. F., & Rueppell, O. (2014). Immunogene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *Journal of Experimental Biology*, 217(10), 1710-1718. <https://doi.org/10.1242/jeb.097766>
41. Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society open science*, 4(2), 170003. <https://doi.org/10.1098/rsos.170003>
42. Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature reviews microbiology*, 14(6), 374-384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>
43. Lanzi, G., De Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M., & Rossi, C. (2006). Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of virology*, 80(10), 4998-5009. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006>
44. Lv, M., Wang, S., Yin, H., Dong, K., Liu, Y., Pan, H., ... & Cao, Z. (2022). Probiotic potential and effects on gut microbiota composition and immunity of indigenous gut Lactobacilli in *Apis cerana*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(2), 252-262. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09935-3>
45. Mockel, 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(2), 370-377. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025940-0>
46. Moran, N. A., Hansen, A. K., Powell, J. E., & Sabree, Z. L. (2012). Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS one, 7(4), e36393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036393>
 47. Motta, E. V., Powell, J. E., Leonard, S. P., & Moran, N. A. (2022). Prospects for probiotics in social bees. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 377(1853), 20210156. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0156>
 48. Motta, E. V., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(41), 10305-10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>
 49. Natsopoulou, M. E., McMahon, D. P., Doublet, V., Frey, E., Rosenkranz, P., & Paxton, R. J. (2017). The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. Scientific reports, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05596-3>
 50. Nazzi, F., & Pennacchio, F. (2018). Honey bee antiviral immune barriers as affected by multiple stress factors: A novel paradigm to interpret colony health decline and collapse. Viruses, 10(4), 159. <https://doi.org/10.3390/v10040159>
 51. Neumann, P., & Carreck, N. L. (2015). Honey bee colony losses. Journal of Apicultural Research, 49(1), 1-6. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.01>
 52. O'Neal, S. T., Anderson, T. D., & Wu-Smart, J. Y. (2018). Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. Curr Opin Insect Sci, 26, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.01.006>
 53. Olofsson, T. C., & Vásquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. Current microbiology, 57, 356-363. <https://doi.org/doi:10.1093/jee/97.3.752>
 54. Pachla, A., Ptaszyńska, A. A., Wicha, M., Kunat, M., Wydrych, J., Oleńska, E., & Małek, W. (2021). Insight into probiotic properties of lactic acid bacterial endosymbionts of *Apis mellifera* L. derived from the Polish apiary. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(3), 1890-1899. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.040>
 55. Palmer-Young, E. C., Tozkar, C. Ö., Schwarz, R. S., Chen, Y., Irwin, R. E., Adler, L. S., & Evans, J. D. (2017). Nectar and pollen phytochemicals stimulate honey bee (Hymenoptera: Apidae) immunity to viral infection. Journal of economic entomology, 110(5), 1959-1972. <https://doi.org/10.1093/jee/tox193>

56. Paxton, R. J., Schäfer, M. O., Nazzi, F., Zanni, V., Annoscia, D., Marroni, F., Bigot, D., Laws-Quinn, E. R., Panziera, D., & Jenkins, C. (2022). Epidemiology of a major honey bee pathogen, deformed wing virus: potential worldwide replacement of genotype A by genotype B. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 18, 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.04.013>
57. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29, 2003-2007. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
58. Phokasem, P., Mookhploy, W., Krongdang, S., Sinpoo, C., & Chantawannakul, P. (2022). Interaction between thiamethoxam and deformed wing virus type A on wing characteristics and expression of immune and apoptosis genes in *Apis mellifera*. *Insects*, 13(6), 515. <https://doi.org/10.3390/insects13060515>
59. Posada-Florez, F., Childers, A. K., Heerman, M. C., Egekwu, N. I., Cook, S. C., Chen, Y., Evans, J. D., & Ryabov, E. V. (2019). Deformed wing virus type A, a major honey bee pathogen, is vectored by the mite *Varroa destructor* in a non-propagative manner. *Scientific reports*, 9(1), 12445. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47447-3>
60. Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., & Moran, N. A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and environmental microbiology*, 80(23), 7378-7387. <https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14>
61. Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., & Ellis, J. D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792-1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
62. Requier, F., Odoux, J. F., Henry, M., & Bretagnolle, V. (2017). The carry-over effects of pollen shortage decrease the survival of honeybee colonies in farmlands. *Journal of applied ecology*, 54(4), 1161-1170. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12836>
63. Reyes-Quintana, M., Espinosa-Montaña, L. G., Prieto-Merlos, D., Koleoglu, G., Petukhova, T., Correa-Benítez, A., & Guzman-Novoa, E. (2019). Impact of *Varroa destructor* and deformed wing virus on emergence, cellular immunity, wing integrity and survivorship of Africanized honey bees in Mexico. *Journal of invertebrate pathology*, 164, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.009>
64. Riveros, G., Arismendi, N., Zapata, N., Evans, D., Pérez, I., Aldea, P., & Vargas, M. (2020). Occurrence, prevalence and viral load of deformed wing virus

