

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE *VARROA DESTRUCTOR* EN
DIFERENTES REGIONES DE CHILE Y SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN
DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV) EN *APIS MELLIFERA*.**

POR

JAVIER IGNACIO VÁSQUEZ ZAPATA

**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

**IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE *VARROA DESTRUCTOR* EN
DIFERENTES REGIONES DE CHILE Y SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN
DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV) EN *APIS MELLIFERA*.**

POR

JAVIER IGNACIO VÁSQUEZ ZAPATA

**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. 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.....	4
Resultados y discusión.....	9
Conclusiones.....	14
Referencias.....	15

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Patrones RFLP de la secuencia Cox1 representando los haplotipos de <i>V. destructor</i>	10
Figura 2 Carga viral de la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A) en <i>A. mellifera</i> provenientes de apiarios de diferentes regiones de Chile	12
Figura 3 Carga viral de la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A) en <i>A. mellifera</i> y haplotipos de <i>V. destructor</i>	13
Figura 4 Detección de cadena negativa de DWV-A	14
Tabla 1 Partidores utilizados para análisis de cuantificación génica y cuantificación de carga viral	6
Tabla 2 Haplotipos de <i>V. destructor</i> en diferentes regiones del país	10
Tabla 3 Alineamiento de secuencias de <i>V. destructor</i> correspondiente al gen Cox1 según Blast (NBCI).....	11

IDENTIFICACION DE HAPLOTIPOS DE *VARROA DESTRUCTOR* EN DIFERENTES REGIONES DE CHILE Y SU RELACION CON LA INFECCION DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV) EN *APIS MELLIFERA*.

IDENTIFICATION OF *VARROA DESTRUCTOR* HAPLOTYPES IN DIFFERENT REGIONS OF CHILE AND THEIR RELATIONSHIP WITH DEFORMED WING VIRUS (DWV) INFECTION IN *APIS MELLIFERA*

Palabras índice adicionales: Ácaro ectoparásito, abejas melíferas, virus

RESUMEN

El ácaro *Varroa destructor* es un ectoparásito que infesta a *Apis mellifera* L., y es el principal vector del Virus de alas deformadas (DWV) en abejas melíferas. Solo dos haplotipos del ácaro parasitan a *A. mellifera*, el haplotipo japonés (J) y el haplotipo coreano (K). Se desconoce la relación entre los haplotipos de *V. destructor* presentes en Chile, y las variantes de DWV (DWV-A y DWV-B) que infectan a las abejas. Se colectaron muestras de abejas melíferas y *V. destructor*, en colmenas de diferentes regiones: Coquimbo, Metropolitana, Ñuble y Los Ríos. El análisis de ADN mediante PCR-RFLP mostró que, en Coquimbo y Los Ríos, el 100 % de los ácaros correspondían al haplotipo J, mientras que en la región Metropolitana y Ñuble estaban presentes ambos haplotipos, predominando el haplotipo J con 97,5 % y 92,5 %, respectivamente. En un segundo muestreo se colectaron abejas parasitadas con el ácaro, se determinó los haplotipos y mediante qPCR las variantes y cargas virales de DWV. Solo fue detectada DWV-A en abejas parasitadas por ambos haplotipos. Las abejas parasitadas por ácaros de haplotipo J presentaron mayor carga viral que las abejas parasitadas por ácaros de haplotipo K. La cadena negativa de DWV-A solo se detectó en ácaros del haplotipo J, demostrando que esta variante se replica en *V. destructor*. La variante DWV-B no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas.

SUMMARY

The *Varroa destructor* mite is an ectoparasite that infests *Apis mellifera* L. and is the

primary vector of Deformed Wing Virus (DWV) in honeybees. Only two haplotypes of the mite parasitize *A. mellifera*, the Japanese haplotype (J) and the Korean haplotype (K). The relationship between the *V. destructor* haplotypes in Chile and the DWV variants (DWV-A and DWV-B) infecting bees is unknown. Honeybees and *V. destructor* samples were collected from hives in different regions: Coquimbo, Metropolitan, Ñuble, and Los Ríos. DNA analysis using PCR-RFLP showed that, in Coquimbo and Los Ríos, 100 % of the mites were of the J haplotype. In contrast, both haplotypes were present in the Metropolitan and Ñuble regions, with the J haplotype predominating at 97,5 % and 92,5 %, respectively. In a second sampling, parasitized bees were collected, haplotypes were determined, and DWV variants and viral loads were assessed using qPCR. Only DWV-A was detected in bees parasitized by both haplotypes. Bees parasitized by mites of haplotype J had a higher viral load than bees parasitized by mites of haplotype K. The negative strand of DWV-A was only detected in mites of haplotype J, demonstrating that this variant replicates in *V. destructor*. DWV-B was not detected in any of the analyzed samples.

