

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



EFFECTO DE LA VARIANTE A DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES OBPs Y NEURONALES EN NODRIZAS
DE APIS MELLIFERA

POR

CAMILA PAZ ELGUETA ALARCÓN

MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE
CONCEPCIÓN PARA OPTAR AL
TÍTULO DE INGENIERA
AGRÓNOMA.

CHILLÁN – CHILE
2024

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**EFFECTO DE LA VARIANTE A DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES OBPs Y NEURONALES EN NODRIZAS
DE *APIS MELLIFERA***

POR

CAMILA PAZ ELGUETA ALARCÓN

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE
CONCEPCIÓN PARA OPTAR AL
TÍTULO DE INGENIERA
AGRÓNOMA.**

**CHILLÁN – CHILE
2024**

Aprobada por:

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

Guía

Profesor. Diego Silva V.
Ing. en Biotecnología Vegetal. M. Sc.

Asesor

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

Asesor

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

Decano

RECONOCIMIENTOS

Estudio financiado por el proyecto FONDECYT N°1211688, ANID, Chile.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	5
Resultados y Discusión	9
Conclusiones	17
Referencias	18

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Carga viral en las antenas de <i>A. mellifera</i>	10
Figura 2 Expresión relativa del gen <i>AmelOBP5</i> en antena de <i>A. mellifera</i>	11
Figura 3 Expresión relativa del gen <i>AmelOBP11</i> en antena de <i>A. mellifera</i>	12
Figura 4 Carga viral en el cerebro de <i>A. mellifera</i>	14
Figura 5 Expresión relativa del gen <i>AmNrx-1</i> en cerebro de <i>A. mellifera</i>	15
Figura 6 Expresión relativa del gen <i>AmNlg-1</i> en cerebro de <i>A. mellifera</i>	16
Tabla 1 Tratamientos utilizados en el ensayo.....	7
Tabla 2 Secuencia de partidores para análisis de cuantificación génica y cuantificación de carga viral.....	9

EFFECTO DE LA VARIANTE A DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES OBPs Y NEURONALES EN NODRIZAS DE *APIS MELLIFERA*.

EFFECT OF VARIANT A OF THE DEFORMED WING VIRUS ON THE EXPRESSION OF GENES OBPs AND NEURAL IN NURSE OF *APIS MELLIFERA*.

Palabras índice adicionales: Abejas melíferas, DWV-A, OBP, sistema olfativo.

RESUMEN

Apis mellifera, tiene un sentido del olfato muy desarrollado, que le permite el reconocimiento de distintos aromas presentes en el ambiente y está coordinado principalmente por proteínas de unión a odorantes (OBP). El sistema sensorial y/o respuestas conductuales comunes en las abejas pueden verse afectados por patógenos y virus, como lo es en el caso del virus de las alas deformadas (DWV-A), provocando alteraciones en la cohesión interna de las colmenas. El objetivo de este estudio fue determinar la expresión génica de los genes OBPs y genes neuronales de nodrizas de *Apis mellifera* durante su desarrollo fisiológico en el tiempo. Se realizaron bioensayos correspondientes a abejas inoculadas con virus (DWV-A) y sin inocular, donde ambos tratamientos constaban con abejas expuestas a la feromona (alcohol bencílico), abejas expuestas a etanol y abejas sin exposición. Se demostró que ante la presencia del virus DWV-A, la expresión de los genes tanto OBPs como los genes neuronales disminuyen su expresión. Se observó una regulación de la expresión génica asociada a las OBP en función de la presencia de los componentes de la feromona de alarma de larvas; así mismo, la regulación de los genes neuronales no se vio alterada por la presencia de estos compuestos, sino más bien su regulación se debió a la presencia del patógeno.

SUMMARY

Apis mellifera, has a highly developed sense of smell, this is based on the recognition of different aromas that perceive in the environment and is coordinated mainly by odorant binding proteins (OBP). The sensory system and/or behavioral responses common in bees can be affected by pathogens and

viruses, as is the case with deformed wing virus (DWV-A), which causes alterations in the internal cohesion of the hives. Precisely the objective of this study was to determine the gene expression of OBPs genes and neuronal genes of wet nurses of *Apis mellifera* during their physiological development over time. For this purpose, bioassays were performed for bees inoculated with viruses (DWV-A) and bees without inoculating with viruses, where both treatments consisted of bees exposed to pheromone (benzyl alcohol), bees exposed to ethanol and bees without exposure. Where it is shown that in the presence of the DWV-A virus, the expression of both OBPs and neuronal genes decrease their expression. Additionally, a regulation of gene expression associated with OBP was observed according to the presence of the components of the larval alarm pheromone, moreover, the regulation of neuronal genes was not altered by the presence of these compounds, but rather its regulation was due to the presence of the pathogen.

INTRODUCCIÓN

El género *Apis*, que comprende diversas especies de abejas, pertenece al orden de los himenópteros, que incluye insectos sociales entre los más relevantes se encuentra *Apis mellifera* L. (Ravazzi, 2016). Su cuerpo es pequeño y peludo, se encuentra dividido en tres partes, cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza poseen los órganos sensoriales que les permiten percibir lo que sucede a su alrededor, además a través de los grandes ojos compuestos, pueden orientar sus vuelos y distinguir los colores de las flores. En las antenas poseen los sentidos del olfato y el tacto, imprescindibles cuando se encuentran en la oscuridad de la colmena. Adicionalmente por la percepción del aroma pueden reconocer a sus compañeras y detectar también a sus enemigos (Amaya, 2009).

Las abejas son uno de los insectos polinizadores más importantes, ya que cuando se posan sobre una flor, su cuerpo queda recubierto de polen y al realizar el vuelo hacia la siguiente flor, una parte del polen se desprende, polinizando así la planta (García *et al.*, 2016).

En este sentido, cuando se instalan colmenas artificiales cerca de los cultivos para favorecer la fecundación, se contribuye a una cosecha más abundante y de calidad (Garratt *et al.*, 2016). Otra importancia de las abejas es la fabricación de

miel, la cual realizan a través de la transformación del néctar; esta transformación se inicia cuando la abeja recolectora lo transporta en el buche, y una vez que está en la colmena, se lo pasan de unas abejas a otras, por lo que el néctar se mezcla con la saliva y pierde agua, transformándose finalmente en miel (Vit, 2004).

Las abejas son insectos sociales, esto significa que viven en una comunidad donde cada abeja desempeña una función determinada, imprescindible para la supervivencia de la colonia. La reina es fundamental para la vida de la colonia, ya que una abeja reina sana, joven y fuerte que ponga los huevos a buen ritmo permite un recambio constante de abejas y un pleno desarrollo del enjambre. Por otra parte, las abejas nodrizas cuidan de las larvas; unas 10 ó 12 larvas jóvenes, o bien de seis u ocho adultas que exigen mayor cantidad de comida (Nates-Parra, 2011). Para identificar y ubicar a las larvas, las nodrizas se basan en la percepción de ciertas fragancias y aromas que son emitidos por estas, por ejemplo, los compuestos volátiles como el alcohol bencílico (Castro *et al.*, 2008). La percepción de estos compuestos, así como otros volátiles del ambiente está determinada por la percepción olfativa, la cual evalúa la capacidad de respuesta sensorial. Por tanto, es el sistema olfativo uno de los principales en coordinar las conductas de los insectos (Scheiner *et al.*, 2013).

