

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**INFLUENCIA DEL VIRUS DE ALAS DEFORMADAS (DWV-A) EN LA  
CONDUCTA Y REGULACIÓN GÉNICA DE NODRIZAS DE *APIS MELLIFERA* L.**

**POR**

**SAMUEL ANDRES BEJARANO VASQUEZ**

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

**CHILLÁN – CHILE**

**2025**

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

**INFLUENCIA DEL VIRUS DE ALAS DEFORMADAS (DWV-A) EN LA  
CONDUCTA Y REGULACIÓN GÉNICA DE NODRIZAS DE *APIS MELLIFERA* L.**

**POR**

**SAMUEL ANDRES BEJARANO VASQUEZ**

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

**CHILLÁN – CHILE**

**2025**

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.

Instituto profesional Santo Tomás

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.

Ing. Agrónomo. M. Sc.

---

Decano

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen .....	1
Summary .....	1
Introducción .....	2
Materiales y Métodos .....	5
Resultados y Discusión .....	10
Conclusiones .....	17
Referencias .....	17

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Carga viral en abejas nodrizas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación...	10
Figura 2	Número promedio de abejas que se mantenía en el nido de cría en el lado A de la colmena en distintos días post inoculación.....	11
Figura 3	Número promedio de abejas que se mantenía en el nido de cría en el lado B de la colmena en distintos días post inoculación.....	12
Figura 4	Expresión del gen <i>AChE1</i> ( $\log_{10}$ veces de cambio) en abejas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.....	13
Figura 5	Expresión del gen <i>Period</i> ( $\log_{10}$ veces de cambio) en abejas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.....	14
Figura 6	Expresión del gen <i>AmeIOBP5</i> ( $\log_{10}$ veces de cambio) en abejas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.....	15
Figura 7	Expresión del gen <i>AmeIOBP11</i> ( $\log_{10}$ veces de cambio) en abejas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.....	16
Tabla 1	Secuencia de partidores utilizados para análisis de cuantificación de la expresión génica y de la carga viral.....	8

## **INFLUENCIA DEL VIRUS DE ALAS DEFORMADAS (DWV-A) EN LA CONDUCTA Y REGULACIÓN GÉNICA DE NODRIZAS DE *APIS MELLIFERA* L.**

INFLUENCE OF DEFORMED WING VIRUS (DWV-A) ON THE BEHAVIOUR AND GENE REGULATION OF *APIS MELLIFERA* L. NURSES.

**Palabras índice adicionales: abejas melíferas, genes, DWV-A, comportamiento.**

### **RESUMEN**

La conducta de las nodrizas de *Apis mellifera* L. está dirigida al cuidado de la cría y tareas dentro de la colmena, para ello existen una serie de genes asociados a su comportamiento. El gen *AChE1* está involucrada en el aprendizaje, gen *Period* asociado a la transición de nodriza a pecoreadora, y los genes *AmelOBP5* y *AmelOBP11* asociadas al olfato y al reconocimiento de estímulos, cruciales para su desarrollo y comportamiento. Sin embargo, existen patógenos que alteran el correcto funcionamiento, entre ellos se encuentra el virus de las alas deformadas (DWV-A) donde sus principales síntomas son deformación de alas y menor longevidad. El objetivo de este estudio fue determinar cómo DWV-A afecta la conducta nodriza de abejas melíferas y la expresión de genes asociados a esta conducta. Se inocularon abejas recién emergidas con una suspensión viral (I-DWV) y otras sin inocular se usaron como control (N-DWV) y se observaron durante 9 días. Los resultados demuestran que DWV-A no tiene efectos directos sobre *AChE1*, incrementa la expresión de *Period* y disminuye la expresión de los genes *AmelOBP5* y *AmelOBP11*. Conductualmente, las abejas infectadas permanecieron más tiempo en el nido, posiblemente por debilitamiento muscular. Por lo tanto, DWV-A altera funciones críticas de las nodrizas, pudiendo afectar la estabilidad de la colmena y la eficiencia en sus tareas.

### **SUMMARY**

The behavior of *Apis mellifera* L. nurse bees is directed toward brood care and tasks within the hive, and a number of genes are associated with their behavior. The

*AChE1* gene is involved in learning, the *Period* gene is associated with the transition from nurse to forager, and the genes *AmeIOBP5* and *AmeIOBP11* are associated with smell and stimulus recognition, which are crucial for their development and behavior. However, pathogens disrupt their proper functioning, including deformed wing virus (DWV-A), whose main symptoms are wing deformation and reduced longevity. The objective of this study was to determine how DWV-A affects the nurse behavior of honeybees and the expression of genes associated with this behavior. Newly emerged bees were inoculated with a viral suspension (I-DWV), while uninoculated bees were used as controls (N-DWV) and observed for 9 days. The results demonstrate that DWV-A has no direct effects on *AChE1*, increases *Period* expression, and decreases the expression of the *AmeIOBP5* and *AmeIOBP11* genes. Behaviorally, infected bees remained in the nest longer, possibly due to muscle weakening. Therefore, DWV-A disrupts critical functions of nurse bees, potentially affecting hive stability and task efficiency.

## **INTRODUCCIÓN**

La polinización entomófila es vital para la producción global de alimentos, por lo que se considera un servicio ecosistémico clave (Miñarro *et al.*, 2018). La abeja melífera (*Apis mellifera* L.) es de gran importancia en la polinización de ecosistemas agrícolas y forestales. También presenta gran importancia económica debido a la gran cantidad de subproductos que se pueden comercializar a partir de ellas, como la miel, jalea real, polen, propóleo, entre otros.

Los insectos altamente sociales (eusociales) como la abeja melífera, componen sus colonias con individuos de diferentes castas y sexos, con un papel específico dentro de la colmena (Nowak *et al.*, 2010; Richards, 2019), físicamente se distinguen 3 castas, principalmente reina, obrera y zángano. Adicionalmente, debido al polietismo temporal propio de la especie, la casta obrera, se encuentra dividida por sub-castas que están reguladas por diferencias internas y fisiológicas (Johnson, 2010), que las lleva a realizar tareas específicas dentro y fuera de la colmena, entre estas se encuentran las nodrizas y pecoreadoras. Las nodrizas son las encargadas del cuidado de la cría y la alimentación de la abeja reina y las pecoreadoras son las

encargadas de ir en búsqueda de alimento fuera de la colmena, realizando así el proceso de polinización (Bonilla, 2012).

No obstante, se ha observado durante el último tiempo, una disminución de los insectos polinizadores más importantes, las abejas (Brunet y Fragoso, 2024). Concretamente en *A. mellifera* está asociado en parte a patógenos propios de la especie (Brutscher *et al.*, 2016; Hristov *et al.*, 2020). Entre estos patógenos los virus tienen gran impacto en la salud de las abejas melíferas, ya que se ha descrito que pueden permanecer en las colmenas sin generar síntomas clínicos, lo que dificulta su detección (Martin *et al.*, 2013). Uno de ellos es el virus de las alas deformadas (DWV), entre los síntomas característicos de este patógeno esta la deformación de las alas, hinchazón abdominal y menor longevidad de abejas emergentes (Grozinger *et al.*, 2019). Hasta la fecha se han identificado tres variantes con importancia epidemiológica DWV-A, DWV-B y DWV-C, de estas tres variantes, dos (A y C) se han asociado con pérdidas de colonias y muertes invernales en Europa (Mordecai *et al.*, 2016). En Chile se ha reportado la presencia de las variantes A y B, con predominancia de la variante A (Riveros *et al.*, 2020).