INTRODUCCIÓN

La abeja europea *Apis mellifera* L. es un agente polinizador universal con gran eficacia, lo cual la convierte en un factor clave para la agricultura mundial. Es por esto que las abejas cumplen un rol crucial en la producción de alimentos para el consumo humano (Aizen *et al.*, 2008; Aizen y Harder, 2009; Garibaldi *et al.*, 2013). Sin embargo, estos insectos son afectados por distintos parásitos y patógenos que afectan su salud e incrementan la pérdida de colonias en la temporada de invierno.

Entre los numerosos patógenos que afectan la salud de *A. mellifera* (Genersch, 2010) se encuentra el ácaro ectoparásito *Varroa destructor*, el cual se reproduce en las celdas de cría, alimentándose del cuerpo graso de *A. mellifera* en distintos estadios de su crecimiento (Ramsey *et al.*, 2019). *V. destructor* originalmente parasitaba solo a *Apis cerana* en el este asiático, pero debido al alto índice de polinización y producción de miel de *A. mellifera*, esta abeja fue introducida en la agricultura en diversas regiones del mundo (Moritz *et al.*, 2005; Pirk *et al.*, 2016), lo que propició el contacto con las abejas endémicas del este de Asia y sus ácaros

parasitarios (Anderson y Morgan, 2007).

Se estima que a mediados del siglo veinte *V. destructor* realizó un salto de hospedero a *A. mellifera*, propagándose alrededor del mundo (Rosenkranz *et al.* 2010), convirtiéndose en una gran amenaza para la agricultura y producción de alimentos a nivel mundial (Anderson y Trueman, 2000; Rosenkranz *et al.*, 2010; Thoms *et al.*, 2019).

En las colmenas existen variaciones en los rangos de infestación provocados por *V. destructor* (Mortensen *et al.*, 2015). Sin embargo, aunque no hay un consenso, la genética de este ácaro y de *A. mellifera* se consideran los principales factores de esta variación (Guzmán-Novoa *et al.*, 2012; Mortensen *et al.*, 2015).

Anderson y Trueman (2000) evaluaron la morfología y genética de 18 haplotipos de *V. destructor* de distintas regiones del mundo, pero solamente el haplotipo coreano (K) y japonés (J) fueron reportados parasitando *A. mellifera*.

Se ha reportado que el haplotipo K se diseminó por Asia del norte, medio oriente, África, Europa, Centroamérica y norte América. Por otra parte, el haplotipo J se propagó por Asia del sur, Tailandia y Sudamérica (Anderson y Trueman, 2000; Solignac *et al.*, 2005; Navajas *et al.*, 2009), actuando como vectores de múltiples virus (Genersch y Aubert, 2010), principalmente el virus de las alas deformadas (DWV) (Amdam *et al.*, 2004).

Tanto el ácaro *V. destructor*, como DWV son causantes de grandes pérdidas de colonias, principalmente en la temporada de invierno en todo el mundo (Carreck *et al.*, 2010; Genersch *et al.*, 2010; Guzmán-Novoa *et al.*, 2010; Le Conte *et al.*, 2010; McMahon *et al.*, 2016; Natsopoulou *et al.*, 2017).

El virus de las alas deformadas (DWV) es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, que pertenece a la familia *Iflaviridae* del orden *Picornavirales* (Bailey y Ball, 1991). Los síntomas que se observan en las abejas infectadas por este virus incluyen abdómenes inflamados en abejas adultas y alas deformadas. Además, se ha observado que la infestación con el DWV afecta el proceso de memorización y altera el sistema nervioso central y periférico de *A. mellifera* (Lanzi *et al.*, 2006; Benaets *et al.*, 2017; Grozinger y Flenniken, 2019). En ausencia del ácaro, DWV se transmite horizontalmente (Yue *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006;

Gisder *et al.*, 2009) y verticalmente (Yue *et al.*, 2007; De Miranda y Fries, 2008). Estos métodos de propagación principalmente conllevan a infecciones de carácter asintomático (De Miranda y Genersch, 2010; Forsgren *et al.*, 2012).