Adicionalmente, el sistema olfativo ubicado principalmente en la sensila de las antenas juega un papel crucial para los insectos, coordinando comportamientos como buscar y reconocer fuentes de alimento, identificar y evitar depredadores y seleccionar pareja (Galizia y Szyszka, 2008). Además, para los insectos sociales, como las abejas, el sistema olfativo es esencial en la coordinación de eventos sociales, el manejo de la colmena, el mantenimiento de la cohesión interna a través de la percepción de feromonas y los comportamientos relacionados con la defensa (Crespi y Yanega, 1995; Denison y Raymond-Delpech, 2008; Sandoz, 2011)

Se ha establecido que el notable poder olfativo de las especies de insectos se genera mediante una acción combinatoria de dos grandes familias de proteínas, los receptores olfativos (OR) acoplados a proteínas G y las proteínas de unión a olores (OBP), donde estas últimas se encuentran en la sensila olfatoria y transportan moléculas hidrofóbicas en el aire (Foret y Maleszka, 2006).

En los últimos años las poblaciones de abejas se han visto mermadas por

diversos factores entre los cuales el más relevante es el virus de las alas deformadas (DWV), del cual hasta la fecha se han identificado tres variantes con importancia epidemiológica (A, B y C), dentro de estos A y B se encuentran asociados con pérdidas invernales de colonias en Europa (Mordecai *et al.*, 2016). Este virus causa malformaciones físicas y alteraciones del comportamiento, además, se puede encontrar en la antena afectando la integridad anatómica de las áreas infectadas y se demostró que altera el funcionamiento normal de las antenas asociado a la percepción del aroma (Silva *et al.*, 2021).

Además de afectar el olfato de las abejas, este virus afecta la memoria de estas, ya que según estudios realizados por Shah *et al.* (2009) se demuestra que en abejas infectadas por DWV, donde el virus se replica en regiones críticas del cerebro, incluidos los neuropilos responsables de la visión y el olfato, la infección del cerebro afectaría negativamente las funciones sensoriales y alteraría el comportamiento normal de las abejas. Adicionalmente, se ha demostrado que la infección por el ácaro *Varroa destructor* genera aumentos en las cargas virales de DWV-A (De Miranda y Genersch, 2010) y la infección conjunta de estos patógenos genera alteración en genes responsables del aprendizaje y la memoria, como lo son los genes de neurexina presináptica (*AmNrx-1*) y neurologina postsináptica (*AmNlg-1*) (Morfin *et al.*, 2020). Sin embargo, la disminución de la expresión de estos genes se ha observado solo en la interacción de estos patógenos, sin determinar si el virus por sí solo es capaz de alterar la expresión de los genes neurexina y neurologina y cómo estos se ven afectadas en el tiempo y en el desarrollo de las abejas.

Adicionalmente, en estudios realizados por Silva *et al.* (2021) se demostró que las OBP 2, 5, 11 y 12 disminuyen su expresión génica en presencia de altas cargas de DWV en las antenas, esto podría comprometer la tarea de las nodrizas dado que, las OBP 5 y 11 están relacionadas con la percepción de compuestos de la feromona que emiten las larvas cuando requieren de ayuda o atención. Dado que, el olfato es responsable de las respuestas conductuales de los insectos, se ha establecido que la expresión de estos genes alcanza su máximo en los días 10 y 15, postulando que estos genes aumentan su expresión en función de la edad de las abejas nodrizas (Zhao *et al.*, 2015). No obstante, en los estudios realizados por Silva *et al.* (2021), no se observa un incremento de la expresión génica en función del tiempo.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del virus de las alas deformadas en la expresión de genes OBPs y genes neuronales en nodrizas de *Apis mellifera* durante su desarrollo fisiológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del inóculo

Se obtuvo un aislado de la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A) de colonias infectadas. 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 un homogeneizador stomacher 80 (Seward, Londres, Reino Unido).

Las muestras se centrifugaron a 1,500 g durante diez 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 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, de acuerdo con Vargas *et al.* (2017).

Inoculación de abejas

Los ejemplares de *A. mellifera* adultas fueron suministrados por el apiario experimental ubicado en el centro experimental "El Nogal" (36 ° 35'58.25 " S - 72 ° 04'51.77 " W), Universidad de Concepción, Chillán, Chile. Se realizó un análisis sanitario del apiario completo, seleccionando a la colmena dadora de individuos con la menor carga viral, dado que no se encontró ninguna que estuviera libre del virus. Luego los marcos de cría se mantuvieron en condiciones controladas en una sala de cría (30 ° C ± 1; 60 % ± 3 HR). Posteriormente, las abejas recién emergidas (24 h de edad) fueron cuidadosamente recolectadas y confinadas al azar en jaulas de plástico.

Luego se establecieron inicialmente dos grupos de abejas, definidos por la condición sanitaria de estas. Un grupo de abejas inoculadas (tratamiento I-DWV) oralmente con 5 µL de una suspensión viral (1.0×10^9 número de copias por abeja) en una solución de sacarosa al 50 %. Otro grupo de abejas no inoculadas con la suspensión viral (tratamiento N-DWV), como control. Luego, se dispusieron 80 abejas en jaulas de plástico (9 jaulas para cada condición

sanitaria de las abejas), a las que se les entregó 3 g de torta proteica comercial (sustituto de polen) y jarabe de sacarosa 60 % *ad libitum*.

Preparación de estímulo

Se utilizó como estímulo una mezcla de estándar químico de alcohol bencílico (Sigma-Aldrich, grado HPLC) diluido en etanol puro. Para ello se tomó una alícuota del estándar y se diluyó en etanol (solvente), llevando a concentración de 10 mg mL⁻¹.

Bioensayo

Luego de 24h post inoculación con la suspensión viral (abejas de 48h) se prepararon tres tratamientos, para cada uno de los grupos de abejas antes explicado, grupo I-DWV y N-DWV. Los tratamientos fueron: abejas expuestas al componente de feromona alcohol bencílico, exposición a etanol puro y por último un tratamiento sin exposición, como control. El detalle se desglosa en la Tabla 1.

Para los tratamientos que consideraron la exposición al componente de la feromona, se tomaron 20 µL de la solución antes preparada y se aplicaron sobre una tórula de algodón, luego se dejó reposar por tres segundos a temperatura ambiente para asegurar la evaporación del solvente. Posteriormente, la tórula fue añadida en la parte superior de la jaula para asegurar la exposición del compuesto a las abejas del interior. Esta misma metodología fue utilizada para aquellos tratamientos que consideran la exposición de las abejas al solvente. Para el tratamiento control que no contempla aplicación de compuesto o solvente, se añadió solo la tórula. Se establecieron tres repeticiones para cada tratamiento.

Todas las jaulas fueron agrupadas dependiendo de la exposición realizada (tratamiento con etanol, componente de feromona y sin exposición); además, cada grupo fue dispuesto en una cámara de incubación totalmente aislada, esto para evitar contaminación por volatilización entre los tratamientos. Posteriormente, cada tres días post exposición fueron colectadas cinco abejas para cada repetición y su respectivo tratamiento. Luego de la recolección fueron almacenadas a temperatura de -80 ° C con la finalidad de realizar los respectivos análisis posteriores.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el ensayo.