Las abejas pueden soportar altas cargas de DWV sin presentar síntomas de alas deformadas, puesto que la sintomatología se presenta en mayor proporción cuando el virus es transmitido por su vector el ácaro *Varroa destructor* (Martin *et al.*, 2012). Ya que el virus tiene la capacidad de replicarse en el ácaro, este al alimentarse de los cuerpos grasos de la cría (Ramsey *et al.*, 2019), le traspasa gran cantidad del virus, por lo que la mayor carga viral durante esa etapa de desarrollo provoca síntomas de alas deformadas, además de que la metamorfosis de la abeja implica en ella mecanismos que pueden disminuir las defensas y volver más susceptibles a las larvas (Gauthier *et al.*, 2007).

Las abejas realizan tareas complejas que dependen en gran parte de su olfato. En un principio son reconocidas como recolectoras generalistas, lo que significa que no están adaptadas a percibir un aroma de una especie única, y esto se ha descrito en consecuencia, como un circuito olfativo no optimizado, lo que implica que deben aprender y discriminar aromas de manera eficiente (Paoli y Galizia, 2021). Adicionalmente, las abejas al ser un insecto social deben regular su interacción

intraespecífica mediante feromonas, regulando así la cohesión y la eficiencia de la colonia, modulando una gran variedad de comportamientos (Sandoz *et al.*, 2007). Es por esto, que la percepción olfativa modula la organización interna de castas, forrajeo, defensa y en general las actividades que les permiten mantener la integridad de su colonia (Bortolotti y Costa, 2014). La percepción e interpretación de los aromas del ambiente involucran una gran variedad de moléculas que interactúan en las células sensoriales olfativas, entre ellas se encuentran las proteínas de unión a odorantes (OBP) (Foret y Maleszka, 2006; Leal, 2013; Pelosi *et al.*, 2005). En este contexto, Silva *et al.* (2021) lograron demostrar que las OBPs, específicamente las OBP 2, 5, 11 y 12, disminuyen su expresión génica en presencia de altas cargas del virus de alas deformadas (DWV-A) en las antenas. La proteína OBP5 está relacionada con el cuidado de las larvas dentro de la colmena, ya que esta proteína tiene afinidad por los compuestos volátiles que emiten las larvas cuando son afectadas por diferentes patógenos (Zhao *et al.*, 2015). Zhao *et al.* (2013) demostraron que la OBP11 es producida mayormente en individuos de obreras que trabajan dentro de la colmena específicamente a edades de entre 10 a 15 días. Es por esta razón que se ha planteado que el virus podría comprometer la conducta de las nodrizas de abeja melífera volviéndolas menos receptivas a estímulos producidos por las larvas. Esta hipótesis ha sido reforzada posteriormente por Silva *et al.* (2024), ya que recientemente se demostró que en nodrizas con altas cargas virales se altera la conducta, disminuyendo su atracción cuando son estimuladas con alcohol bencílico, uno de los componentes de la feromona de alarma de larvas.

Por otra parte, luego de la emergencia del adulto desde la pupa, esta pasa los próximos 4 días de vida desarrollándose y aprendiendo habilidades (Johnson, 2010), dado que su única función es la limpieza de su celda (Seeley, 1982), por lo tanto, durante este periodo es clave su desarrollo y aprendizaje. La acetilcolina (ACh) es uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central y se ha demostrado que está involucrada en los procesos de aprendizaje de las abejas melíferas (Gauthier *et al.*, 1992). La acetilcolinesterasa 1 (AChE1) es una enzima clave en la regulación de la neurotransmisión colinérgica, desempeñando un papel fundamental en la degradación del neurotransmisor acetilcolina (Toutant *et al.*,

1988). En estudios hechos por Kim *et al.* (2017), se logró demostrar que, en condiciones de reducción en la entrada de alimento se reduce la postura de la reina y, por ende, ocurre una disminución en la actividad de la cría, esto se ha relacionado con la elevada expresión de la enzima AChE1, la cual a su vez es codificada por el gen *AChE1*. Se sugiere que en particular la expresión de esta enzima podría estar relacionada con factores de estrés que afecten a la cría. Sin embargo, no está claro si la enzima AChE1 se ve afectada por DWV.

Adicionalmente, en insectos sociales como las abejas, la división de tareas y parte del comportamiento tiene estrecha relación con los ritmos circadianos. Se ha comprobado que la expresión de genes reguladores del ritmo circadiano *Period* y *Criptocromo* están influenciados por la edad y/o comportamiento de la abeja y que la expresión del gen *Period* en la cabeza es mayor en abejas de 25 días, en comparación con abejas jóvenes de entre 3 y 7 días (Abreu *et al.*, 2018), lo que sugiere que las abejas nodrizas que pasan tiempo realizando tareas dentro del nido son arrítmicas, pues tienen tareas durante todo el día y no dependen de factores externos, a diferencia de las abejas pecoreadoras que realizan tareas fuera del nido y son dependientes de las condiciones ambientales y del día. Adicionalmente, Słowińska *et al.* (2019) concluyeron en sus investigaciones que la infestación del ácaro *V. destructor* puede alterar varios procesos fisiológicos de la abeja, entre ellos el ritmo circadiano. Estos autores sugieren que la infestación es la acción combinada de este ácaro junto con la inmunosupresión inducida por DWV. Sin embargo, se desconoce si DWV por sí solo podría afectar la expresión del gen *Period*, alterando así el ritmo circadiano y su comportamiento.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio es determinar el impacto del virus de las alas deformadas (DWA-A) en la conducta y en la regulación de genes asociados a nodrizas de la abeja melífera.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Preparación del inóculo**

Se obtuvo un aislado de la variante-A del virus de las alas deformadas (DWV-A) desde colonias infectadas, para ello un grupo de 20 abejas se homogenizó en una

bolsa stomacher con solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés Phosphate Buffered Saline) durante 90 s a alta velocidad en un homogeneizador stomacher 80 (Seward, Londres, Reino Unido).

Las muestras se centrifugaron a 1,500 g durante 10 minutos, seguido de 10,000 g durante otros 10 minutos y ambos a 4 °C. El sobrenadante se purificó por filtración con un filtro de 0.22 µm (PES, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Finalmente, se utilizaron 200 µL del sobrenadante para la extracción de ARN (ácido ribonucleico), la síntesis de ADN complementario y la cuantificación de la carga viral del inóculo.