Se han reportado diferentes variantes de DWV (DWV-A, DWV-B, y DWV-C) (Wilfert *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2012; Mordecai *et al.*, 2016; Ryabov *et al.*, 2019). Sin embargo, en Chile solo se han reportado las variantes DWV-A y DWV-B (Riveros *et al.*, 2019). A la fecha aún se discute si estas variantes difieren en su virulencia para las colmenas y si las distintas variantes del virus se replican tanto en *A. mellifera* como en *V. destructor*.

Diversos estudios que utilizaron distintos enfoques moleculares basados en PCR de transcripción inversa (RT-PCR) reportaron la cadena negativa de DWV en ácaros, la cual correspondía a la variante DWV-B, lo que indicaría la replicación activa de DWV en el ácaro (Gisder *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2016; Gusachenko *et al.*, 2020; Annoscia *et al.*, 2019). Por otra parte, Gisder y Genersch (2020) demostraron, mediante análisis de hibridación *in situ* con fluorescencia, la infección de DWV-B en distintos tejidos de *V. destructor*, pero no la presencia de DWV-A. Además, se demostró que DWV-B es más virulento que DWV-A para las colonias de abejas en Europa (Gisder *et al.*, 2018; McMahon *et al.*, 2016; Natsopoulou *et al.*, 2017). Sin embargo, se desconoce si existe una relación entre: los haplotipos del parásito y la replicación de las diferentes variantes del virus de las alas deformadas en el ácaro.

Dado los antecedentes presentados, el objetivo principal de esta investigación fue identificar los haplotipos de *V. destructor* presente en los apiarios chilenos y determinar la relación entre haplotipos y la infección por DWV en abejas.

MATERIALES Y METODOS

Colección de muestras y diseño de ensayos experimentales

Las muestras de *A. mellifera* y *V. destructor* fueron suministradas por apicultores de territorios de la zona norte, centro y sur del país. Las cuales correspondieron a las regiones de Coquimbo; Metropolitana; Ñuble y Los Ríos. Para el análisis de identificación de haplotipo de *V. destructor* se extrajo ADN de 40 ácaros al azar,

provenientes de cada región. En un siguiente análisis se extrajo ARN para la cuantificación de la carga viral de abejas de cada región mediante qPCR y se determinó la variante del DWV presente en las colmenas utilizando los partidores descritos por McMahon *et al.* (2016).

Posteriormente, en un segundo muestreo se colectaron individualmente 70 abejas parasitadas por el ácaro en la región de Ñuble y 80 de la región de Los Ríos, a fin de relacionar directamente el haplotipo del ácaro, la carga y variante viral de DWV en cada ácaro y su abeja parasitada. Para esto, se extrajo el ARN de las abejas para cuantificar la carga viral e identificar la variante del DWV, luego a los ácaros asociados se les extrajo el ADN para la identificación de haplotipo y ARN para la cuantificación de la carga viral e identificación de la variante de DWV. De estas muestras se seleccionaron 10 de cada haplotipo (J y K) para detectar la cadena negativa correspondiente a DWV y determinar si existe replicación viral dentro del ácaro.

Extracción de ADN e identificación de haplotipo por RFLP

Para identificar los haplotipos K y J de *V. destructor*, se utilizó el marcador molecular RFLP para el estudio de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. Para esto, se extrajo el ADN total de *V. destructor* utilizando el kit comercial E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit, siguiendo el protocolo del fabricante, el ADN extraído fue almacenado a -80 °C. Posteriormente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando la región mitocondrial citocromo oxidasa 1 (Cox1), utilizando los partidores específicos diseñados por Solignac *et al.* (2005); F- 5'-TAC AAA GAG GGA AGA AGCAGCC-3' y R-5'-GCC CCT ATT CTT AAT ACA TAG TGA AAATG-3' (Tabla 1). La mezcla de PCR contenía 1 µM de ADN genómico, 0,5 µM del partidor oligonucleótido y 12,5 µM de Dream Taq Green PCR Máster Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Berlin, Alemania) en un volumen total de 25 µM. La condición de ciclos de PCR se realizó según lo descrito por Gajić *et al.* (2013). Luego, los fragmentos generados fueron tratados por una enzima de restricción. En resumen, el mix de digestión enzimática contuvo 10 µM del PCR mix, 16 µM de agua libre de nucleasas, 10 µM de 10 X Buffer *SacI* y 3 µM de la enzima *SacI* (Thermo Scientific, USA). La mezcla se incubó a 37 °C por 1 hora, el producto se

cargó en un gel de TBE con agarosa al 1 % y se visualizó con luz ultravioleta. Para una identificación positiva, se consideraron dos fragmentos (128/124 bp y 252/256 bp) para el haplotipo J y un solo fragmento (376 bp) para el haplotipo K (Solignac *et al.*, 2005).

