

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE TERPENOS DERIVADOS DEL POLEN Y SU
EFECTO SOBRE LA SOBREVIVENCIA EN *APIS MELLIFERA* INFECTADAS
CON EL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV-A)**

POR

FELIPE ALEJANDRO BECERRA MOLINA

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

**CHILLÁN – CHILE
2024**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE TERPENOS DERIVADOS DEL POLEN Y SU
EFECTO SOBRE LA SOBREVIVENCIA EN *APIS MELLIFERA* INFECTADAS
CON EL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV-A)**

POR

FELIPE ALEJANDRO BECERRA MOLINA

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

**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	17

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Distribución de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de las abejas en cada grupo experimental durante los 20 días post-inoculación viral	10
Figura 2 Carga viral del DWV-A en abejas suplementadas con terpenos	11
Figura 3 Nivel de expresión del gen malvolio en abejas infectadas con el DWV-A suplementadas con terpenos	12
Figura 4 Nivel de expresión del gen α - glucosidasa II en abejas infectadas con el DWV-A suplementadas con terpenos ...	13
Figura 5 Nivel de expresión del gen tioredoxina reductasa en abejas infectadas con el DWV-A suplementadas con terpenos.....	15
Figura 6 Nivel de expresión del gen catalasa en abejas infectadas con el DWV-A suplementadas con terpenos	16
Tabla 1 Lista de partidores para análisis de cuantificación génica y cuantificación de carga viral.....	9

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE TERPENOS DERIVADOS DEL POLEN Y SU EFECTO SOBRE LA SOBREVIVENCIA EN *APIS MELLIFERA* INFECTADAS CON EL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV-A)

ANTIVIRAL ACTIVITY OF TERPENES DERIVED FROM POLLEN AND THEIR EFFECT ON SURVIVAL IN *APIS MELLIFERA* INFECTED WITH DEFORMED WINGS VIRUS (DWV-A).

Palabras índice adicionales: abejas melíferas, metabolitos secundarios, genes de estrés.

RESUMEN

Para las abejas el polen y el néctar son la principal fuente de alimento, contienen diversos fitoquímicos como fenoles, alcaloides y terpenos. Se ha reportado que el consumo de diferentes terpenos influye en el metabolismo fisiológico de las abejas. Adicionalmente, estos presentan actividad antimicrobiana y antiviral. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes terpenos reportados en pólenes sobre la sobrevivencia y la actividad antiviral en abejas infectadas con el DWV-A. Abejas recién emergidas fueron inoculadas con el DWV-A y encerradas en jaulas. Luego cada 48 h y durante 24 h fueron alimentadas *ad libitum* con los terpenos limoneno, linalool, y 1-4 cineol, preparados en jarabe al 60 %, se incluyeron dos controles: (1) abejas inoculadas con el DWV-A (I-DWV-A), (2) abejas sin inocular (N-DWV-A). Se colectaron abejas para determinar la carga viral y la expresión de genes indicadores de estrés. Luego de 20 días las cargas virales disminuyeron en un 30 %, 37 % y 42 % en abejas alimentadas con limoneno, linalool, y 1,4 cineol, con un aumento en la sobrevivencia del 85 %, 80 % y 71 %, respectivamente. No se observaron cambios significativos de los diferentes genes indicadores de estrés. Por ende, los terpenos presentan actividad antiviral y estimulan la sobrevivencia en abejas infectadas con el DWV-A.

SUMMARY

For bees, pollen and nectar are the main source of food; they contain various phytochemicals such as phenols, alkaloids and terpenes. It has been reported that the consumption of different terpenes influences the physiological

metabolism of bees. Additionally, they present antimicrobial and antiviral activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of different terpenes reported in pollens on the survival and antiviral activity in bees infected with DWV-A. Newly emerged bees were inoculated with DWV-A and confined in cages. Then every 48 h and for 24 h they were fed *ad libitum* with the terpenes limonene, linalool, and 1-4 cineole, prepared in 60 % syrup, two controls were included; (1) bees inoculated with DWV-A (I-DWV-A), (2) bees without inoculation (N-DWV-A). Bees were collected to determine the viral load and the expression of stress indicator genes. After 20 days, viral loads decreased by 30 %, 37 %, and 42 % in bees fed limonene, linalool, and 1,4 cineole, with an increase in survival of 85 %, 80 %, and 71 %, respectively. No significant changes were observed in the different stress indicator genes. Therefore, terpenes present antiviral activity and stimulate survival in bees infected with DWV-A.

INTRODUCCIÓN

La abeja melífera occidental (*Apis mellifera* L.) es la especie polinizadora más frecuente en los cultivos en todo el mundo (Garibaldi *et al.*, 2013). Esta interacción planta-polinizador es fundamental para el éxito reproductivo y la producción de frutos de las plantas con flores (Papa *et al.*, 2022), puesto que el 80 % de los servicios de polinización agrícola mundial se le atribuyen a *A. mellifera* (Breeze *et al.*, 2011).

Sin embargo, los desafíos recientes a la salud de las abejas, incluidas las pérdidas drásticas atribuidas al desorden del colapso de colmenas (CCD) han disminuido las poblaciones de abejas en todo el mundo (Mattila *et al.*, 2012), debido a la repentina ausencia de abejas obreras de la colmena (Watson y Stallins, 2016).

Este fenómeno puede ser atribuido a variados factores de degradación ambiental, que incluyen el uso excesivo de pesticidas e insecticidas (Najib y Hassan, 2021), pérdidas de ecosistemas naturales así como la fragmentación de hábitats derivado de la transformación del uso de suelo para la expansión agrícola (Ochungo *et al.*, 2021). Adicionalmente, patógenos propios de la especie afectan la sanidad de las abejas melíferas, entre ellos; ácaros, microsporidios, hongos, bacterias y virus (Brutscher *et al.*, 2016; Hristov *et al.*, 2020). En la actualidad se han detectado alrededor de 72 virus en *A. mellifera*

(Beaurepaire *et al.*, 2020), siendo el virus de las alas deformadas (DWV) el más importante y frecuente a nivel mundial, con un promedio de 55 % de colmenas infectadas en 32 países (Martin y Brettell, 2019). Este patógeno pertenece al género *Iflavirus* (Lanzi *et al.*, 2006), con genoma de ARN monocatenario y de sentido positivo (Lamp *et al.*, 2016; Valles *et al.*, 2017).

El DWV por sí solo ocasiona infecciones asintomáticas en abejas, persistiendo en niveles bajos de infección (Beaurepaire *et al.*, 2020). Este virus puede propagarse de diversas formas, a través de rutas de transmisión horizontal entre individuos de la misma colmena, vertical de la reina al huevo, venérea durante el apareamiento y del medio ambiente en particular de los recursos alimentarios compartidos o trofalaxis. Sin embargo, puede causar síntomas severos cuando se transmite por el ácaro *Varroa destructor* (Britton y Jane White, 2021; Grozinger y Flenniken, 2019).

Se han reportado tres variantes maestras del DWV: DWV-A, DWV-B y DWV-C (Martin *et al.*, 2012; Mordecai *et al.*, 2016). En Chile solo se han detectado las variantes A y B, siendo la variante A la más prevalente, con un 71 % (Riveros *et al.*, 2020). Estas variantes pueden causar síntomas visibles caracterizados por las alas deformadas, abdomen hinchado, acortado y decolorado, asociados principalmente con el aumento de los niveles del DWV (Fievet *et al.*, 2006; Gusachenko *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 1998; Martin, 2001; Santillán-Galicia *et al.*, 2015; Yue y Genersch, 2005). Este virus ha sido sindicado como responsable de las altas pérdidas invernales de colmenas a nivel mundial (Woodford y Evans, 2020).