### **Abejas**

Los ejemplares de nodrizas de *A. mellifera* utilizados en la investigación fueron suministrados por el apiario de la estación experimental "El Nogal" (36 ° 35'58.25 " S - 72 ° 04'51.77 " W), de la Universidad de Concepción, Chillán, Chile. Previo a la selección de la colmena donadora se realizó un análisis sanitario del apiario completo, seleccionando las colmenas con menor carga viral de DWV-A, esto debido a que no se encontraron colmenas libres del virus. Los marcos de cría estaban compuestos solo por cría próxima a nacer, y se mantuvieron en condiciones controladas en una sala de nacimiento (30 °C ± 1; 60% ± 3 HR).

### **Bioensayo**

Un grupo de abejas (n=600) recién emergidas (24 h de edad) fueron cuidadosamente recolectadas, pintadas de color turquesa en su torso e individualmente inoculadas con la suspensión viral anteriormente preparada. En resumen, cada abeja fue inoculada con 5 µL de la suspensión viral ( $1.0 \times 10^{11}$  número de copias genómicas del virus por abeja) y confinadas al azar en jaulas de plástico. Se utilizó un número similar de abejas, que fueron pintadas de color rosado y sin inocular, como control. Luego de 5 días post inoculación (dpi) viral, 200 abejas inoculadas (I-DWV) o 200 abejas no inoculadas (N-DWV), fueron introducidas en una caja de acrílico transparente, el cual en su interior contaba con un marco de abejas, con las siguientes características: este marco estaba cubierto con un 60 % de crías (larva y huevos) y un 60% de abejas nodrizas. Se establecieron tres repeticiones por cada tratamiento. En cada marco contenido en la caja de acrílico,

se seleccionó un área del nido de cría de 660 cm<sup>2</sup> aproximadamente (60 % del marco) y se realizaron observaciones visuales, cada 3 días, de la conducta de las nodrizas pintadas inoculadas y no inoculadas con el virus. Para ello, durante 10 minutos, distribuidos en 3 tiempos (minuto 1, 5 y 9), se registró el número de abejas que se mantenían en el nido de cría. La conducta de cada grupo y repetición fue evaluada por ambos lados de la colmena, lado A y lado B.

En cada día de observación, se retiraron cinco abejas pintadas por colmena de acrílico y tratamiento, para posteriormente cuantificar la expresión génica y la carga viral.

### **Extracción de RNA y cuantificación génica**

Para la cuantificación de la carga viral (DWV) y la expresión génica, se extrajo ARN desde muestras de cinco abejas colectadas en cada caja de acrílico. La extracción de ARN se realizó según lo descrito por Vargas *et al.* (2017). En resumen, cada cuerpo de abeja fue macerado en una solución tampón salina PBS y se colectaron 200 uL del macerado. 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 con un espectrómetro (Infinite 200 PRO NanoQuant, Tecan Group, Männedorf, Suiza). El ARN extraído se utilizó 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. Para cuantificar la carga viral y la expresión de los genes *AChE1* (Acetylcholinesterase) y *Period* (period circadian protein) y los genes codificantes de proteínas OBPs (*AmelOBP5* y *AmelOBP11*) se utilizaron cebadores específicos (Tabla 1). La reacción de qPCR (del inglés polymerase chain reaction quantitative o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) se llevó a cabo utilizando 1x de KAPA SYBR FAST Universal 2x qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras se llevaron a un volumen de reacción de 15 µL, incluidos 20 ng de ADNc, 530 nM de cada cebador y agua de grado molecular filtrado estéril para alcanzar los 15 µL. Las condiciones de reacción térmica que se

utilizaron fueron de: 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s y 72 °C durante 30 s.

Tabla 1. Secuencia de partidores utilizados para análisis de cuantificación de la expresión génica y de la carga viral.

Nombre partidor <sup>1</sup>	Secuencia	Referencia
<i>DWV-A</i>	F-TATCTTCATTAAGCCACCTGGAA R- TTTCTTCATTAAGCCACCTGGAA	Yang <i>et al.</i> , 2005
<i>AmelOBP5</i>	F- ATGCGGAAATCGTGCTTGCA R- TGCCATTACTCACGGGAAGA	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>AmelOBP11</i>	F- TGAGGATGTGGAAGCTACGGAA R- CACGGAGCAATAAACGCTATGG	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>B-actina</i>	F- ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG R- GACCCACCAATCCATACGGA	Yang <i>et al.</i> , 2005
<i>AChE1</i>	F- GATCGACGGCGCTTTCTCG R- GACCCGTGATGTGGAACAAC	Kim <i>et al.</i> , 2023
<i>Period</i>	F- CACTATGTACGGCAGCGATGAA R- ACCACTGCTAAGGTTTTCTGCACTA	Bloch <i>et al.</i> , 2004

<sup>1</sup> *DWV-A*: partidores para el genoma del deformed wing virus-A; *AmelOBP5* y *AmelOBP11*: genes de proteínas de unión de odorantes en abejas melíferas; *B-actina*: gen de referencia endógeno; *AChE1*: gen acetilcolinesterasa 1; *Period*: gen reloj circadiano.

Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y los datos se analizaron con el software MxPro (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). La expresión relativa de cada gen se calculó después de la normalización con un gen endógeno (*β-actina*), como describe Pfaffl (2001). De igual forma, para determinar la carga viral de las abejas se realizó la cuantificación absoluta de *DWV-A*. En resumen, se utilizó una curva estándar que utiliza un producto de PCR purificado (Wizard®VR SV gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI, EE. UU.), perteneciente a la secuencia diana viral. Luego, el amplicón purificado se cuantificó mediante espectrofotometría (EpochTM

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 (del inglés cycle threshold o umbral de ciclo) 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  $\beta$ -actina (Yang *et al.*, 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 de datos**

Para la cuantificación de la carga viral, las diferencias estadísticas en las cargas virales en abejas melíferas fueron estimadas según (1) el estado viral (abejas no inoculadas recolectadas de cuadros que se detectaron con un nivel basal bajo de DWV-A (N-DWV) y aquellas que fueron inoculadas con DWV-A (I-DWV)) y (2) dpi (abejas melíferas de 5 a 14 días post inoculación) mediante ANOVA Factorial. A continuación, se utilizó la prueba HSD (del inglés honestly significant difference o en español: diferencia honesta significativa) de Tukey ( $P < 0,05$ ) para separar las medias entre los tratamientos.

Para la comparación entre los tratamientos de las abejas que se mantenían en el nido de cría primero se sumaron los conteos obtenidos de las 3 repeticiones por tratamiento, correspondientes a colmenas independientes con 200 abejas pintadas cada una ( $n$  total = 600 abejas por tratamiento) los cuales posteriormente se expresaron como proporciones respecto al total inicial de abejas y se analizaron mediante la prueba  $\chi^2$  de Pearson para dos proporciones independientes.