Abejas inoculadas con virus (DWV-A)	Abejas sin inocular con virus
Abejas expuestas a etanol (VEt)	Abejas expuestas a etanol (SVEt)
Abejas expuestas a feromonas (VF)	Abejas expuestas a feromonas (SVF)
Abejas sin exposición (VSF)	Abejas sin exposición (SVSF)

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para la cuantificación de la carga viral (DWV-A) y la expresión de los genes neuronales, *AmNrx-1* y *AmNlg-1* y los genes codificantes para OBPs, *AmelObp5* y *AmelObp11*, se extrajo ARN desde muestras de cinco abejas colectadas en cada punto de muestreo. Adicionalmente, las abejas fueron diseccionadas y agrupadas, en: cuerpo, cabeza y antenas. Por otra parte, la extracción de ARN desde el cuerpo de las abejas se realizó según lo descrito por Silva *et al.* (2021). En resumen, cada cuerpo de abeja (sin antena ni cabeza) fue macerado en una solución tampón salina PBS, se colectaron 200 μ L del macerado y se utilizaron para la extracción de ARN. En tanto para la extracción de ARN desde cabeza y antena este se realizó según lo descrito por Kim *et al.* (2019) y Mondet *et al.* (2015), con modificaciones. En resumen, tanto las cabezas como las antenas se enfriaron a -80°C y luego se molieron agregando 500 μ L de TrizolTM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y 5 μ L de Carrier RNA según recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Al homogeneizado se le añadió etanol absoluto (100 %) y 100 μ L de cloroformo, luego fue incubado a 4°C por 10 min. Luego fue centrifugado durante 15 min a $10.000 \times g$ a 4°C y, finalmente, se recolectó el sobrenadante para la extracción de ARN. La extracción del ARN, de todos los órganos macerados, 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 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.

Cuantificación de la carga viral y 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 2). La reacción de qPCR se llevó a cabo utilizando 1x de KAPA SYBR FAST Universal 2x qPCR Máster 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 filtrado estéril para alcanzar los 15 µL.

Las condiciones de reacción térmica que se utilizaron fueron de: 95 °C durante cinco minutos, 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 en cada segmento de las abejas (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.). 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.

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 y 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.

Tabla 2. Secuencia de partidores para análisis de cuantificación génica y cuantificación de carga viral.

Nombre partidor	Secuencia	Referencia
<i>AmNrx-1</i>	F- CTGCTTCGAGCGACGACTAT	Morfin <i>et al.</i> (2020)
	R- ACGACCGGATGGATGATTGG	
<i>AmNlg1</i>	F- ATGTCGAGGATGCTGCGACTGGA	Biswas <i>et al.</i> (2008)
	R- CTACCTGTGCACTATCTCCTGTTGTA	
DWV-A	F-TATCTTCATTAAAGCCACCTGGAA	Yang y Cox-Foster. (2005)
	R- TTTCTTCATTAAGTGTGTCGTTGAT	
<i>AmelOBP5</i>	F- ATGCGGAAATCGTGCTTGCA	Li <i>et al.</i> (2015)
	R- TGCCATTACTCACGGGAAGA	
<i>AmelOBP11</i>	F- TGAGGATGTGCAAGCTACGGAA	Li <i>et al.</i> (2015)
	R- CACGGAGCAATAAACGCTATGG	
β -actina	F- ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	Yang y Cox-Foster. (2005)
	R- GACCCACCAATCCATACGGA	

Análisis estadístico

Diferencias estadísticas en las cargas virales en las abejas melíferas según (1) estado viral (abejas no inoculadas recolectadas de marcos que fueron detectados con un bajo nivel basal de DWV-A y los que fueron inoculados con DWV-A) y (2) las edades de las abejas (abejas melíferas de dos a veinte días de edad) se estimaron mediante ANOVA factorial. Luego se utilizó la prueba HSD Tukey ($p < 0,05$) para separar las medias entre los tratamientos. (Es decir, siguiendo los análisis realizados por Silva *et al.* (2021).

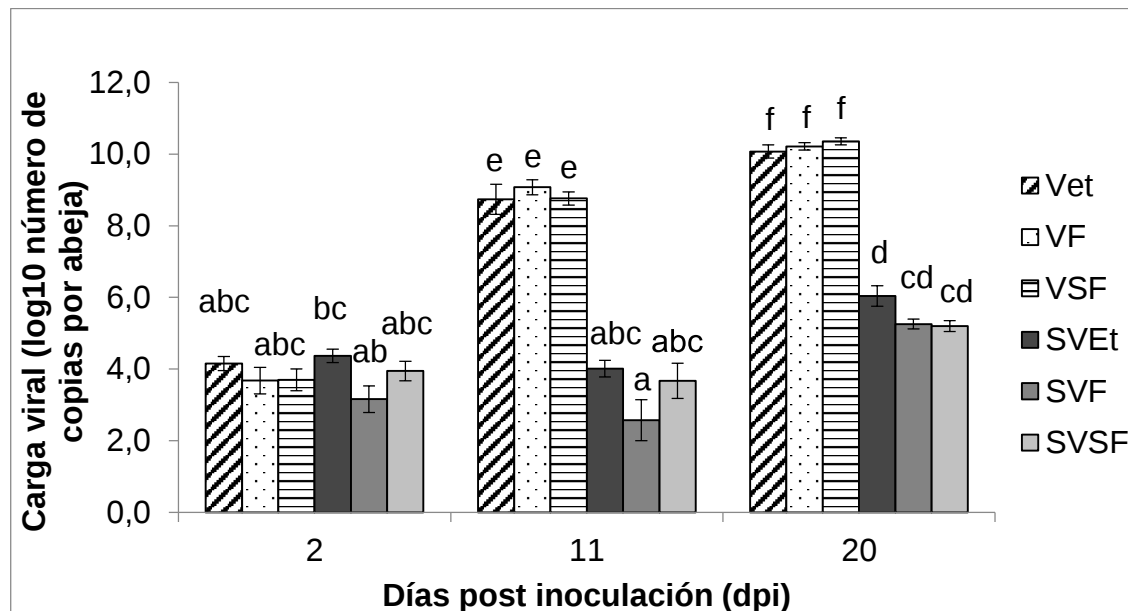
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de la carga viral y la expresión de genes OBP en la antena de *Apis mellifera*

El análisis de la cuantificación de la carga viral en las antenas demostró que en todas aquellas abejas que fueron inoculadas con la suspensión viral se observó un incremento en la carga viral en el tiempo (Figura 1). En promedio, al término del ensayo (abejas de 20 días), se registró un aumento de la carga viral del 71

% para abejas inoculadas (1×10^{11} número de copias genómicas por abeja), en comparación a aquellas abejas que no fueron inoculadas (1×10^6 número de copias genómicas por abeja; Figura 1).

Figura 1. Carga viral en las antenas de *A. mellifera*.