Por otra parte, las abejas melíferas cuentan con un sistema inmune innato con dos vías de defensas inmunológicas que incluye la inmunidad celular que está dada por la fagocitosis, melanización y la degradación enzimática de patógenos (Evans *et al.*, 2006) y la inmunidad humoral mediado por la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMPs) (Brutscher y Flenniken, 2015), que corresponden a pequeñas proteínas que son producidas y liberadas por la hemolinfa de la abeja en respuesta de las infecciones bacterianas, micóticas y virales (Larsen *et al.*, 2019).

Se ha observado que las infecciones virales provocan estrés oxidativo en las abejas (Łopieńska-Biernat *et al.*, 2017), al generar un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias celulares (Taric *et*

al., 2020), mediante la producción de radicales hidroxilo (-OH), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), responsables de alterar las macromoléculas (Sohal *et al.*, 2002; Storey, 1996). Para contrarrestar este efecto, las abejas cuentan con enzimas antioxidantes encargadas de eliminar los radicales libres como la catalasa (CAT), y la tioredoxina reductasa (TrxR) (Olgun *et al.*, 2020). Estas enzimas son fundamentales para proteger y prevenir el daño oxidativo de las células causado por los niveles elevados de las ROS (Mustacich y Powis, 2000; Aebi, 1984).

Adicionalmente, los patógenos que infectan a las abejas melíferas pueden modificar la expresión de genes que controlan la alimentación y la digestión (Holt *et al.*, 2013), alterando la búsqueda de alimento y el funcionamiento del sistema digestivo de las abejas, repercutiendo en sus necesidades nutricionales (Penn *et al.*, 2022; Ullah *et al.*, 2021).

Autores como Alaux *et al.* (2011) han investigado el impacto de los patógenos en la nutrigenómica de las abejas, donde han observado un aumento en la expresión del gen que codifica para la enzima malvolio (mvl) en abejas infestadas con *V. destructor*. Esta enzima es clave en el desarrollo fisiológico de las abejas nodrizas, cuando inician su maduración a pecoreadoras, ya que estimula la búsqueda de alimento, esencialmente la sacarosa (Ben-Shahar *et al.*, 2004).

Además, los autores Li *et al.* (2019) y Pizzorno *et al.* (2021), observaron que las abejas infectadas con *Nosema ceranae* y abejas infectadas con el DWV, presentaron una mayor expresión del gen que codifica para la enzima α -glucosidasa II. Esta enzima está presente en el intestino medio, y en las glándulas hipofaríngeas de las abejas, y tienen la capacidad de metabolizar la sacarosa presente en el néctar a fructosa y glucosa (Berenbaum y Calla, 2021).

Las abejas melíferas obtienen su alimento del polen y el néctar que recolectan de las flores, estos alimentos contienen diversos fitoquímicos que incluyen fenoles, alcaloides, y terpenos (Palmer-Young *et al.*, 2019). Se ha descrito que el consumo de diferentes terpenos influye en el metabolismo fisiológico de las abejas (Alaux *et al.*, 2010; Ament *et al.*, 2011), desarrollando tolerancia a diversos patógenos como virus (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010), bacterias (Rinderer *et al.*, 1974) y microsporidios (Rinderer y Dell Elliott, 1977).

Terpenos como el timol, linalool, y α -terpineol encontrados en el polen de Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) han demostrado tener un efecto inhibitorio frente a

la bacteria que ocasiona el loque europeo y actividad antiviral en abejas melíferas (Palmer-Young *et al.*, 2017; Wiese *et al.*, 2018). Además, se ha reportado que el consumo de limoneno tiene efecto antiviral en abejas infectadas con el virus de las alas deformadas (DWV-A) (Boncristiani *et al.*, 2021). Así mismo, el terpeno 1,4 cineol derivado del aceite esencial de la hoja del Eucalipto (*Eucalyptus glubulus* Labill), ha demostrado tener un efecto beneficioso en el tratamiento de virus de ARN y ADN en humanos (Mieres-Castro *et al.*, 2021).

De acuerdo con los antecedentes expuestos, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antiviral de los terpenos limoneno, linalool y 1,4 cineol y su efecto en la sobrevivencia, expresión de genes indicadores de estrés oxidativo y de regulación energética en *A. mellifera* inoculadas con el DWV-A.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de fitoquímicos

Los terpenos limoneno, linalool, y 1,4 cineol fueron obtenidos desde estándares comerciales (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

Preparación del inóculo DWV-A

Se colectaron abejas desde colmenas infectadas con la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A). Luego, se homogenizó un grupo de 20 abejas en una bolsa Stomacher con solución salina tamponada de fosfato (1x PBS) durante 90 s a alta velocidad en un homogeneizador Stomacher 80 Lab Blender (Seward, Londres, Reino Unido). Las muestras se centrifugaron a 1.500 x g durante 10 min, seguido de 10.000 x g durante 10 min, ambas a 4 °C. El sobrenadante se purificó por filtración con un filtro de 0,22 µm (PES, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

Para la extracción de ARN, la síntesis de ADNc y la cuantificación de la carga viral del inóculo, se utilizaron 200 µL del sobrenadante según metodología de Vargas *et al.* (2017). El inóculo restante se almacenó a - 80 °C para su posterior uso.

Inoculación de abejas

Se colectaron abejas en estado adulto de *A. mellifera* desde el apiario experimental ubicado en la Estación Experimental “El Nogal” (36 ° 35'58.25 " S – 72 ° 04'51.77 " O), Universidad de Concepción, Chillán, Chile. Se realizó un análisis sanitario del apiario identificando la carga viral de cada colmena (n= 54

colmenas). Luego se retiraron los marcos de cría de las colmenas con la menor carga viral (1.0×10^2 número de copias por abejas), dado que, no se detectaron colonias libres del DWV-A. Luego los marcos de cría se mantuvieron en condiciones controladas en una sala de cría ($30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$; $60 \text{ \%} \pm 3 \text{ HR}$). Posteriormente las abejas obreras recién emergidas (24 h de edad) se colectaron cuidadosamente desde los marcos de cría y se encerraron al azar en jaulas de plástico. Se establecieron inicialmente dos grupos, un grupo de abejas recién emergidas no inoculadas con la suspensión viral, consideradas como grupo control (N-DWV-A), en tanto, el segundo grupo incluyó abejas que fueron inoculadas oralmente con $5 \text{ }\mu\text{L}$ de una suspensión viral (1.0×10^9 número de copias por abeja), en una solución de sacarosa al 60 %, y fueron consideradas como grupo control (I-DWV-A). Las abejas que no consumieron la cantidad total del inóculo viral fueron descartadas del ensayo.

Suplementación con terpenos a abejas infectadas con el DWV-A

Para determinar la actividad antiviral de terpenos otorgados por ingesta a abejas infectadas con DWV-A y su impacto en la sobrevivencia, genes indicadores de estrés (catalasa y tioredoxina reductasa) y genes de regulación energética (α -glucosidasa II y malvolio), grupos de abejas fueron inoculadas con el DWV-A, como se describió previamente, y suplementadas *ad libitum* con los terpenos limoneno, linalool, y 1,4 cineol, en concentraciones de 16 ppm (Palmer-Young *et al.*, 2017) preparados en jarabe al 60 % p/v. Además, se incluyeron dos tratamientos sin terpenos, un control no inoculado (N-DWV-A) y otro control inoculado (I-DWV-A).