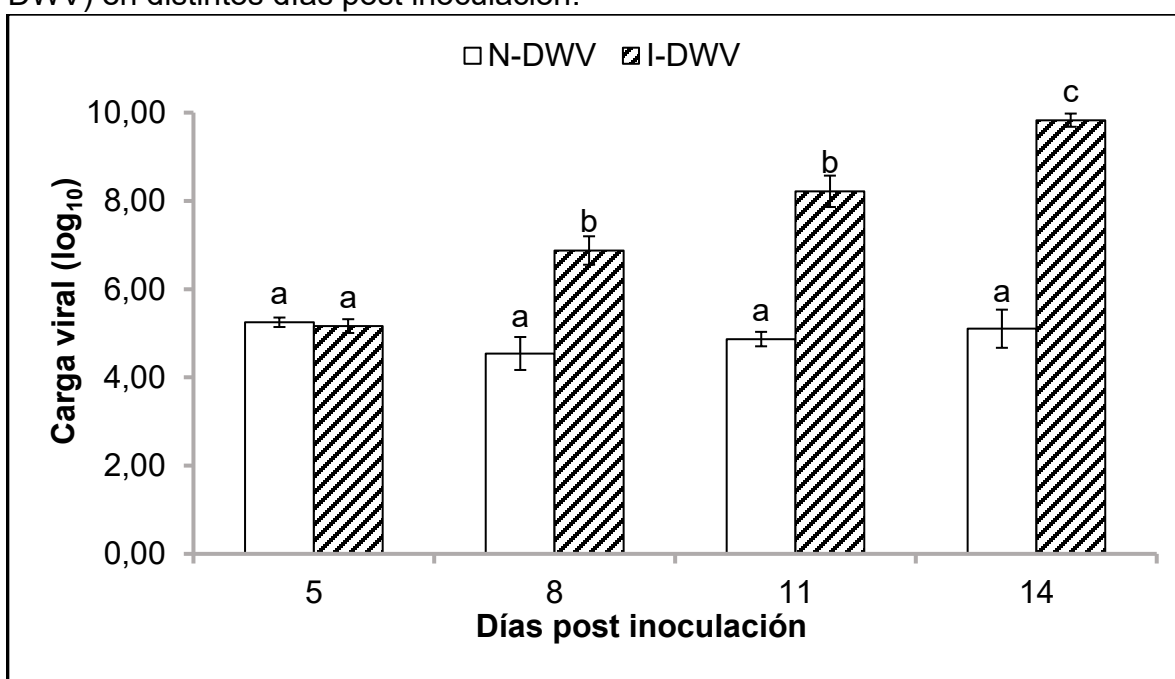
Para el análisis de la expresión de los genes se realizó un análisis de varianza anidado (Nested ANOVA) entre tratamiento (I-DWV y N-DWV) y dpi (5, 8, 11 y 14 días post inoculación) seguido de una prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P = >0.05$ ) para determinar interacción entre las variables.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cuantificación de la carga viral de abejas nodrizas inoculadas y no inoculadas con DWV-A

El análisis de la cuantificación de la carga viral de los tratamientos demostró que en aquellas abejas que fueron inoculadas con la suspensión viral ( $1.0 \times 10^{11}$  número de copias genómicas por abeja) se observó un incremento significativo ( $F= 24,5$ ;  $GL = 3,16$ ;  $P < 0,001$ ) en la carga viral en el tiempo (Figura 1).

Figura 1. Carga viral en abejas nodrizas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.



ANOVA factorial. Carga de DWV-A medida a abejas nodrizas que fueron inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV). Medias ( $\pm$ E.E.) con letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba HSD de Tukey ( $P < 0,05$ ).

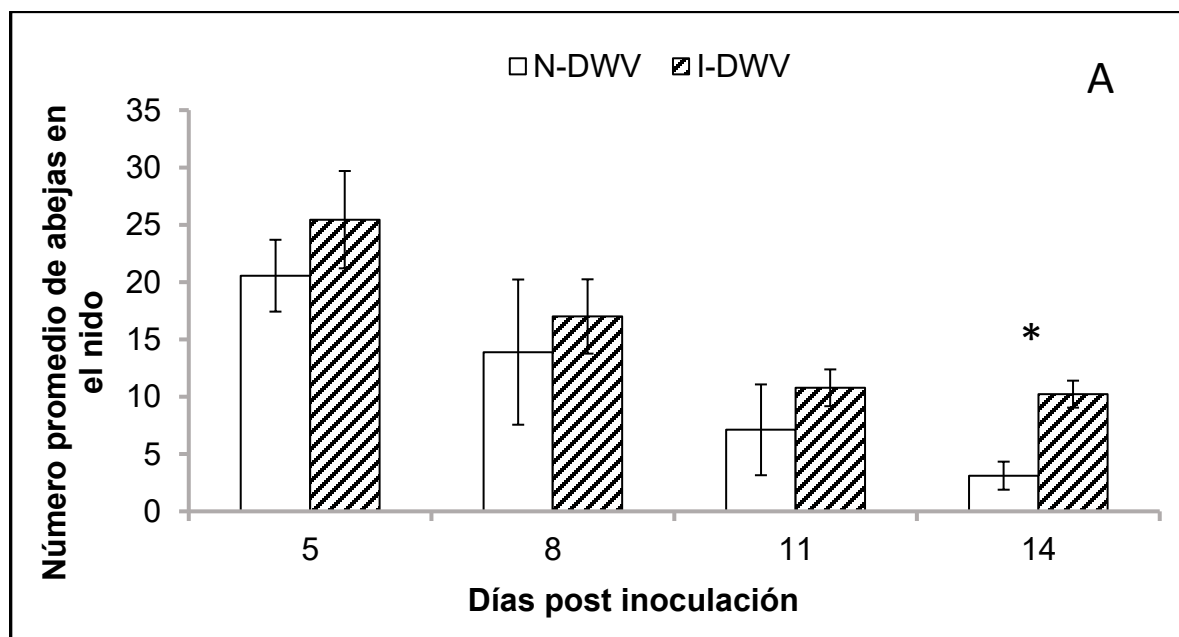
En promedio, al término del ensayo (14 días post inoculación viral), se registró un aumento significativo de la carga viral para abejas inoculadas ( $1 \times 10^{10}$  número de copias genómicas por abeja), en comparación a aquellas abejas que no fueron inoculadas ( $1 \times 10^5$  número de copias genómicas por abeja) (Figura 1). Si bien se determinó que abejas del tratamiento no inoculadas tenían cargas virales entre los  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  número de copias genómicas, estas cargas son consideradas cargas basales de abejas en condiciones de campo (Traniello *et al.*, 2020), en donde el

patógeno no afecta el desarrollo fisiológico y conductual de las colmenas. Por otra parte, el incremento de las cargas virales en las abejas inoculadas (I-DWV) sigue la curva reportada por Silva *et al.* (2021; 2025) en donde la mayor carga detectada fue a partir de los 8 dpi en los tratamientos inoculados con una suspensión viral, en tanto en abejas donde no se inoculó la suspensión viral, la carga del patógeno se mantuvo en cargas basales.