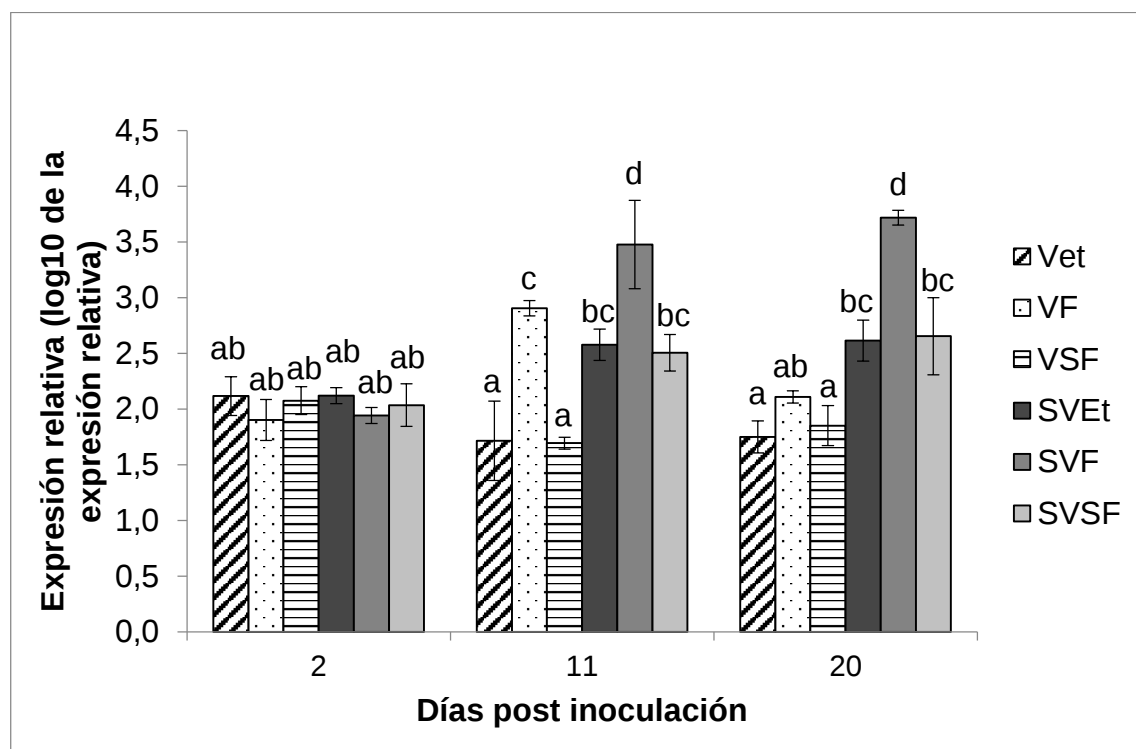
ANDEVA Factorial, interacción entre edad*condición $F = 41.44$; $df = 10, 88$; $p < 0.001$. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

VEt: Virus con etanol, VF: Virus con feromona (Alcohol bencílico), VSF: Virus sin feromona, SVet: Sin virus con etanol, SVF: Sin virus con feromona, SVSF: Sin virus, sin feromona.

Para el análisis de expresión génica del gen *AmelOBP5* no se observó diferencias significativas entre los tratamientos (tanto inoculados como no inoculados) al inicio del ensayo (abejas de dos días de edad), sin embargo, en abejas de 11 días de edad se observó que el tratamiento inoculado con la suspensión viral y expuesto al componente de la feromona (alcohol bencílico) fue significativamente mayor a los otros tratamientos inoculados con la suspensión viral (tratamiento inoculado y expuesto al solvente, y tratamiento inoculado sin exposición), aumentando la expresión del gen en un 47 % (Figura 2). No obstante, la expresión génica fue significativamente menor en comparación a abejas de la misma edad no inoculadas con la suspensión viral y expuestas al componente de feromona. Donde abejas expuestas al alcohol bencílico e inoculadas con DWV-A reportaron una reducción de expresión génica del 21 % respecto a abejas no inoculadas y expuestas al componente de feromona. Esta reducción de la expresión génica aumentó en abejas de 20 días de edad, donde en el tratamiento expuesto a la feromona e inoculado con DWV-

A se observó una reducción del 76 % respecto a abejas de la misma edad, expuestas al componente de feromona y no inoculadas con el virus (Figura 2).

Figura 2. Expresión relativa del gen *AmelOBP5* en antena de *A. mellifera*.



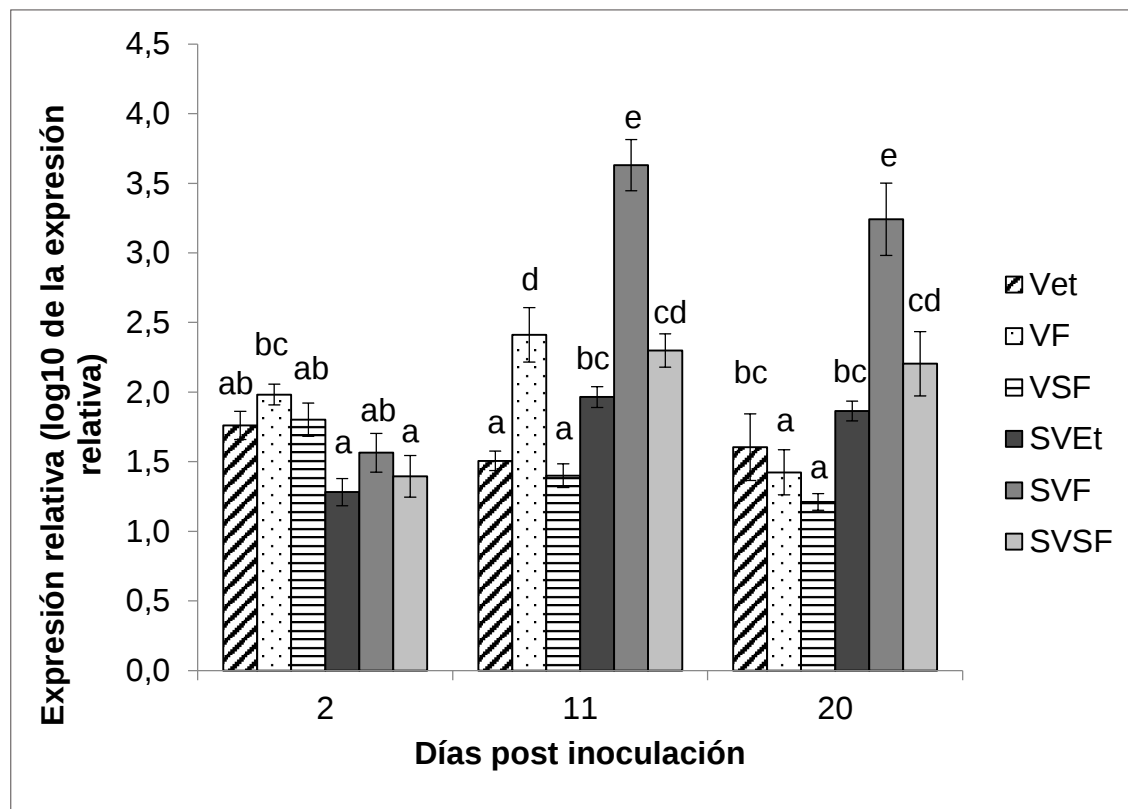
ANDEVA Factorial, interacción entre edad*condición $F = 4,85$; $df = 10,7,66$; $p < 0.001$. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Vet: Virus con etanol, VF: Virus con feromona (Alcohol bencílico), VSF: Virus sin feromona, SVet: Sin virus con etanol, SVF: Sin virus con feromona, SVSF: Sin virus, sin feromona.