Para todos los tratamientos del ensayo, se establecieron cuatro repeticiones, con 70 individuos por repetición para el ensayo de sobrevivencia y 60 individuos por repetición en el ensayo de determinación de la actividad antiviral de los terpenos. Para el diseño del régimen alimenticio se siguió la metodología descrita por Pascual *et al.* (2022). En resumen, el suplemento de los terpenos consistió en primer lugar en una alimentación *ad libitum* por 24 h, seguido de 48 h con alimentación *ad libitum* con jarabe de azúcar, luego se repitió el ciclo a lo largo de toda la duración del ensayo (20 días). Así mismo se les suministró a todos los tratamientos 3 g de sustituto de polen cuya preparación comercial está compuesta por harina de soja (18 %), polen curbiculado (10 %), harina de maíz (6 %), trigo harina (6 %), almidón de patata (2 %), aceite de canola (0,2 %) y

sacarosa (57,8 %).

Para la evaluación de sobrevivencia, diariamente se registró el número de individuos muertos en cada repetición, de cada tratamiento, hasta la finalización del ensayo (20 días post inoculación viral). En tanto, para determinar la actividad antiviral se colectaron cinco abejas por repetición (jaulas), cada cinco días a partir del día de inoculación con el DWV-A. Finalmente, al grupo de abejas colectadas, además se les realizó un análisis molecular para determinar la expresión de genes indicadores de estrés y de regulación energética.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se extrajo el ARN total de cinco abejas colectadas en cada punto de muestreo. Para esto, las abejas se molieron completamente en una solución salina tamponada con PBS (5 mL) y se extrajeron 200 μ L del macerado para la extracción de ARN. La extracción del ARN se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por E.Z.N.A. Kit de ARN total I (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, EE. UU.).

La calidad y el rendimiento del ARN se determinaron en un 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.

PCR en tiempo real (qPCR)

Para determinar la actividad antiviral de terpenos otorgados por ingesta a abejas infectadas con DWV-A y genes indicadores de estrés (catalasa y tioredoxina reductasa) y genes de regulación energética (α - glucosidasa II y malvolio), se utilizaron cebadores específicos (Tabla 1).

La reacción de qPCR se llevó a cabo utilizando 1x de KAPA SYBR FAST Universal 2x qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se agregaron 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 térmicas de reacción fueron un ciclo a 96 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 60 °C por 15 s y 72 °C durante 30 s. Las

reacciones de qPCR se realizaron en un termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y los datos se analizarán 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). Adicionalmente para determinar la carga viral se analizó 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.

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 infectado (N-DWV-A) e infectado (I-DWV-A).

Diferencias estadísticas en las cargas virales en las abejas melíferas según (1) estado viral: abejas no inoculadas (N-DWV-A) y abejas inoculadas con el DWV-A (I-DWV-A), (2) edades de las abejas, se estimaron mediante ANOVA factorial. Luego se utilizó la prueba HSD de Tukey ($p < 0,05$) para separar las medias entre los tratamientos.

Tabla 1. Lista de partidores para análisis de cuantificación génica y cuantificación de carga viral.

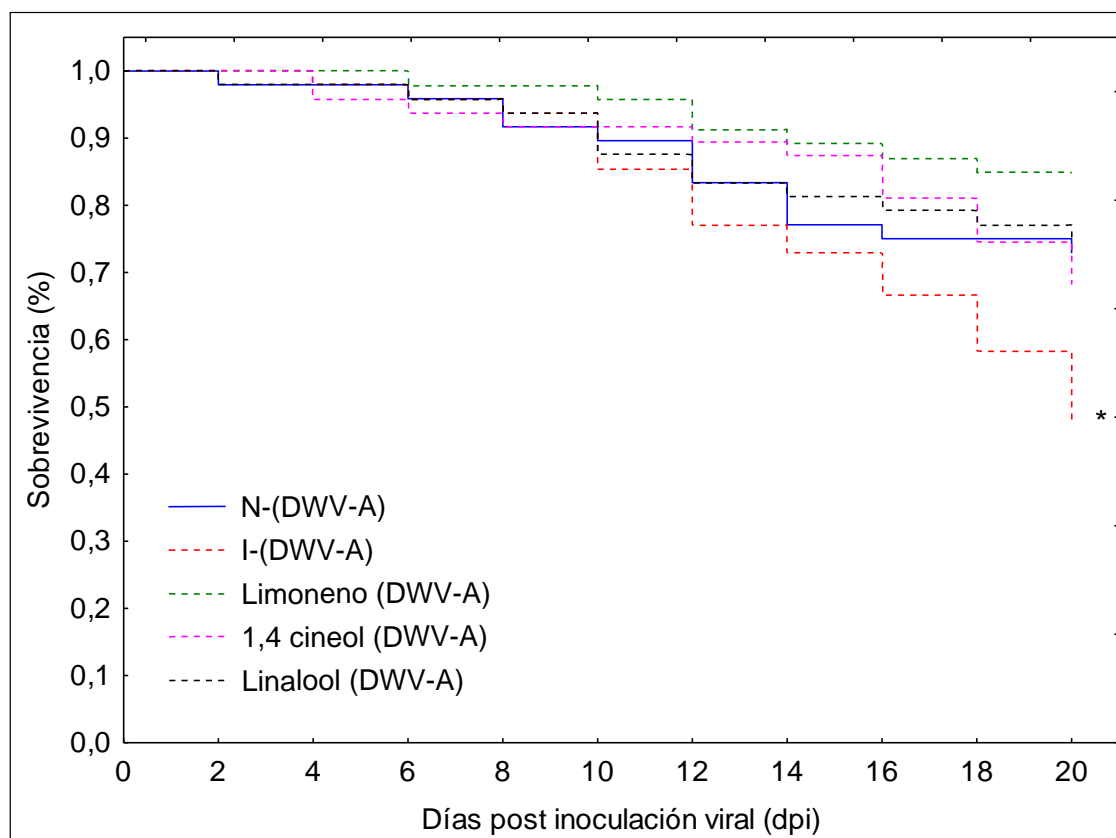
Nombre partidor	Secuencia	Referencia
Catalasa	AAGCCAGTTTGAC GGTAGGG AGCATGGACTACA CGTTCCG	(Collins <i>et al.</i> , 2004)
Tioredoxina reductasa	GCAGTGAATTTTGGTGCAAAAGT CACCTAGACCCCAAGTGCTACC	(Corona <i>et al.</i> , 2005)
α - glucosidasa	TCATCTTCCACGCCAGAACA ACGTGTACCGACACGAACTC	(Ohashi <i>et al.</i> , 1996)
Malvolio	CCTTGGTATAAAGATTATGACAGGAAT ATG CAAGAGCACTGTGAAGATACAAGTTAT G	(Ben-Shahar <i>et al.</i> , 2004)
DWV-A	TATCTTCATTAAAGCCACCTGGAA TTTCCTCATTAAGTGTGTCGTTGAT	(Yang y Cox-Foster, 2005)
β -actina	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG GACCCACCAATCCATACGGA	(Yang y Cox-Foster, 2005)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobrevivencia en abejas suplementadas con terpenos

La sobrevivencia a los 20 días post-inoculación viral en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol) presentó diferencias significativas respecto al control inoculado (I-DWV-A); estas diferencias fueron visibles a partir del día 12 post-inoculación viral respecto a los otros tratamientos, puesto que se observó una tendencia descendente de la curva de sobrevivencia producto de una mayor mortalidad (Figura 1). En el control inoculado (I-DWV-A), la sobrevivencia final fue del 50 % (20 días post-inoculación viral), siendo significativamente menor que en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol). En efecto, la sobrevivencia en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con limoneno fue de un 85 %, con linalool de un 80 % y con 1,4 cineol de un 71 % (Figura 1). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool, 1,4 cineol) respecto al control no inoculado (N-DWV-A), donde la sobrevivencia fue de un 75 % al final del ensayo.