### **Análisis de conducta de abejas nodrizas inoculadas y no inoculadas con DWV-A**

En las observaciones realizadas a las colmenas de acrílico para determinar el efecto de la infección del virus en el número de abejas que permanecían en el nido de cría, en general no hubo diferencias significativas en los días iniciales (5, 8 y 11 dpi) en ambos lados de las colmenas. Sin embargo, se encontró diferencias significativas al día 14 post inoculación ( $\chi^2 = 11,756$ ; GL = 1;  $P < 0,001$ ) para el lado A (Figura 2).

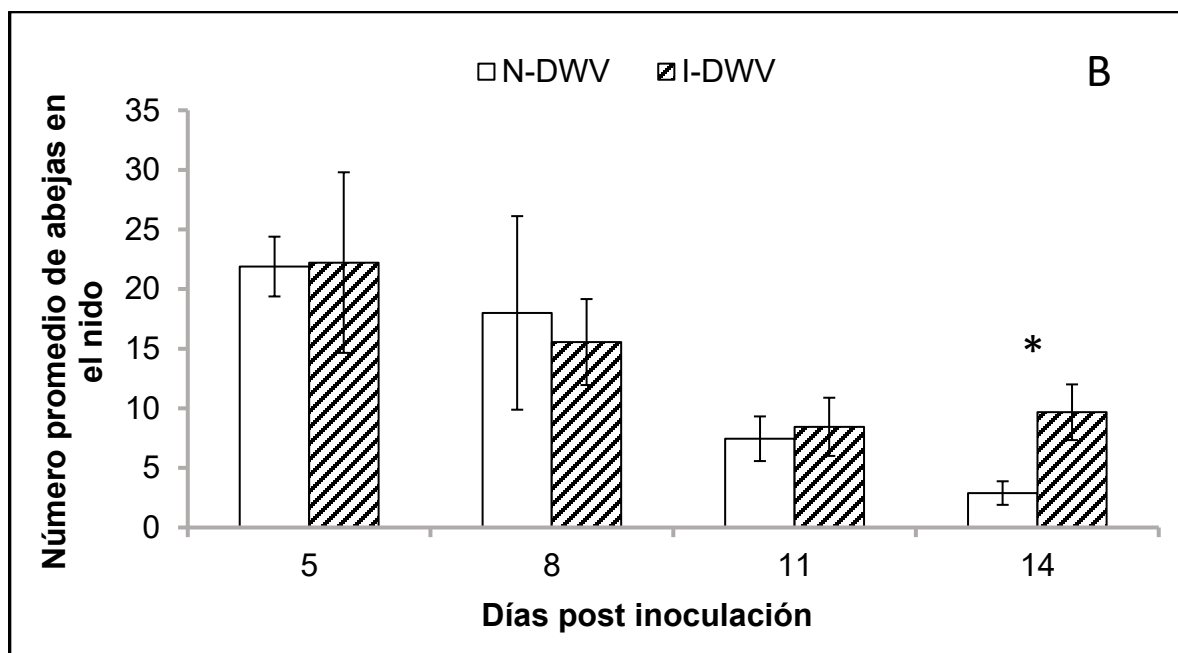
Figura 2. Número promedio de abejas que se mantenía en el nido de cría en el lado A de la colmena en distintos días post inoculación.



Proporción de abejas, inoculados (I-DWV) y no inoculados (N-DWV) con una suspensión viral de la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A), que responden conductualmente dentro del nido de cría operculada y no operculada en lado A. Asterisco sobre las medias ( $\pm$ E.E.) indica diferencia significativa según el análisis de Chi-Cuadrado ( $P < 0,05$ ).

Este comportamiento se repitió en el lado B de los marcos, observándose diferencias significativas el mismo día 14 post inoculación ( $\chi^2 = 11,325$ ; GL = 1;  $P < 0,001$ ) (Figura 3).

Figura 3. Número promedio de abejas que se mantenía en el nido de cría en el lado B de la colmena en distintos días post inoculación.



Proporción de abejas, inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) con una suspensión viral de la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A), que responden conductualmente dentro del nido de cría operculada y no operculada en lado B. Asterisco sobre las medias ( $\pm$ E.E.) indica diferencia significativa según el análisis de Chi-Cuadrado ( $P < 0,05$ ).

En ambos casos, el tratamiento inoculado con la suspensión viral (I-DWV), el día 14 post inoculación presentó 3 veces más abejas que se mantenían en el nido de cría en comparación al tratamiento con abejas no inoculadas (N-DWV). En este sentido, se sabe que DWV causa hinchazón abdominal, deformidades en las alas, parálisis y alteraciones del comportamiento (Lanzi *et al.*, 2006; Benaets *et al.*, 2017; Grozinger *et al.*, 2019), estas alteraciones en la fisiología y anatomía de la abeja melífera provoca sin duda alteraciones en la conducta de esta.

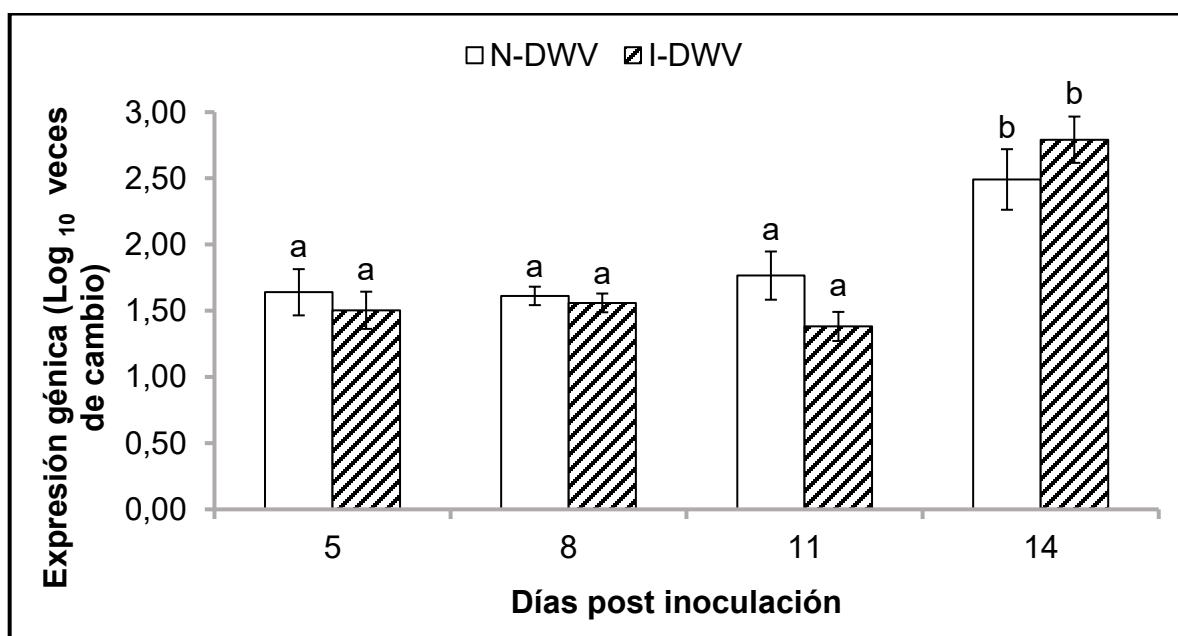
Por lo tanto, se plantea que el virus podría haber generado un debilitamiento en las abejas lo que las mantendría sin realizar tareas normales y estas permanecerían más tiempo en el nido de cría que las abejas sanas, pues estas últimas estarían desarrollando otras tareas necesarias para la supervivencia de la colmena y

normales asociadas a la edad.