Para el análisis de expresión génica del gen *AmelOBP11* no se observó diferencias significativas entre los tratamientos (tanto inoculados como no inoculados) al inicio del ensayo (abejas de 2 días de edad), sin embargo, en abejas de 11 días de edad observamos que el tratamiento inoculado con la suspensión viral y expuesto al componente de la feromona (alcohol bencílico) en promedio fue mayor a los otros tratamientos inoculados con el virus (tratamiento inoculado y expuesto al solvente, y tratamiento inoculado sin exposición), aumentando la expresión del gen en un 40 % (Figura 3). No obstante, la expresión génica fue significativamente menor en comparación con abejas de la misma edad, expuestas al componente de feromona y no inoculadas con la suspensión viral. Donde en abejas expuestas a la feromona e inoculadas con DWV-A se observó una reducción de expresión génica del 50 % respecto a abejas no inoculadas expuestas al componente de feromona. Esta reducción de

la expresión génica aumentó en abejas de 20 días de edad, donde en el tratamiento expuesto a la feromona e inoculado con DWV-A se observó una reducción del 129 % respecto a abejas de la misma edad, expuestas al componente de feromona y no inoculadas con el virus (Figura 3).

Figura 3. Expresión relativa del gen *AmelOBP11* en antena de *A. mellifera*



ANDEVA Factorial, interacción entre edad*condición $F = 12,87$; $df = 10,11$; $p < 0.001$. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Vet: Virus con etanol, VF: Virus con feromona (Alcohol bencílico), VSF: Virus sin feromona, SVet: Sin virus con etanol, SVF: Sin virus con feromona, SVSF: Sin virus, sin feromona.

El olfato permite a los animales percibir sustancias químicas volátiles del medio ambiente y, por lo tanto, es esencial para la detección y discriminación de recursos alimentarios, depredadores y congéneres en una diversa gama de taxones (Hansson, 1999; Mombaerts, 2004). Por tanto, una alteración en la expresión génica de proteínas responsables del funcionamiento fisiológico del olfato puede ocasionar también alteración en las respuestas conductuales asociadas a las abejas. Además, según Kopp *et al.* (2008) y Wang *et al.* (2011), algunos mecanismos moleculares como cambios en las tasas de expresión de genes involucrados en el olfato podrían conducir a cambios en la capacidad de percepción del olor de una especie. En efecto, en el presente estudio se observó

que cuando las abejas se encuentran infectadas con altas cargas del virus, disminuye la expresión de los genes OBP, lo que afectaría directamente el funcionamiento normal del olfato, pudiendo implicar alteración en el comportamiento y respuesta de las abejas nodrizas.

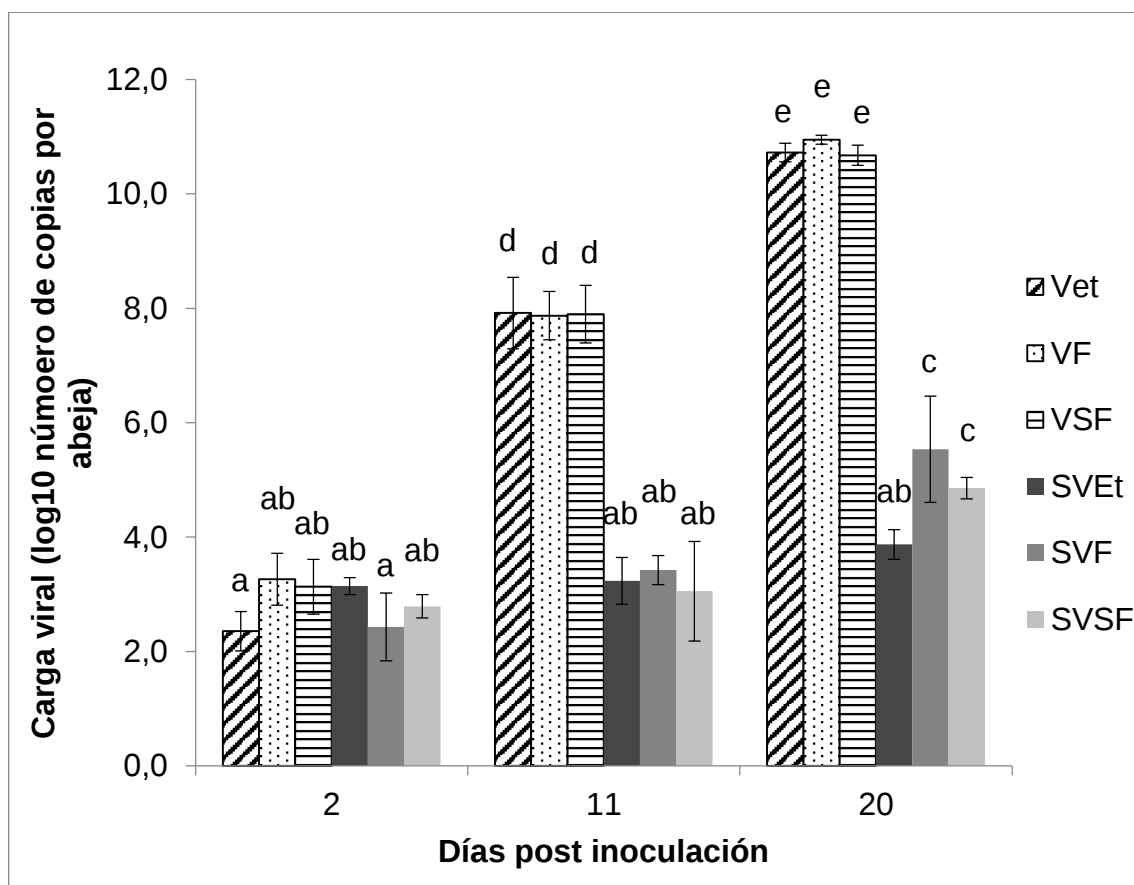
Kim *et al.* (2019) observaron una alteración en la ultraestructura celular de las antenas en abejas con clásicos síntomas (p. ej., alas deformadas) y cargas virales altas de DWV. En este sentido, existe la posibilidad de que este efecto negativo, es decir, la disminución de la expresión de los genes OBP sobre la respuesta olfativa pueda estar asociado con daño a estructuras especializadas en la antena. Por otra parte, en un estudio realizado por Zhao *et al.* (2013) demostró que la expresión del gen OBP5 en *A. mellifera* y en *A. cerana*, que codifica para la proteína *AmOBP5* y *AcOBP5*, respectivamente, tenían diferentes patrones de expresión temporal. El gen *AmOBP5* se expresó más significativamente en nodrizas de 10 y 15 días, asociado a que aquellas abejas provenían de campo, es decir, fueron extraídas directamente desde la colmena. Dicho lo anterior, y considerando que al interior de una colmena se volatilizan distintos estímulos como las feromonas de alarmas de larvas, se sustenta la teoría de que este aumento de expresión puede estar asociado a los compuestos que las larvas estén liberando en el contexto de una colmena funcional.