Figura 1. Distribución de las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier de las abejas en cada grupo experimental durante los 20 días post inoculación viral



Cada curva representa abejas inoculadas con el DWV-A suplementadas con los terpenos; limoneno, linalool, 1,4 cineol, control inoculado (I-DWV-A) y control no inoculado (N-DWV-A). El asterisco indica diferencias significativas ($* = p < 0,05$) en el control inoculado (I-DWV-A), respecto a abejas inoculadas con el DWV-A suplementadas con terpenos según la prueba Log-rank con corrección de Holm-Bonferroni.

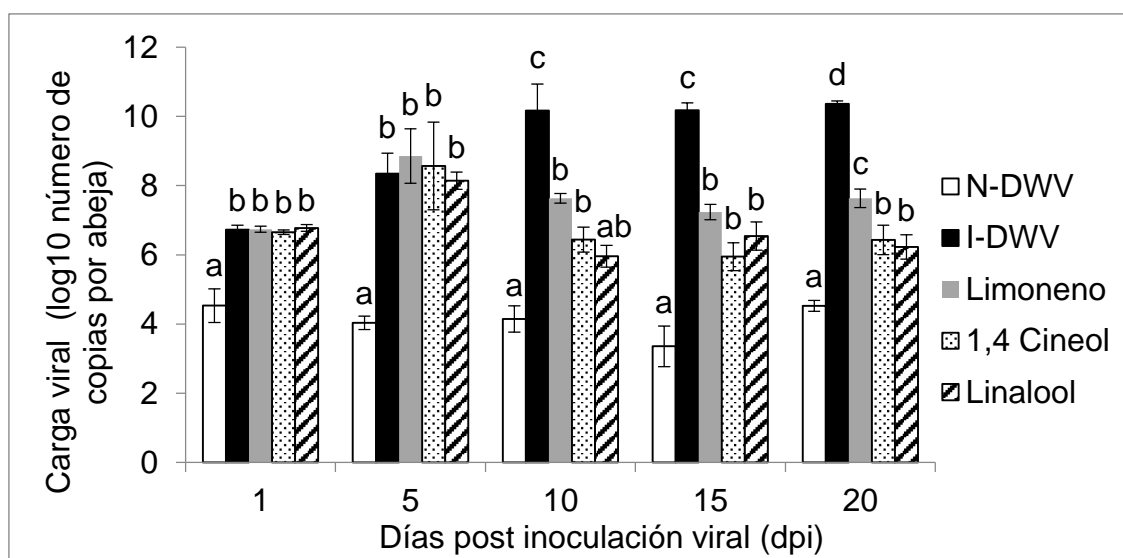
Por tanto, la suplementación alimenticia con terpenos estimularía la sobrevivencia de las abejas cuando estas se encuentran infectadas con el virus de las alas deformadas (DWV-A), tal como lo demostraron Palmer-Young *et al.* (2017), donde observaron que el consumo del terpeno timol aumentó la sobrevivencia en abejas coinfectadas con *Lotmaria passim* y DWV. Dichos hallazgos indican que el consumo de distintos terpenos puede conferir un aumento de la longevidad de las abejas cuando estas se encuentran infectadas con patógenos virales, como en el caso del DWV-A.

Cuantificación de la carga viral del DWV-A en abejas suplementadas con terpenos

La carga viral varió significativamente en las abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol), en comparación con el control inoculado (I-DWV-A). Esto se observó a partir del día diez post-

inoculación viral hasta el final del ensayo (día 20 post-inoculación viral) (Figura 2). Veinte días post inoculación viral, en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con limoneno, linalool y 1,4 cineol disminuyó un 30 % la carga viral ($1,0 \times 10^8$), 37 % ($1,0 \times 10^6$) y 42 % ($1,0 \times 10^7$ número de copias por abejas) respectivamente, en comparación al control inoculado (I-DWV-A) (Figura 2). Adicionalmente, el control no inoculado (N-DWV-A) presentó la menor carga viral en comparación con los demás tratamientos, durante todo el ensayo.

Figura 2. Carga viral del DWV-A en abejas suplementadas con terpenos



La concentración de los terpenos: limoneno, linalool, 1,4 cineol (16 ppm) en abejas inoculadas con el DWV-A, el control inoculado (I-DWV) y el control no inoculado (N-DWV) se muestran en negro y blanco respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p < 0,005$). Las barras en cada punto de medición en el tiempo indican error típico.

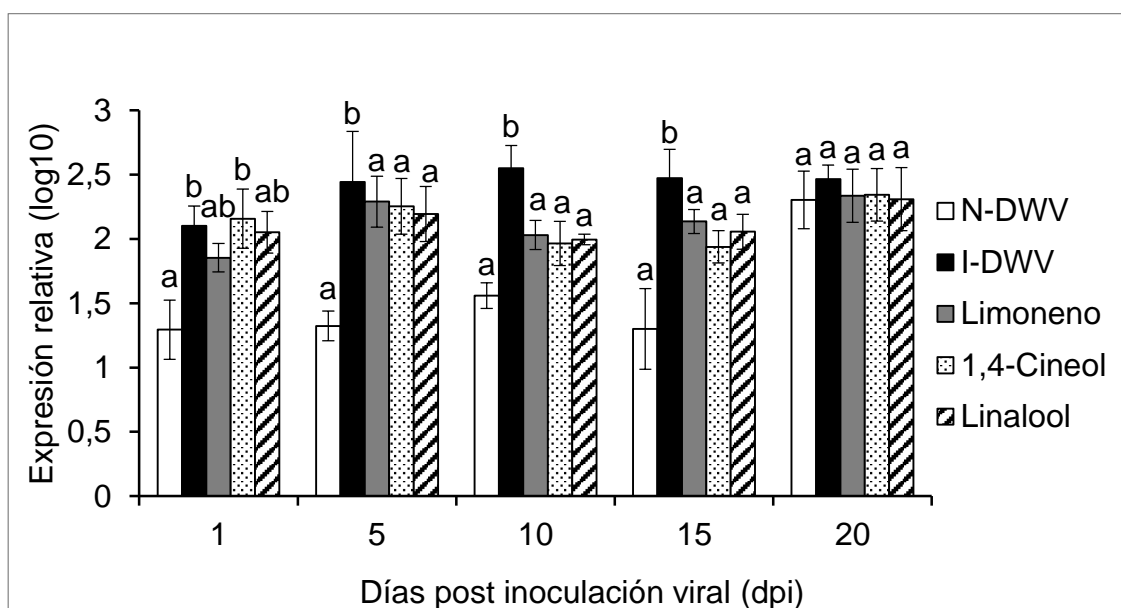
Estos resultados concuerdan con lo reportado por Parekh *et al.* (2021), quienes informaron que el aceite de tomillo (*T. vulgaris*), que contiene 64 % de timol (terpeno con propiedades antivirales), redujo un 72 % la carga viral generada por el DWV en abejas melíferas versus abejas infectadas suplementadas solamente con jarabe de azúcar.

Palmer-Young *et al.* (2017), determinaron que las abejas melíferas recién emergidas alimentadas con una mezcla del DWV y timol tuvieron una disminución de los niveles del virus a los 7 días después de la infección. Por tanto, la suplementación con terpenos, en este estudio coincide con lo informado por otros autores, no obstante, la magnitud de la reducción de la carga viral podría estar asociada al tipo y estructura del terpeno.