### Análisis de expresión génica de abejas nodrizas inoculadas y no inoculadas con DWV-A

En cuanto al análisis de expresión génica del gen *AChE1*, se pudo observar que para ambos tratamientos (I-DWV y N-DWV) la expresión génica fue mayor a los 14 dpi en comparación al resto del ensayo, sin reportar diferencia significativa entre los tratamientos ese mismo día ( $p = 0,185$ ) (Figura 4).

Figura 4. Expresión del gen *AChE1* ( $\log_{10}$  veces de cambio) en abejas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.



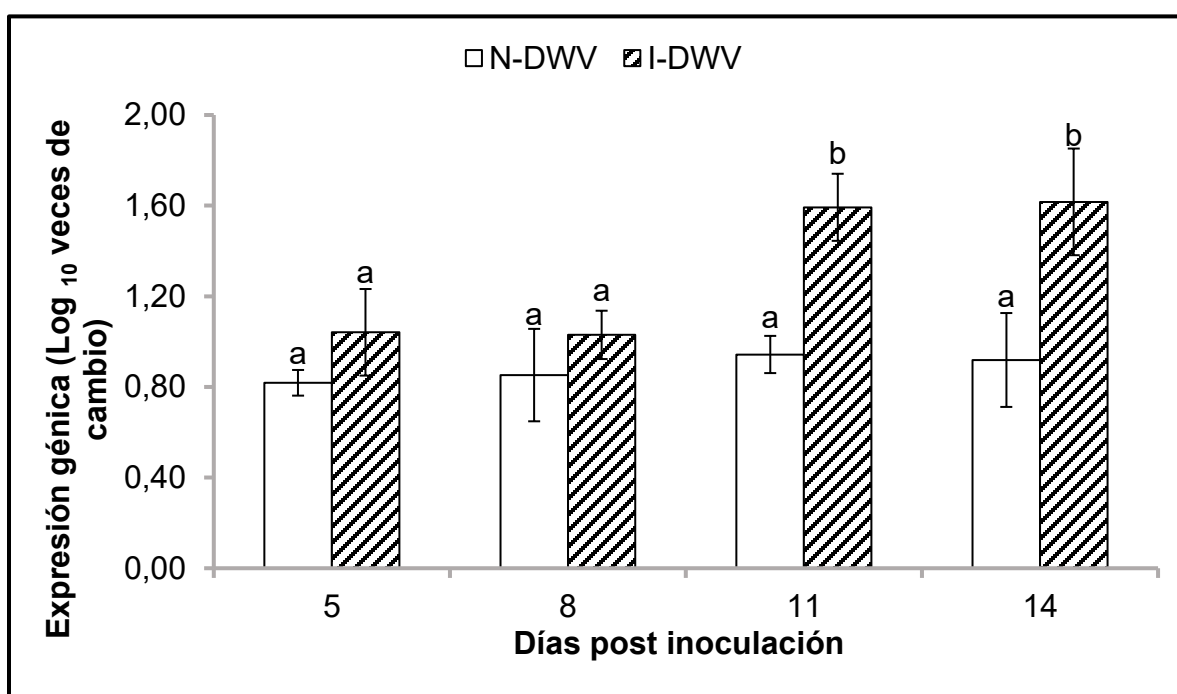
ANOVA Anidado, interacción entre dpi\*tratamiento  $F = 12,931$ ;  $GL = 6,16$ ;  $P < 0.001$ . Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Duncan ( $P < 0,05$ ).

En este sentido, Kim *et al.* (2017), reportaron que la ausencia de larvas dentro de la colmena estaba relacionada con una mayor expresión del gen *AChE1* en nodrizas. Esta interacción estaría evidenciada en el presente estudio, dado que a los 14 dpi se observó que, en los marcos de cría del experimento, las celdas se encontraban operculadas, lo cual eliminaría el estímulo de larvas dentro del marco, pudiendo aumentar la expresión del gen *AChE1* en ambos tratamientos.

Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $F =$

13,94; GL = 1, 16; P = 0,002) en la expresión relativa del gen *Period*. Pero dichas diferencias sólo fueron observadas a los 11 y 14 días post inoculación viral (Figura 5), en donde las abejas inoculadas con DWV-A presentaron una elevada expresión de este gen comparadas con aquellas no inoculadas. Contrario a lo que se esperaba, la expresión de *Period* no fue afectado significativamente por el tiempo de medición del experimento (F = 2,04; GL = 6, 16; P = 0,120).

Figura 5. Expresión del gen *Period* ( $\log_{10}$  veces de cambio) en abejas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.



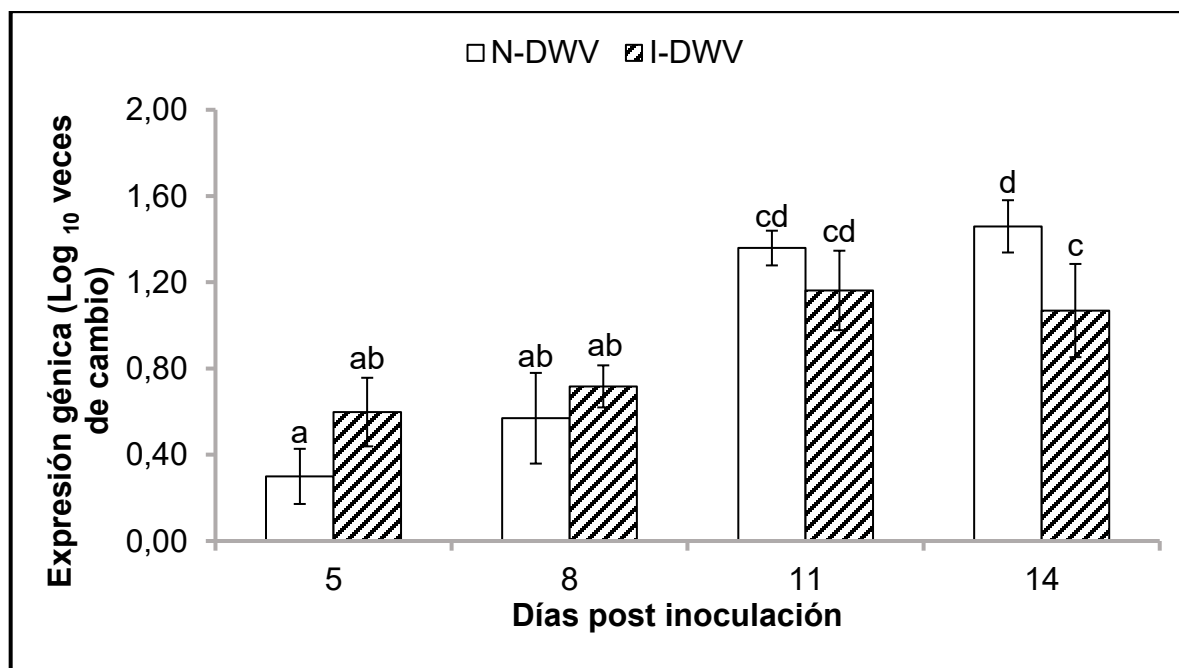
Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Duncan (P < 0,05).