Zhao *et al.* (2013) demuestran que el componente de mayor afinidad para la OBP5 sería el alcohol bencílico, por lo tanto, la presencia del estímulo tendría una relación directa con el aumento de la expresión del gen, es decir, que responden en función del estímulo. Estos resultados apoyarían la teoría de que estos genes regulan las actividades de las nodrizas, ya que las nodrizas están principalmente desarrollándose entre el día siete y el día quince, que es donde se alcanza la mayor expresión del gen. No obstante, como se ha demostrado aun cuando se tiende a estimular la expresión del gen en presencia del compuesto de la feromona, la presencia del virus en altas concentraciones tiende a afectar la expresión normal de esta, lo que podría conducir a perjudicar la cohesión interna de la colmena en lo que compete al rol de conductas nodrizas de las abejas. En el presente estudio se demuestra que en abejas con bajas cargas virales (nivel basal), los niveles de expresión de este gen son altos en comparación a cuando las abejas se encuentran infectadas por el virus de las alas deformadas.

Análisis de la carga viral y la expresión de los genes *AmNrx-1* y *AmNlg-1* en el cerebro

En el análisis de cuantificación de la carga viral en el cerebro de las abejas no se observó diferencias significativas entre los tratamientos (tanto inoculados como no inoculados) al inicio del ensayo (abejas de dos días de edad). Sin embargo, en abejas que fueron inoculadas con la suspensión viral se observó un incremento en la carga viral, a los 11 y 20 días post inoculación (dpi). En promedio al término del ensayo (abejas de 20 días) se registró, un aumento de la carga viral del 97 % en las abejas inoculadas (1×10^{11} número de copias genómicas por abeja), en comparación a aquellas abejas que no fueron inoculadas (1×10^5 número de copias genómicas por abeja) (Figura 4).

Figura 4. Carga viral en el cerebro de *A. mellifera*.



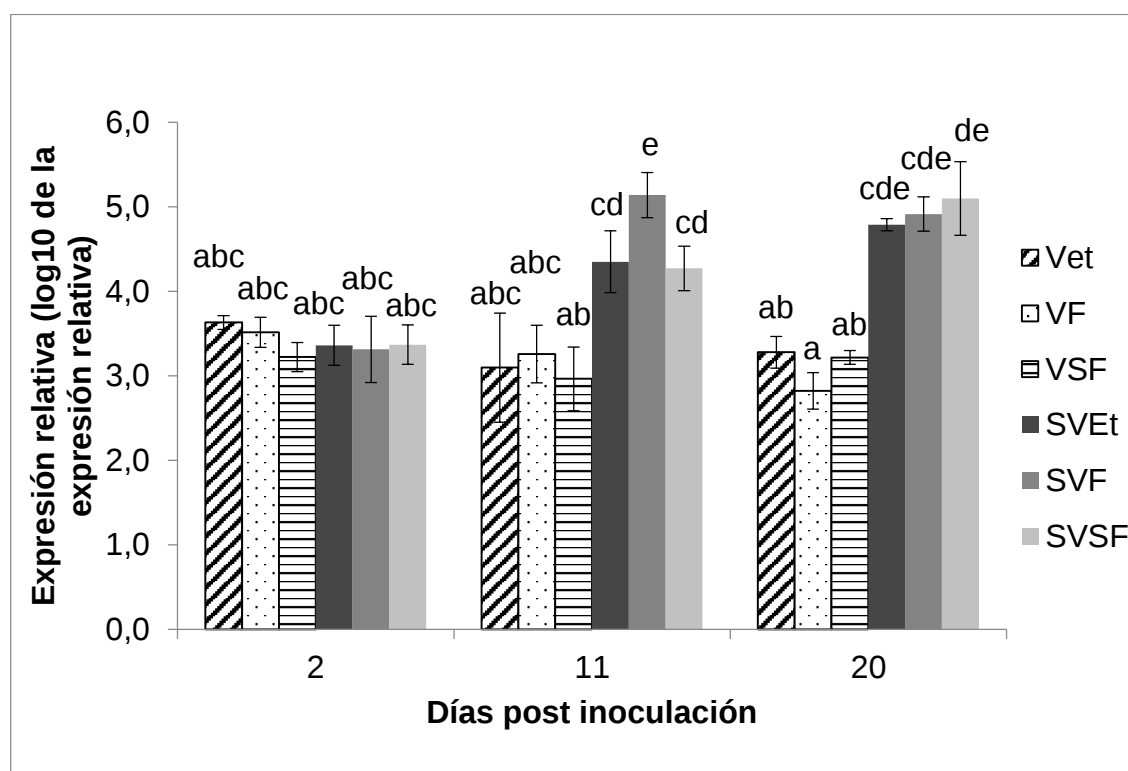
ANDEVA Factorial, interacción entre edad*condición $F = 41.44$; $df = 10, 88$; $p < 0.001$. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

VEt: Virus con etanol, VF: Virus con feromona (Alcohol bencílico), VSF: Virus sin feromona, SVet: Sin virus con etanol, SVF: Sin virus con feromona, SVSF: Sin virus, sin feromona.

Para la expresión relativa del gen neuronal *AmNrx-1* no se observó diferencias significativas entre los tratamientos (tanto inoculados como no

inoculados) al inicio del ensayo (abejas de 2 días de edad). No obstante, para el día 11 dpi se observó una reducción de la expresión génica de un 35 % cuando el tratamiento se encuentra inoculado con el virus y además expuesto a la feromona (alcohol bencílico) con respecto al tratamiento que no está inoculado, pero sí expuesto a la feromona (Figura 5). Para el día 20 dpi todos los tratamientos inoculados con el virus sufren una disminución de la expresión génica respecto de aquellas abejas no inoculadas (Figura 5).

Figura 5. Expresión relativa del gen *AmNrX-1* en cerebro de *A. mellifera*.