Expresión de genes de regulación energética en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos

La expresión relativa del gen malvolio (días 1 al 15 post-inoculación viral) varió significativamente en el control inoculado (I-DWV-A), respecto al control no inoculado (N-DWV-A), con un aumento promedio de la expresión del gen de 72 %. Durante ese mismo periodo de tiempo no presentaron diferencias significativas los tratamientos con abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol), respecto al control no inoculado (N-DWV-A) (Figura 3). Al final del ensayo en el día 20 post-inoculación viral no se observaron diferencias significativas para todos los tratamientos.

Figura 3. Nivel de expresión del gen malvolio en abejas infectadas con el DWV-A suplementadas con terpenos



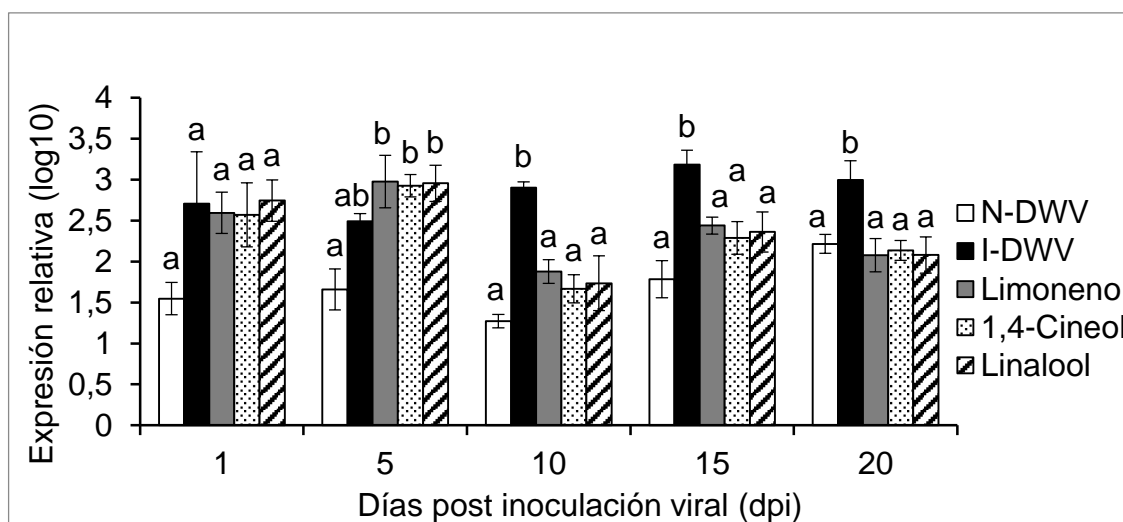
La concentración de los terpenos: limoneno, linalool, 1,4 cineol (16 ppm) en abejas inoculadas con el DWV-A, el control inoculado (I-DWV) y el control no inoculado (N-DWV) se muestran en negro y blanco respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p < 0,005$). Las barras en cada punto de medición en el tiempo indican error típico.

El aumento de la expresión del gen malvolio reportada en este estudio (días 1 al 15 post-inoculación viral) ha sido informado en abejas infectadas por *V. destructor* y virus transmitidos por este vector (Alaux *et al.*, 2011; Doublet *et al.*, 2017; Zanni *et al.*, 2017). El incremento en la expresión génica para todos los tratamientos al final del ensayo (20 días post-inoculación viral) puede atribuirse a las conductas alimentarias y al desarrollo fisiológico de las abejas. Se ha

descrito que el gen malvolio incrementa su expresión conforme las abejas avanzan en su desarrollo fisiológico, pasando de nodrizas a pecoreadoras (Ben-Shahar *et al.*, 2004). El proceso fisiológico de maduración de las abejas es vital dentro de la colmena; las abejas que se aproximan a los 20 días de edad comienzan su transición hacia pecoreadoras, lo que promueve la búsqueda de alimentos ricos en carbohidratos (Ben-Shahar *et al.*, 2004).

En cuanto a la expresión del gen α - glucosidasa II, en el primer día post-inoculación viral no hubo diferencias significativas. Sin embargo, durante el día 5 post-inoculación viral hubo diferencias significativas en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol) respecto al control no inoculado (N-DWV-A). Entre los días 10 y 20 post-inoculación viral se observaron diferencias significativas entre el control inoculado (I-DWV-A) y los tratamientos con abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol) respecto al control no inoculado (N-DWV-A), con un aumento de la expresión promedio del gen de un 32 % (Figura 4).

Figura 4. Nivel de expresión del gen α - glucosidasa II en abejas infectadas con el DWV-A suplementadas con terpenos



La concentración de los terpenos: limoneno, linalool, 1,4 cineol (16 ppm) en abejas inoculadas con el DWV-A, el control inoculado (I-DWV) y el control no inoculado (N-DWV) se muestran en negro y blanco respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p < 0,005$). Las barras en cada punto de medición en el tiempo indican error típico.

El aumento de la expresión del gen desde el día 10 al 20 post-inoculación viral, se debería a que el patógeno viral modifica el metabolismo del huésped para

favorecer su desarrollo, aumentando la absorción de nutrientes y reduciendo la resistencia del huésped (Biron *et al.*, 2005; Vincendeau *et al.*, 2003). En este sentido, Vidau *et al.* (2014) ha reportado que el parasito *N. cerenae* aumenta la expresión del gen α - glucosidasa II en el intestino medio de las abejas infectadas, lo que se traduce en una mayor abundancia de enzimas digestivas. Adicionalmente, Łopieńska-Biernat *et al.* (2017), han demostrado que abejas coinfectadas con *V. destructor* y DWV presentan una mayor actividad de las enzimas α – glucosidasas, que abejas infectadas solo con *V. destructor*, lo que sugiere una interacción sinérgica entre ambos patógenos. Dichos hallazgos, observados en este estudio, sugieren que el aumento en la expresión génica en abejas infectadas con el virus DWV-A, podría desencadenar una absorción más eficiente de carbohidratos, lo que contribuiría a una mejora en la nutrición y digestión de este insecto, actuando como estrategia defensiva ante la infección viral y compensando el gasto energético causado por el virus.

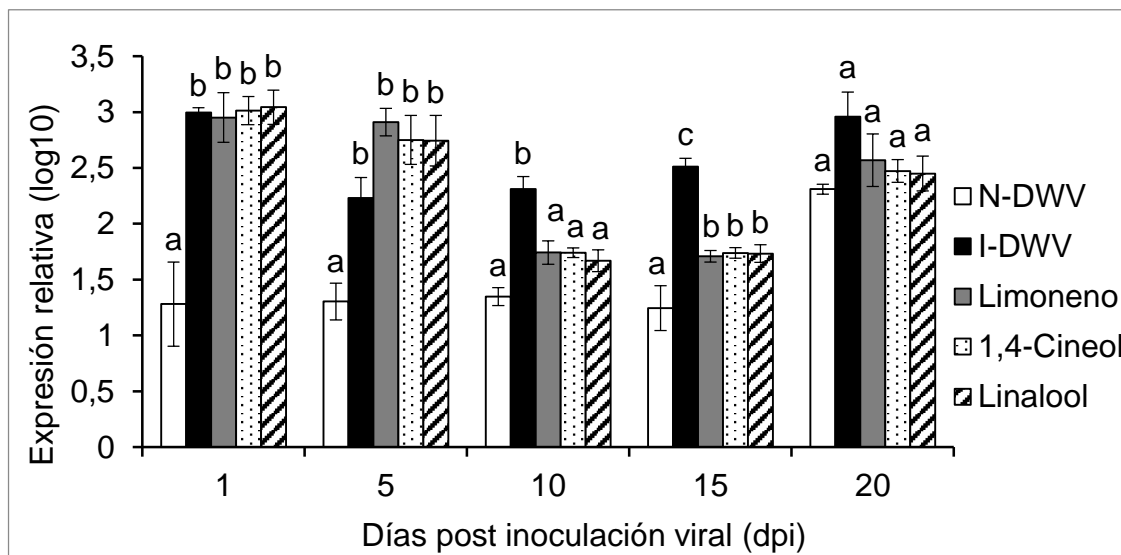
Es importante mencionar, que durante este mismo periodo de tiempo (día 10 al 20 post-inoculación viral) abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol) no aumentó la expresión del gen, siendo similar al control no inoculado (N-DWV-A). Esto aludiría que los terpenos tienen la capacidad de mantener la expresión del gen en niveles comparables a los de una abeja no infectada, el cual podría estar garantizando el mantenimiento del metabolismo y la energía de las abejas en situaciones de estrés causados por patógenos virales.