- variants in *Apis mellifera* colonies in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 63-68. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1670993>
65. Ryabov, E. V., Childers, A. K., Lopez, D., Grubbs, K., Posada-Florez, F., Weaver, D., Girtten, W., Chen, Y., & Evans, J. D. (2019). Dynamic evolution in the key honey bee pathogen deformed wing virus: Novel insights into virulence and competition using reverse genetics. *PLoS biology*, 17(10), e3000502. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000502>
 66. Sheldon, M., Klyza, J., & Zimeri, A. M. (2019). Pesticide Contamination in Central Kentucky Urban Honey. *Journal of Environmental Health*, 82(1), 8-13.
 67. Silva, D., Ceballos, R., Arismendi, N., Dalmon, A., & Vargas, M. (2021). Variant A of the Deformed Wings Virus Alters the Olfactory Sensitivity and the Expression of Odorant Binding Proteins on Antennas of *Apis mellifera*. *Insects*, 12(10), 895. <https://doi.org/10.3390/insects12100895>
 68. Stamets, P. E., Naeger, N. L., Evans, J. D., Han, J. O., Hopkins, B. K., Lopez, D., Moershel, H. M., Nally, R., Sumerlin, D., & Taylor, A. W. (2018). Extracts of polypore mushroom mycelia reduce viruses in honey bees. *Scientific reports*, 8(1), 13936. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32194-8>
 69. Tejerina, M. R., Benítez-Ahrendts, M. R., & Audisio, M. C. (2020). *Lactobacillus salivarius* A3iob reduces the incidence of *Varroa destructor* and *Nosema* spp. in commercial apiaries located in the northwest of Argentina. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 1360-1369. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09638-7>
 70. Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A., Chantawannakul, P., & McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends in parasitology*, 36(7), 592-606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
 71. Valles, S., Chen, Y., Firth, A., Guérin, D., Hashimoto, Y., Herrero, S., De Miranda, J., Ryabov, E., & Consortium, I. R. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Iflaviridae. *The Journal of general virology*, 98(4), 527. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000757>
 72. Wu, Q., Patočka, J., & Kuča, K. (2018). Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins*, 10(11), 461. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>
 73. Wu, Y., Dong, X., & Kadowaki, T. (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 in Microbiology*, 8, 1558. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01558>
 74. Yang, X., & Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and

- viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7470-7475. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>
75. Yañez, O., Piot, N., Dalmon, A., De Miranda, J. R., Chantawannakul, P., Panziera, D., Amiri, E., Smagghe, G., Schroeder, D., & Chejanovsky, N. (2020). Bee viruses: Routes of infection in Hymenoptera. *Frontiers in Microbiology*, 11, 943. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00943>
 76. 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(12), 3419-3424. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81401-0>
 77. Zanni, V., Frizzera, D., Marroni, F., Seffin, E., Annoscia, D., & Nazzi, F. (2023). Age-related response to mite parasitization and viral infection in the honey bee suggests a trade-off between growth and immunity. *PloS one*, 18(7), e0288821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288821>
 78. Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C., & Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(18), 4775-4780. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701819114>
 79. Zheng, H., Steele, M. I., Leonard, S. P., Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2018). Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Anim (NY)*, 47(11), 317-325. <https://doi.org/10.1038/s41684-018-0173-x>
 80. Zhu, Y.-C., Yao, J., & Wang, Y. (2022). *Varroa* mite and deformed wing virus infestations interactively make honey bees (*Apis mellifera*) more susceptible to insecticides. *Environmental Pollution*, 292, 118212. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118212>