La expresión de este gen está directamente relacionada con la edad de la abeja y asociado con el comportamiento conductual de la misma, se sabe que abejas de entre 3-7 días de nacidas poseen una menor expresión del gen pues estas son arrítmicas, es decir, no dependen de la luz del día para realizar su trabajo diario, a diferencia de las abejas pecoreadoras (Abreu *et al.*, 2018). Por otro lado, en estudios realizados por Traniello *et al.* (2020) lograron evidenciar que las abejas nodrizas infectadas con DWV activaban vías moleculares en el cerebro que estaban asociadas con la transición de nodriza a recolectora, donde se reportó que el

transcriptoma cerebral de una nodriza con altas cargas virales de DWV era similar al de una abeja recolectora con bajas cargas virales, por lo que se postuló como hipótesis que en abejas con altas cargas virales se acelera su maduración conductual, específicamente relacionada con el ciclo circadiano; aunque este sería un fenómeno deficiente conductualmente, esto podría explicar el aumento de la expresión del gen *Period* para el tratamiento inoculado en el presente estudio. Así mismo, otros autores como Benaets *et al.* (2017) informaron que abejas post inoculación con DWV comenzaron a buscar alimento a una edad más temprana que abejas sanas o con cargas virales basales, por lo que se presume que estas abejas estarían presentando una maduración precoz debido a la infección con el virus.

En el análisis de expresión del gen *AmeIOBP5* se observó un aumento de la expresión, siendo mayor a los 11 y 14 dpi para el tratamiento N-DWV en comparación a los días iniciales del experimento (5 y 8 dpi respectivamente). En adición, al 14 dpi la expresión génica varió significativamente entre tratamientos (Figura 6), siendo menor en las abejas inoculadas (I-DWV).

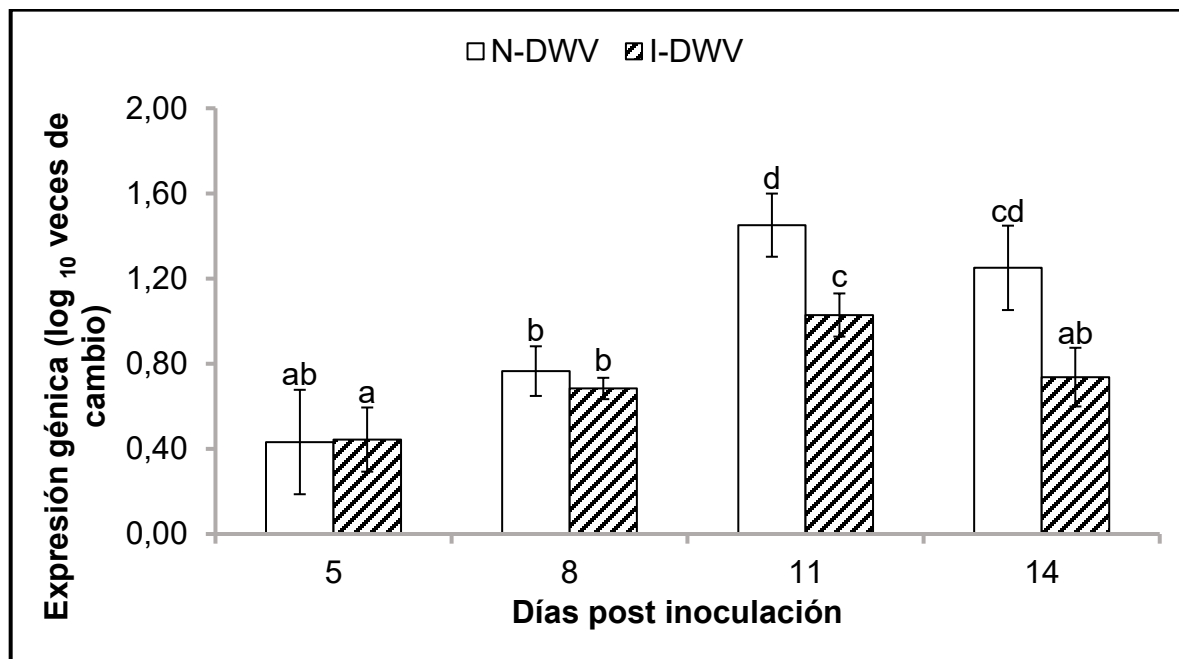
Figura 6. Expresión del gen *AmeIOBP5* ( $\log_{10}$  veces de cambio) en abejas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.



ANOVA Anidado, interacción entre dpi\*tratamiento  $F = 8,210$ ;  $GL = 6,16$ ;  $P < 0,001$ . Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, para el gen *AmeIOBP11*, codificante para la proteína OBP 11, se observó diferencias significativas entre tratamientos a los 11 y 14 dpi, reduciéndose la expresión del gen para el tratamiento I-DWV, en comparación al tratamiento N-DWV (Figura 7).

Figura 7. Expresión del gen *AmeIOBP11* ( $\log_{10}$  veces de cambio) en abejas inoculadas (I-DWV) y no inoculadas (N-DWV) en distintos días post inoculación.



ANOVA Anidado, interacción entre dpi\*tratamiento  $F = 5,741$ ;  $GL = 6,16$ ;  $P = 0.002$ . Letras diferentes indican diferencia significativa para cada media según la prueba de Duncan ( $P < 0,05$ ).

Se sabe que las proteínas OBP5 y OBP11 son mayormente producidas en obreras que trabajan dentro de la colmena realizando tareas de nodrizas. El pico de expresión de estas proteínas se puede observar en abejas de entre 10 a 15 días de edad (Zhao *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015). Así mismo, Silva *et al.* (2021), reportó que altas cargas virales de DWV-A en la antena de nodrizas de mediana edad, específicamente entre 8 a 23 días, disminuían significativamente la expresión de varias OBP, entre ellas la OBP 5 y la OBP 11, lo que respalda lo observado en este ensayo, sin embargo, si este mismo se pudiera prolongar en el tiempo, posiblemente se podría observar de mejor manera el efecto del virus.

## CONCLUSIONES

1. La conducta de las nodrizas de *A. mellifera* se ve afectada en la medida que aumentan las cargas virales de la variante A del virus de las alas deformadas.
2. La expresión del gen *AchE1* no se ve afectado por altas cargas de la variante A del virus de las alas deformadas en abejas nodrizas.
3. La expresión del gen *Period* se incrementa a medida que aumentan las cargas virales de la variante A del virus de las alas deformadas en abejas nodrizas.
4. La expresión de los genes *AmelOBP5* y *AmelOBP11* disminuye a medida que aumentan las cargas virales de la variante A del virus de las alas deformadas en abejas nodrizas.