Expresión de genes de estrés oxidativo en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos

La expresión relativa del gen Tioredoxina reductasa en los días 1 al 5 post-inoculación viral presentó diferencias significativas para todos los tratamientos inoculados con el DWV-A, con un aumento promedio de la expresión génica del 87 % respecto al control no inoculado (N-DWV-A) (Figura 5). Durante los días 10 al 15 post-inoculación viral hubo diferencias significativas en los tratamientos de abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol) respecto al control inoculado (I-DWV-A), con un aumento de la expresión génica de 38 %. En este mismo periodo de tiempo abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol) no presentaron diferencias significativas respecto al control no inoculado (N-DWV-

A). Al final del ensayo en el día 20 post-inoculación viral no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 5).

Figura 5. Expresión relativa del gen tioredoxina reductasa en abejas infectadas con el DWV-A suplementadas con terpenos



La concentración de los terpenos: limoneno, linalool, 1,4 cineol (16 ppm) en abejas inoculadas con el DWV-A, el control inoculado (I-DWV) y el control no inoculado (N-DWV) se muestran en negro y blanco respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p < 0,005$). Las barras en cada punto de medición en el tiempo indican error típico.

El aumento de la expresión del gen (días 1 al 5 post-inoculación viral) en los tratamientos de abejas inoculados con el DWV-A, fue reportado por Sunkes y Reddy (2022), donde observó una sobreexpresión de genes antioxidantes especialmente de la enzima tioredoxina reductasa en abejas de apiarios expuestas a condiciones de estrés debido a altas concentraciones de pesticidas organofosforados.

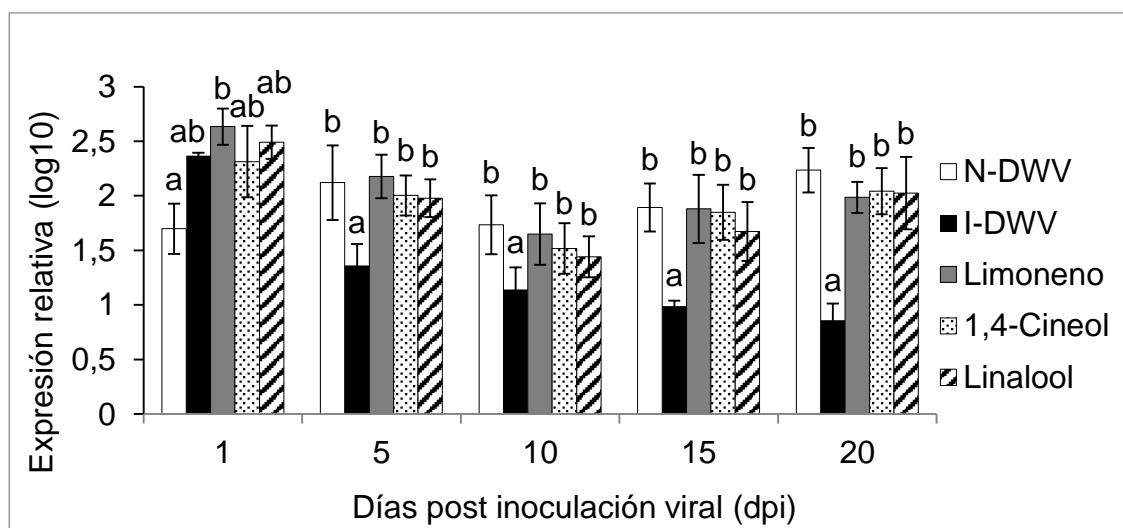
Cabe destacar que en este estudio durante los días 10 y 15 post-inoculación viral no se observó dicho incremento del gen en el tratamiento de abejas inoculadas con el DWV-A y suplementados con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol). Esta observación permite sugerir que los terpenos podrían estar ejerciendo una influencia en la modulación de la expresión de este gen, resultando significativamente similar al control no inoculado (N-DWV-A), esto significa que a pesar de la infección generada por el DWV-A, los terpenos podrían estar desempeñando un rol protector, contribuyendo de esta forma a disminuir los efectos de la infección en abejas inoculadas con el virus.

Sin embargo, la expresión del gen tioredoxina reductasa para todos los

tratamientos al final del ensayo (día 20 post-inoculación viral) podría deberse al estrés de las abejas debido al continuo confinamiento. Este aumento de la expresión también fue reportado por Alburaki *et al.* (2019) en abejas que contenían insecticida imidacloprid enjauladas durante tres semanas alimentadas con jarabe de azúcar, lo que podría indicar una regulación por parte de las abejas para poder mitigar el estrés y evitar el daño oxidativo.

En cuanto, la expresión del gen catalasa se observa que en el día 1 post-inoculación viral no se observaron diferencias significativas para todos los tratamientos (Figura 6). Sin embargo, durante los días 5 al 20 post-inoculación viral abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1-4 cineol) presentaron un aumento en la expresión del gen en un 73 % en relación con el control inoculado (I-DWV-A). Adicionalmente, durante todo el periodo del ensayo en los días 1 al 20 post-inoculación viral el control no inoculado (N-DWV-A) no presentaron diferencias significativas respecto a abejas infectadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol) (Figura 6).

Figura 6. Nivel de expresión del gen catalasa en abejas infectadas con el DWV-A suplementadas con terpenos



La concentración de los terpenos: limoneno, linalool, 1,4 cineol (16 ppm) en abejas inoculadas con el DWV-A, el control inoculado (I-DWV) y el control no inoculado (N-DWV) se muestran en negro y blanco respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p < 0,005$). Las barras en cada punto de medición en el tiempo indican error típico.

La disminución de la expresión del gen catalasa en este estudio, en abejas infectadas con el DWV-A, concuerda con lo reportado previamente por

Łopieńska-Biernat *et al.* (2017) en abejas infectadas con este virus, quienes observaron una menor actividad de la enzima catalasa. Sin embargo, en abejas inoculadas con el DWV-A y suplementadas con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol), en el presente estudio, se observó una mayor expresión de este gen, comparado con el tratamiento control de abejas inoculadas (I-DWV), pero similares al control no inoculado (N-DWV-A). Por tanto, esto sugiere que el aumento de la expresión del gen catalasa observado en estos tratamientos podría ser indicativo de un mecanismo de defensa, lo que a su vez podría reflejar una mejor respuesta frente al estrés oxidativo ocasionado por el patógeno viral.

CONCLUSIONES

1. La suplementación con terpenos (limoneno, linalool y 1,4 cineol) en abejas infectadas con el virus de las alas deformadas (DWV-A) disminuye la carga viral y estimula la sobrevivencia de estas.
2. La suplementación con terpenos mejora la respuesta al estrés oxidativo en abejas infectadas con el virus de las abejas deformadas (DWV-A).
3. La suplementación con terpenos tiene un efecto regulador en la expresión de genes asociados al control energético en abejas infectadas con el virus de las alas deformadas (DWV-A).