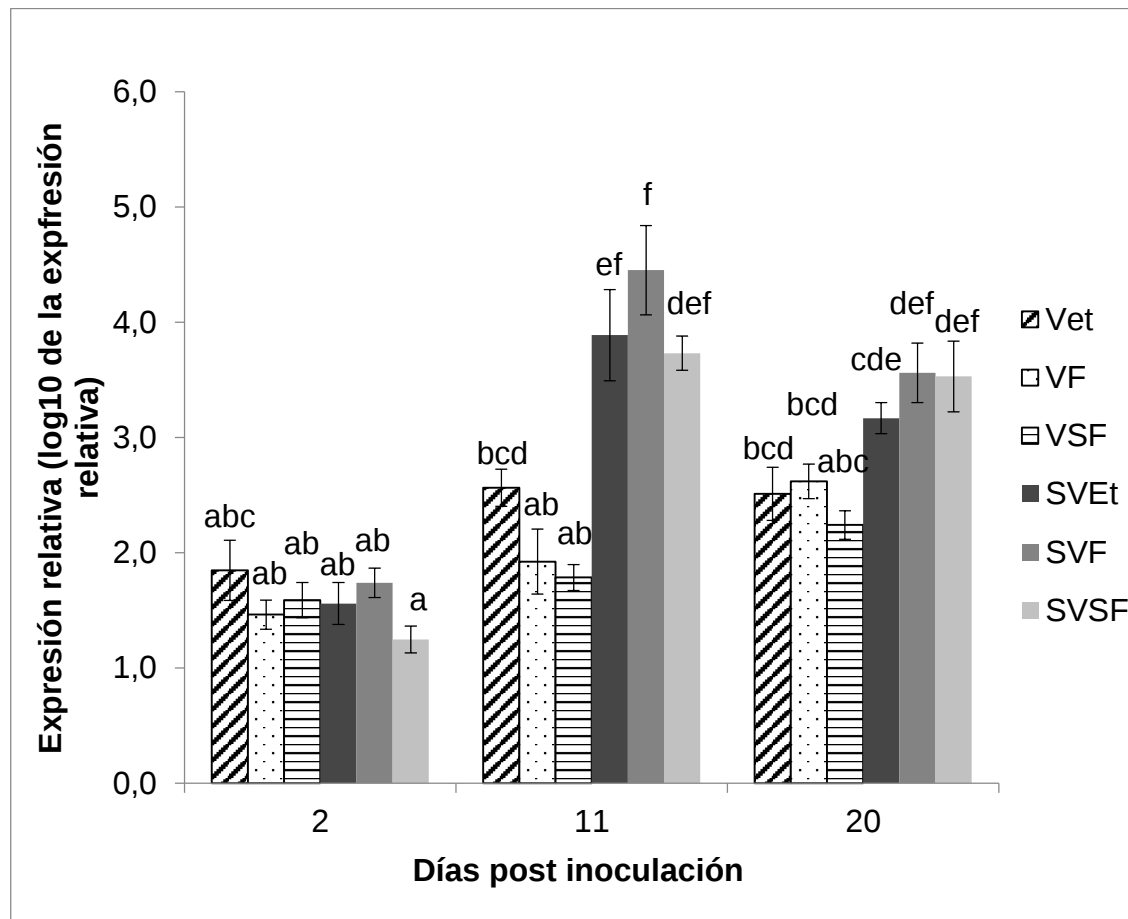
ANOVA Factorial, interacción entre edad*condición $F = 4,65$; $df = 10,12$; $p < 0.001$. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Vet: Virus con etanol, VF: Virus con feromona (Alcohol bencílico), VSF: Virus sin feromona, SVet: Sin virus con etanol, SVF: Sin virus con feromona, SVSF: Sin virus, sin feromona.

Para la expresión relativa del gen neuronal *AmNlg-1* no se observó diferencias significativas entre los tratamientos (tanto inoculados como no inoculados) al inicio del ensayo (abejas de 2 días de edad). Sin embargo, se observó al día 11 dpi una reducción de la expresión génica de un 57 % en el tratamiento inoculado con el virus y expuesto al componente de la feromona (alcohol bencílico), en comparación al tratamiento que no fue inoculado, pero sí expuesto al componente de la feromona (Figura 6). Además, para el día 20 dpi, en general no hubieron diferencias significativas entre los tratamientos, sólo la

menor expresión del gen se observó en aquellas abejas que fueron inoculadas, pero no expuestas al componente de la feromona, con respecto a los tratamientos no inoculados (Figura 6).

Figura 6. Expresión relativa del gen *AmNlg-1* en cerebro de *A. mellifera*.



ANOVA Factorial, interacción entre edad*condición $F = 7,75$; $df = 10,11$; $p < 0.001$. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

VEt: Virus con etanol, VF: Virus con feromona (Alcohol bencílico), VSF: Virus sin feromona, SVet: Sin virus con etanol, SVF: Sin virus con feromona, SVSF: Sin virus, sin feromona.

Adicionalmente, en un ensayo realizado por Lamp *et al.* (2016) usando inmunohistoquímica, demostraron que la variante DWV-A es capaz de replicarse en la cabeza, tórax y abdomen, esto se demostró mediante el uso del antígeno DWV-VP1 que permite encontrar partículas de la variante A replicando en distintos tejidos, estos específicamente fueron células oculares, sistema nervioso central y sistemas glandulares en la cabeza. Caso similar a lo que se reportó en las cabezas de las abejas donde se observa que las abejas inoculadas tienen un incremento de la carga viral en dicho tejido. Por lo tanto, se asumiría que el virus se encontraría replicándose en las células del sistema nervioso alojado en la

cabeza, lo que explicaría el aumento en la carga viral en el tiempo observada en el presente estudio.

Por otra parte, estos genes están involucrados en la respuesta y el aprendizaje asociativo de la abeja. En las abejas, la respuesta de extensión de la probóscide (PER), que es provocada por un estímulo apetitivo a las antenas o la probóscide, permite probar las capacidades sensoriales, formas de aprendizaje no asociativas y asociativas (Menzel y Müller, 1996). Algunos resultados muestran que la infección controlada de abejas recolectoras por DWV en el laboratorio, provoca deficiencias específicas en la capacidad de respuesta sensorial y el aprendizaje asociativo, mientras que el aprendizaje no asociativo permanece intacto (Iqbal y Mueller, 2007). Además, en este mismo ensayo demostraron que la PER en abejas infectadas tienden a responder de menor medida en comparación de las abejas sanas, esto porque también se ha descrito que tienen menos expresión de estos genes. No obstante, este es el primer estudio en donde se demuestra que el virus DWV-A reduce la expresión de los genes *AmNrx-1* y *AmNlg-1*. Por tanto, la reducción de estos genes es causada por la presencia y aumento de cargas virales de DWV y puede verse agudizada en presencia de *Varroa destructor*, esto también ocurre cuando el ácaro infecta a las abejas en conjunto con el virus y se desencadenan síntomas severos del virus, dado que el virus por sí solo es común que genere abejas asintomáticas pero portadoras de altas cargas virales (Tentcheva *et al.*, 2006)

En un estudio realizado por Traniello *et al.* (2020) identificaron firmas transcripcionales comunes de la infección por DWV-A en el cerebro de las abejas melíferas basándose en estudios de transcriptoma cerebral de individuos asintomáticos, presentando así el primer análisis neurogenómico del impacto molecular conservado de la infección por DWV-A, donde los resultados, que se debieron a la infección exclusivamente con DWV tipo A, indican fuertes efectos en la expresión genética del cerebro de las abejas melíferas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, es decir, la disminución de la expresión de los genes neuronales cuando las abejas presentan altas cargas del DWV-A y son expuestas a los distintos estímulos, como lo son el alcohol bencílico y etanol a través de su desarrollo fisiológico.

CONCLUSIONES

1. La expresión de los genes *AmelOBP5* y *AmelOBP11* codificantes para las OBPs 5 y 11 respectivamente, es regulado por la presencia del componente de feromona de larvas alcohol bencílico.
2. La expresión de los genes *AmelOBP5* y *AmelOBP11* en abejas melíferas es afectada por altas cargas virales de la variante A del virus de las alas deformadas.
3. La regulación génica de los genes presináptico *AmNrx-1* y post sináptico *AmNlg-1* es afectado por altas cargas virales de la variante A del virus de las alas deformadas.