## REFERENCIAS

1. Abreu, F.C.P., F.C.P. Freitas, and Z.L.P. Simões. 2018. Circadian clock genes are differentially modulated during the daily cycles and chronological age in the social honeybee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 49: 71–83.
2. Benaets K., A. Van Geystelen, D. Cardoen, L. De Smet, D.C. de Graaf, L. Schoofs, M.H. Larmuseau, L.E. Brettell, S.J. Martin and T. Wenseleers. 2017. Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proc. R. Soc. B.* 284: 20162149.
3. Bloch, G., J.P. Sullivan, and G.E. Robinson. 2004. Juvenile hormone and circadian locomotor activity in the honey bee *Apis mellifera*. *J. Insect Phy.* 48(12): 1123–1131.
4. Bonilla, M.A. 2012. El servicio ecosistémico de polinización prestado por las abejas. pp. 1-103. En: G. Nates-Parra (Ed.). *Iniciativa colombiana de polinizadores (ICPA), Capítulo Abejas*. Universidad Nacional de Colombia, Instituto Humboldt. Bogotá, Colombia.
5. Bortolotti, L. and C. Costa. 2014. Chemical communication in the honeybee society. pp: 147-211. In: C. Mucignat-Caretta (Ed.). *Neurobiology of chemical communication*. CRC Press/Taylor & Francis. Boca Raton, FL.
6. Brunet, J. and F.P. Fragoso. 2024. What are the main reasons for the worldwide decline in pollinator populations? *CABI Reviews*. 19(1): 1-11.

7. Brutscher, L.M., A.J. McMenamin and M.L. Flenniken. 2016. The Buzz about Honeybee Viruses. *PLoS Pathog.* 12(8): e1005757.
8. Foret, S. and R. Maleszka. 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect honeybee ( *Apis mellifera* ). *Genome Res.* 16: 1404–1413.
9. Gauthier, L., D. Tentcheva, M. Tournaire, B. Dainat, F. Cousserans, M.E. Colin and M. Bergoin. 2007. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 38(5): 426–435.
10. Gauthier, M., L.P. Belzunces, A. Zaoujal, M.E. Colin, D. Richard. 1992. Modulatory effect of learning and memory on honeybee brain acetylcholinesterase activity. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 103: 91–95.
11. Grozinger, C.M. and M.L. Flenniken. 2019. Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annu. Rev. Entomol.* 64: 205–226.
12. Hristov, P., R. Shumkova, N. Palova and B. Neov. 2020. Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Vet Sci.* 7(4): 166.
13. Johnson, B.R. 2010. Division of labor in honeybees: Form, function, and proximate mechanisms. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64: 305–316.
14. Kim, Y.H., J.H. Kim, K. Kim, and S.H. Lee. 2017. Expression of acetylcholinesterase 1 is associated with brood rearing status in the honeybee, *Apis mellifera*. *Sci. Rep.* 7: 39864.
15. Lanzi, G., J.R. de Miranda, M.B. Boniotti, C.E. Cameron, A. Lavazza, L. Capucci, S.M. Camazine, C. Rossi. 2006. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* 80: 4998–5009.
16. Leal, W.S. 2013. Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 373–391.
17. Martin, S.J., J. Hardy, E. Villalobos, R. Martin-Hernández, S. Nikaido, M. Higes. 2013. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environ. Microbiol. Rep.* 5(4): 506-510.

18. Martin, S.J., A.C. Highfield, L. Brettell, E.M. Villalobos, G.E. Budge, M. Powell, S. Nikaido, D. Schroeder. 2012. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science*. 336(6086): 1304-130
19. Mordecai, G.J., L. Wilfert, S.J. Martin, I.M. Jones, D.C. Schroeder. 2016. Diversity in a honey bee pathogen: First report of a third master variant of the deformed Wing Virus quasispecies. *ISME J*. 10(5): 1264–1273.
20. Nowak, M.A., C.E. Tarnita, and E.O. Wilson. 2010. The evolution of eusociality. *Nature*. 466: 1057-1062.
21. Paoli, M. and G.C. Galizia. 2021. Olfactory coding in honeybees. *Cell. Tissue. Res*. 383: 35–58.
22. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9): e45-e45.
23. Pelosi, P., M. Calvello, L. Ban. 2005. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. *Chem. Senses*. 30 (1): 291–292.
24. Ramsey, S.D., R. Ochoa, G. Bauchan, C. Gulbranson, J.D. Mowery, A. Cohen, D. Lim, J. Joklik, J.M. Cicero, J.D. Ellis, D. Hawthorne, and D. van Engelsdorp. 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *PNAS*. 116(5): 1792–1801.
25. Richards, M.H. 2019. Social trait definitions influence evolutionary inferences: a phylogenetic approach to improving social terminology for bees. *Curr. Opin. Insect Sci*. 34: 97–104.
26. 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. *J. Apic. Res*. 59(1): 63-68.
27. Sandoz, J.C. 2007. Understanding the logics of pheromone processing in the honeybee brain: from labeled-lines to across-fiber patterns. *Front. Behav. Neurosci*. 1: 156.
28. Seeley, T.D. 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol*. 11. 287–293.

29. Silva, D., F. Becerra, S. Salazar, N. Arismendi, J. Alveal, R. Ceballos, N. Zapata and M. Vargas. 2025. Deformed Wing Virus-Induced Changes in Honeybee Reception and Preference for Pollen Scents. *Res. Square*. 56(4): 71.
30. Silva, D., N. Arismendi, J.P. Alveal, R. Ceballos, N. Zapata, and M. Vargas. 2024. Nurse Honeybee Behavior and Sensorial-Related Genes are Altered by Deformed Wing Virus Variant A. *Insects* 15(2): 80.
31. Silva, D., R. Ceballos, N. Arismendi, A. Dalmon, and M. Vargas. 2021. Variant A of the Deformed Wings Virus Alters the Olfactory Sensitivity and the Expression of Odorant Binding Proteins on Antennas of *Apis mellifera*. *Insects* 12: 895.
32. Słowińska, M., J. Nynca, B. Bąk, J. Wilde, M. Siuda and A. Ciereszko. 2019. 2D-DIGE proteomic analysis reveals changes in haemolymph proteome of 1-day-old honeybee (*Apis mellifera*) workers in response to infection with *Varroa destructor* mites. *Apidologie*. 50: 632–656.
33. Toutant, J.P., M. Arpagaus, and D. Fournier. 1988. Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*-Quaternary structure and hydrophobic character. *J. Neurochem*. 50: 209–218.
34. Traniello, I.M., S.A. Bukhari, J. Kevill, A.C. Ahmed, A.R. Hamilton, N.L. Naeger, D.C. Schroeder, and G.E. Robinson. 2020. Meta-analysis of honey bee neurogenomic response links Deformed wing virus type A to precocious behavioral maturation. *Sci. Rep*. 10: 3101.
35. 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.
36. Zhao, H., Y. Luo, J. Lee, X. Zhang, Q. Liang, 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.