REFERENCIAS

1. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126).
2. Alaux, C., C. Dantec, H. Parrinello and Y. Le Conte. 2011. Nutrigenomics in honeybees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*, 12(1), 496.
3. Alaux, C., F. Ducloz, D. Crauser and Y. Le Conte. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562-565.
4. Ament, S. A., Q. W. Chan, M. M. Wheeler, S. E. Nixon, S. P. Johnson, S. L. Rodriguez-Zas, L. J. Foster and G. E. Robinson. 2011. Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology*, 214(22), 3808-3821.
5. Beaurepaire, A., N. Piot, V. Doublet, K. Antunez, E. Campbell, P. Chantawannakul, N. Chejanovsky, A. Gajda, M. Heerman and D. Panziera. 2020. Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 11(4), 239.

6. Ben-Shahar, Y., N. Dudek and G. Robinson. 2004. Phenotypic deconstruction reveals involvement of manganese transporter malvolio in honey bee division of labor. *Journal of Experimental Biology*, 207(19), 3281-3288.
7. Berenbaum, M. R. and B. Calla. 2021. Honey as a Functional Food for *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, 66(1), 185-208.
8. Biron, D., P. Agnew, L. Marche, L. Renault, C. Sidobre and Y. Michalakis. 2005. Proteome of *Aedes aegypti* larvae in response to infection by the intracellular parasite *Vavraia culicis*. *International Journal for Parasitology*, 35(13), 1385-1397.
9. Boncristiani, D. L., J.P. Tauber, E.C. Palmer-Young, L. Cao, W. Collins, K. Grubbs, J. A. Lopez, L. W. Meinhardt, V. Nguyen, S. Oh, R. J Peterson, H. Zamora, Y. Chen and J.D. Evans. 2021. Impacts of Diverse Natural Products on Honey Bee Viral Loads and Health. *Applied Sciences*, 11(22), 10732.
10. Breeze, T. D., A. P. Bailey, K. G. Balcombe and S. G. Potts. 2011. Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 142(3), 137-143.
11. Britton, N. F., and K. A. Jane White. 2021. The Effect of Covert and Overt Infections on Disease Dynamics in Honey-Bee Colonies. *Bull Math Biol*, 83(6), 67.
12. Brutscher, L. M. and M. L. Flenniken. 2015. RNAi and Antiviral Defense in the Honey Bee. *Journal of Immunology Research*, 2015, 941897.
13. Brutscher, L. M., A. J. McMenamin and M. L. Flenniken. 2016. The Buzz about Honey Bee Viruses. *PLoS Pathog*, 12(8), e1005757.
14. Collins, A. M., V. Williams and J. D. Evans. 2004. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*, 13(2), 141-146.
15. Corona, M., K. A. Hughes, D. B. Weaver and G. E. Robinson. 2005. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(11), 1230-1238.
16. DeGrandi-Hoffman, G., Y. Chen, E. Huang and M. H. Huang. 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 56(9), 1184-1191.
17. Doublet, V., Y. Poeschl, A. Gogol-Döring, C. Alaux, D. Annoscia, C. Aurori, S. M. Barribeau, O. C. Bedoya-Reina, M. J. F. Brown, J. C. Bull, M. L. Flenniken, D. A. Galbraith, E. Genersch, S. Gisder, I. Grosse, H. L. Holt, D. Hultmark, H. M. G. Lattorff, Y. Le Conte, C. M. Grozinger. 2017. Unity in defense: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics*, 18(1), 207.
18. Evans, J. D., K. Aronstein, Y. P. Chen, C. Hetru, J. L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G. J. Thompson, Z. Zou and D. Hultmark. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645-656.

19. Fievet, J., D. Tentcheva, L. Gauthier, J. de Miranda, F. Cousserans, M. E. Colin and M. Bergoin. 2006. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology*, 3, 16.
20. Garibaldi, L. A., I. Steffan-Dewenter, R. Winfree, M. A. Aizen, R. Bommarco, S. A. Cunningham, C. Kremen, L. G. Carvalheiro, L. D. Harder and O. Afik. 2013. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *science*, 339(6127), 1608-1611.
21. Grozinger, C. M. and M. L. Flenniken. 2019. Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annual Review of Entomology*, 64(1), 205-226.
22. Gusachenko, Woodford, L., K. Balbirnie-Cumming, E. M. Campbell, C. R. Christie, A. S. Bowman and D. J. Evans. 2020. Green Bees: Reverse Genetic Analysis of Deformed Wing Virus Transmission, Replication, and Tropism. *Viruses*, 12(5).
23. Holm, S. 1979. A simple sequential rejective method procedure. vol. 6. *Scand J Stat*, 65-70.
24. Holt, H. L., K. A. Aronstein and C. M. Grozinger. 2013. Chronic parasitization by *Nosema microsporidia* causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 14(1), 799.
25. Hristov, P., R. Shumkova, N. Palova and B. Neov. 2020. Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Vet Sci*, 7(4).
26. Lamp, B., A. Url, K. Seitz, J. Eichhorn, C. Riedel, L. J. Sinn, S. Indik, H. Köglberger and T. Rügenapf. 2016. Construction and Rescue of a Molecular Clone of Deformed Wing Virus (DWV). *PLOS ONE*, 11(11),
27. Lanzi, G., R. de Miranda Joachim, B. Boniotti Maria, E. Cameron Craig, A. Lavazza, L. Capucci, M. Camazine Scott and C. Rossi. 2006. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*, 80(10), 4998-5009.
28. Larsen, A., F. J. Reynaldi and E. Guzmán-Novoa. 2019. Bases del sistema inmune de la abeja melífera (*Apis mellifera*). Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(3), 705-728.
29. Li, Z., J. He, T. Yu, Y. Chen, W. F. Huang, J. Huang, Y. Zhao, H. Nie and S. Su. 2019. Transcriptional and physiological responses of hypopharyngeal glands in honeybees (*Apis mellifera* L.) infected by *Nosema ceranae*. *Apidologie*, 50(1), 51-62.
30. Łopieńska-Biernat, E., R. Sokół, M. Michalczyk, K. Żółtowska and R. Stryński. 2017. Biochemical status of feral honey bees (*Apis mellifera*) infested with various pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 606-615.
31. Martin, S., A. Hogarth, J. van Breda and J. Perrett. 1998. A scientific note on *Varroa jacobsoni* Oudemans and the collapse of *Apis mellifera* L. colonies in the United Kingdom. *Apidologie*, 29(4), 369-370.
32. Martin, S. J. 2001. The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology*, 38(5), 1082-1093.