REFERENCIAS

1. Amaya Márquez, M. 2009. Memoria y aprendizaje en la escogencia floral de las abejas. *Acta Biológica Colombiana*, 14(2): 125-136.
2. Biswas, S., R. Russell., J. Colin., M. Vidovic., O. Ganeshina., J. Oakeshott and C. Claudianos. 2008. Bridging the Synaptic Gap: Neuroligins and Neurexin I in *Apis mellifera*. *PloS one*. 3. e3542. 10.1371/journal.pone.0003542.
3. Castro, L., M.C. Díaz., M.A. González., E. de la Fuente and M.S. Pérez. 2008. Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of citrus honey. *J. Agric. Food Chem.* 26;56(6): 1999-2006.
4. Crespi, B.J. and D. Yanega. 1995. The definition of eusociality. *Behav. Ecol.* 6: 109–115.
5. De Miranda, J. and E. Genersch, Deformed wing virus. *J. Invertebr. Pathol.* 2010 Jan;103 Suppl 1: S48-61. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.012. Epub 2009 Nov 11. PMID: 19909976.
6. Denison, R. and V. Raymond. 2008. Insights into the molecular basis of social behaviour from studies on the honeybee, *Apis mellifera*. *Invert. Neurosci.* 8: 1–9.
7. Foret, S. and R. Maleszka. 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honeybee (*Apis mellifera*). *Genoma Res*, 2006. 16: 1404-1413.
8. Galizia, C.G. and P. Szyszka. 2008. Olfactory coding in the insect brain: molecular receptive ranges, spatial and temporal coding. *Entomol. Exp. Appl.* 128: 81–92.
9. García, M., L. Ríos and J. Álvarez. 2016. Pollination in agricultural systems: a systematic literature review. *Idesia (Arica)*, 34(3): 53-68.

10. Garratt, MP., T.D. Breeze., V. Boreux., M.T. Fountain., M. McKerchar., S.M. Webber., D.J. Coston., N. Jenner., R. Dean., D.B. Westbury., J.C. Biesmeijer and S.G. Potts. 2016. Apple Pollination: Demand Depends on Variety and Supply Depends on Pollinator Identity. PLoS One. 2016 May 6;11(5): e0153889. doi: 10.1371/journal.pone.0153889. PMID: 27152628; PMCID: PMC4859530.
11. Hansson, B.S. 1999. Insect Olfaction. Heidelberg: Springer Verlag.
12. Iqbal, J. and U. Mueller. 2007. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers Proc. R. Soc. B.2741517–1521 <http://doi.org/10.1098/rspb.2007.0022>
13. Kim, S.H., A. Mercer., A. Mitchell., J. de Miranda., V. Ward., F. Mondet and M. Bostina. 2019. Viral infections alter antennal epithelium ultrastructure in honeybees. J. Invertebr. Pathol. 168, 107252.
14. Kopp, A., O. Barmina., A. Hamilton., L. Higgins., L. McIntyre and C. Jones. 2008. Evolution of gene expression in the Drosophila olfactory system. Mol. Biol. Evol. 25: 1081–1092.
15. Lamp, B., A. Url., K. Seitz., J. Eichhorn and C. Riedel. 2016. Construction and rescue of a molecular clone of deformed wing virus (DWV). PLOS ONE 11: e0164639.
16. Li, Q. and S. Liberles. 2015. Aversion and attraction through olfaction. Curr. Biol. 25, R120–R129.
17. Menzel, R and U. Müller. 1996. Learning and memory in honeybees: from behaviour to neural substrates. Annu. Rev. Neurosci. 19: 379–404.
18. Mombaerts, P. 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. Nat. Rev. Neurosci. 5: 263–278.
19. 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 honeybees. Sci. Rep. 5, 10454.
20. Mordecai, G.J., L. Wilfert., S. Martin., I. Jones and D. Schroeder. 2016. Diversity in a honeybee pathogen: First report of a third master variant of the deformed Wing Virus quasispecies. ISME J. 10: 1264–1273.
21. Morfin, N., P.H. Goodwin and E. Guzman. 2020. The Combined Effects of Varroa destructor Parasitism and Exposure to Neonicotinoids Affects Honeybee (*Apis mellifera* L.) Memory and Gene Expression. Biology, 9(9):237. MDPI AG. Retrieved from
22. Nates Parra, G. 2011. Genética del comportamiento: Abejas como modelo. Acta Biol. Colomb. 16 (3): 213-230.

23. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2003–2007.
24. Ravazzi, G. 2016. *Las Abejas*. De Vecchi. USA.
25. Riveros, G., N. Arismendi., N. Zapata., D. Evans., I. Pérez., P. Aldea and M. Vargas. 2019. Occurrence, prevalence and viral load of deformed wing virus variants in *Apis mellifera* colonies in Chile. *J. Apic. Res.* 59: 63–68.
26. Sandoz, J.C. 2011. Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. *Front. Syst. Neurosci.* 5.
27. Scheiner, R., C. Abramson., R. Brodschneider., K. Crailsheim., W. Farina., S. Fuchs., B. Grünewald., S. Hahshold., M. Karrer., G. Koeniger., N. Koeniger., R. Menzel., S. Mujagic., G. Radspieler., T. Schmickl., C. Schneider., A. Siegel., M. Szopek and R. Thenius. 2013. Standard methods for behavioural studies of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52:4, 1-58.
28. Shah, K.S., E. Evans and M. Pizzorno. 2009. Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Virol. J.* 6: 182.
29. Silva, D., R. Ceballos., N. Arismendi., A. Dalmon and M. 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* 2021. 12:895.
30. Tentcheva, D., L. Gauthier., L. Bagny., J. Fievet., B. Dainat., F. Cousserans., M. Colin and M. Bergoin. 2006. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* 37 (1): 41-50.
31. Traniello, I.M., S. Bujari., J. Kevill., A. Ahmed., A. Hamilton., N. Naeger., D. Schroeder and G. Robinson. 2020. Meta-analysis of honeybee neurogenomic response links Deformed wing virus type A to precocious behavioral maturation. *Sci Rep* 10, 3101. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59808-4>
32. Vit, P. 2004. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.* 35(2): 32-39.
33. Wang, G., G. Vásquez., C. Schal., L. Zwiebel and F. Gould. 2011. Functional characterization of pheromone receptors in the tobacco budworm *Heliothis virescens*. *Insect Mol. Biol.* 20: 125–133.
34. Wu, Y., X. Dong and T. Kadowaki. 2017. Characterization of the copy number and variants of deformed wing virus (DWV) in the pairs of honeybee pupa

- and infesting *Varroa destructor* or *Tropilaelaps mercedesae*. *Front. Microbiol.* 8: 1558.
35. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 7470–7475.
36. Zhao, H., X. Zeng., Q. Liang., X. Zhang., W. Huang., H. Chen and Y. Luo. 2015. Study of the obp5 gene in *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Genet. Mol. Res.* 14: 6482–6494.
37. 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 cerana*. *Sociobiology.* 60: 429–435.