33. Martin, S. J. and L. E. Brettell. 2019. Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. *Annual Review of Virology*, 6(1), 49-69.
34. Martin, S. J., A. C. Highfield, L. Brettell, E. M. Villalobos, G. E. Budge, M. Powell, S. Nikaido and D. C. Schroeder. 2012. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *science*, 336(6086), 1304-1306.
35. Mattila, H. R., D. Rios, V. E. Walker-Sperling, G. Roeselers and I. L. G. Newton. 2012. Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and Broader Communities when Colonies are Genetically Diverse. *PLOS ONE*, 7(3), e32962.
36. McMahon, D. P., M. E. Natsopoulou, V. Doublet, M. Fürst, S. Weging, M. J. F. Brown, A. Gogol-Döring and R. J. Paxton. 2016. Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1833), 20160811.
37. Mieres-Castro, D., S. Ahmar, R. Shabbir and F. Mora-Poblete. 2021. Antiviral Activities of Eucalyptus Essential Oils: Their Effectiveness as Therapeutic Targets against Human Viruses. *Pharmaceuticals*, 14(12), 1210.
38. Mordecai, G. J., L. Wilfert, S. J. Martin, I. M. Jones and D. C. Schroeder. 2016. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *The ISME Journal*, 10(5), 1264-1273.
39. Mustacich, D. and G. Powis. 2000. Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 346(1), 1-8.
40. Najib, K. L. and A. S. Hassan. 2021. Food and environmental degradation as causative agents of honey bee colonies decline: Mathematical model approach. *Journal of the Nigerian Society of Physical Sciences*, 3(4), 446-454.
41. Ochungo, P., R. Veldtman, E. M. Abdel-Rahman, S. Raina, E. Muli and T. Landmann. 2021. Multi-sensor mapping of honey bee habitats and fragmentation in agro-ecological landscapes in Eastern Kenya. *Geocarto International*, 36(8), 839-860.
42. Ohashi, K., M. Sawata, H. Takeuchi, S. Natori and T. Kubo. 1996. Molecular Cloning of cDNA and Analysis of Expression of the Gene for α -Glucosidase from the Hypopharyngeal Gland of the Honey bee *Apis mellifera* L. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(2), 380-385.
43. Olgun, T., M. Dayioğlu and N. Özsoy. 2020. Pesticide and pathogen induced oxidative stress in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Mellifera*, 20(2), 32-52.
44. Palmer-Young, E. C., I. W. Farrell, L. S. Adler, N. J. Milano, P. A. Egan, R. R. Junker, R. E. Irwin and P. C. Stevenson. 2019. Chemistry of floral rewards: intra- and interspecific variability of nectar and pollen secondary metabolites across taxa. *Ecological Monographs*, 89(1), e01335.
45. Palmer-Young, E. C., C. O. Tozkar, R. S. Schwarz, Y. Chen, R. E. Irwin, L. S. Adler and J. D. Evans. 2017. Nectar and Pollen Phytochemicals Stimulate Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Immunity to Viral Infection. *J Econ Entomol*, 110(5), 1959-1972.
46. Papa, G., R. Maier, A. Durazzo, M. Lucarini, I. K. Karabagias, M. Plutino, E. Bianchetto, R. Aromolo, G. Pignatti, A. Ambrogio, M. Pellicchia and I. Negri

2022. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology*, 11(2), 233.
47. Parekh, F., K. F. Daughenbaugh and M. L. Flenniken. 2021. Chemical Stimulants and Stressors Impact the Outcome of Virus Infection and Immune Gene Expression in Honey Bees (*Apis mellifera*) [Original Research]. *Frontiers in Immunology*.
 48. Pascual, G., D. Silva, M. Vargas, M. Aranda, J. A. Canumir and M. D. Lopez. 2022. Dietary Supplement of Grape Wastes Enhances Honeybee Immune System and Reduces Deformed Wing Virus (DWV) Load. *Antioxidants (Basel)*, 12(1).
 49. Penn, H. J., M. D. Simone-Finstrom, L. I. de Guzman, P. G. Tokarz and R. Dickens. 2022. Colony-Level Viral Load Influences Collective Foraging in Honey Bees [Original Research]. *Frontiers in Insect Science*.
 50. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45.
 51. Pizzorno, M. C., K. Field, A. L. Kobokovich, P. L. Martin, R. A. Gupta, R. Mammone, D. Rovnyak and E. A. Capaldi. 2021. Transcriptomic Responses of the Honey Bee Brain to Infection with Deformed Wing Virus. *Viruses*, 13(2), 287.
 52. Rinderer, T. E. and K. Dell Elliott. 1977. Worker Honey Bee Response to Infection with *Nosema apis*: Influence of Diet. *Journal of Economic Entomology*, 70(4), 431-433.
 53. Rinderer, T. E., W. C. Rothenbuhler and T. A. Gochner. 1974. The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 23(3), 347-350.
 54. Riveros, G., N. Arismendi, N. Zapata, D. Evans, I. Pérez, P. Aldea and M. Vargas. 2020. Occurrence, prevalence and viral load of deformed wing virus variants in *Apis mellifera* colonies in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 63-68.
 55. Santillán-Galicia, M. T., B. V. Ball, S. J. Clark and P. G. Alderson. 2015. Transmission of deformed wing virus and slow paralysis virus to adult bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, 49(2), 141-148.
 56. Sohal, R. S., R. J. Mockett and W. C. Orr. 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, 21 This article is part of a series of reviews on "Oxidative Stress and Aging." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. 2 Guest Editor: Rajindar S. Sohal. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 575-586.
 57. Storey, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res*, 29(12), 1715-1733.
 58. Sunkes, M. S. B. and M. S. Reddy. 2022. Validation of Antioxidant and Immune Related Gene Members among *Apis cerana* Species of South India by Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Apiculture*, 37(2), 101-112.
 59. Taric, E., U. Glavinic, B. Vejnovic, A. Stanojkovic, N. Aleksic, V. Dimitrijevic, V and Z. Stanimirovic. 2020. Oxidative Stress, Endoparasite Prevalence and

- Social Immunity in Bee Colonies Kept Traditionally vs. Those Kept for Commercial Purposes. *Insects*, 11(5), 266.
60. Ullah, A., I. Tlak Gajger, A. Majoros, S. A. Dar, S. Khan, Kalimullah, A. Haleem Shah, M. Nasir Khabir, R. Hussain, H. U. Khan, M. Hameed and S. I. Anjum. 2021. Viral impacts on honey bee populations: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 523-530.
 61. Valles, S. M., Y. Chen, A. E. Firth, D. M. A. Guérin, Y. Hashimoto, S. Herrero, J. R. de Miranda, E. Ryabov and C. Ictv Report. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Iflaviridae. *The Journal of general virology*, 98(4), 527-528.
 62. Vidau, C., J. Panek, C. Texier, D. G. Biron, L. P. Belzunces, M. Le Gall, C. Broussard, F. Delbac and H. El Alaoui. 2014. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J Invertebr Pathol*, 121, 89-96.
 63. Vincendeau, P., A. P. Gobert, S. Daulouède, D. Moynet and M. D. Mossalayi. 2003. Arginases in parasitic diseases. *Trends in Parasitology*, 19(1), 9-12.
 64. Watson, K. and J. A. Stallins. 2016. Honey Bees and Colony Collapse Disorder: A Pluralistic Reframing. *Geography Compass*, 10(5), 222-236.
 65. Wiese, N., J. Fischer, J. Heidler, O. Lewkowski, J. Degenhardt and S. Erler. 2018. The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (*Thymus vulgaris*) inhibit growth of bee disease-associated microbes. *Scientific Reports*, 8(1), 14634.
 66. Woodford, L. and D. J. Evans. 2020. Deformed wing virus: using reverse genetics to tackle unanswered questions about the most important viral pathogen of honey bees. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(4).
 67. Wu, Y., X. Dong and T. Kadowaki. 2017. Characterization of the copy number and variants of deformed wing virus (DWV) in the pairs of honey bee pupa and infesting *Varroa destructor* or *Tropilaelaps mercedesae*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1558.
 68. Yang, X. and D. L. Cox-Foster. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7470-7475.
 69. Yue, C. and E. Genersch. 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol*, 86(Pt 12), 3419-3424.
 70. Zanni, V., D. A. Galbraith, D. Annoscia, C. M. Grozinger and F. Nazzi, F. 2017. Transcriptional signatures of parasitization and markers of colony decline in *Varroa*-infested honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87, 1-13.