Tabla 1. Partidores utilizados para análisis de cuantificación génica y cuantificación de carga viral.

Nombre partidor	Secuencia	Referencia
SACI	F- TAC AAA GAG GGA AGA AGCAGCC R-GCC CCT ATT CTT AAT ACA TAG TGAAAATG	Solignac <i>et al.</i> , 2005
Adapter-DWV CP (4917-4939), F	CTTGGTTAGCTGTGTTGCAGTTGCTGTAGTCA AGCGGTTACTTGAG	Ryabov <i>et al.</i> , 2014
Adapter-VDV-1 CP (4890-4912), F	CTTGGTTAGCTGTGTTGCAGTTGCTGTAGTTA AGCGGTTATTAGAA	Ryabov <i>et al.</i> , 2014
- Adapter, F - DWVCP (5013-4993), R	F- CTTGGTTAGCTGTGTTGCAGTTG R- GGAGCTTCTGGAACGGCAGGT	Ryabov <i>et al.</i> , 2014
- Adapter, F -VDV-1 CP (4986-4966), R	F- CTTGGTTAGCTGTGTTGCAGTTG R- GGTGCTTCTGGAACAGCGGAA	Ryabov <i>et al.</i> , 2014
- DWV-F2MOD - DWV-R2a	F - TATCTTCATTAAAGCCACCTGGAA R – TTTCTTCATTAAGTGTGTCGTTGAT	McMahon <i>et al.</i> , 2016
-VDV-F2 -VDV-R2a	F-TATCTTCATTAAAACCGCCAGGCT R- CTTCTTCATTAAGTGTGTCGTTGAT	McMahon <i>et al.</i> , 2016
- β -actin F - β -actin R	F- ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG R-GACCCACCAATCCATACGGA	Yang <i>et al.</i> , 2005

Los fragmentos de ADN amplificado fueron enviados a secuenciar al laboratorio de secuenciación automática de la Universidad Católica de Chile, Santiago. Una vez obtenida la secuencia, estas fueron evaluadas mediante la comparación de nucleótidos mediante un alineamiento múltiple con secuencias tipo obtenidas de NCBI. El haplotipo J y haplotipo K de *V. destructor* fueron identificados positivamente mediante la presencia de la secuencia de la región de corte de la enzima de restricción *SacI* (Introvergen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) con puntos de reconocimiento 5'...GAGCTC...3' y 3...CTCGAG...5' (Anderson y Fuchs, 1998).

Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la cuantificación de la carga viral (DWV) se extrajo el ARN total de individuos adultos de *A. mellifera* y de sus ácaros montados, que fueron colectados en cada punto de muestreo. En resumen, las abejas y ácaros fueron maceradas individualmente en PBS, posteriormente se colectaron 200 µL y 100 µL del macerado de abejas y varroa, respectivamente y se utilizaron para la extracción de ARN. La extracción de 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 posteriormente para la síntesis de la primera cadena de ADNc, mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa M-MLV (Introvergen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

Análisis de carga viral

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

72 °C durante 30 s. Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

Para determinar la carga viral en cada abeja y Varroa se realizó la cuantificación absoluta de DWV-A. En resumen, se utilizó una curva estándar que usa un producto de PCR purificado (Wizard®VR SV gel and PCT clean-up system, Promega, Madison, WI, EE. UU.), perteneciente a la diana viral. A continuación, el amplicón purificado se cuantificó mediante espectrofotometría (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, RR. UU.) para calcular el número de copias del virus, 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. Consecutivamente, los valores de Ct se representaron frente a los valores del número de copias ($\log_{10}$). 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 β - actina (Yang *et al.*, 2005). Luego, los datos se expresaron como el número de copias de DWV-A por muestra considerando las diluciones que se realizaron en la síntesis de ADNc y la reacción de qPCR.

Identificación y cuantificación de la cadena negativa de DWV

Para identificar y cuantificar la cadena negativa del DWV, tanto en abejas como en ácaros, el ARN extraído se utilizó para la síntesis de ADNc según las recomendaciones de Ryabov *et al.* (2014). En resumen, la síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando la enzima transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante, utilizando los partidos específicos para la cadena negativa de ARN de DWV-A (Tabla 1). Luego para la cuantificación de la hebra negativa se utilizó 1x de KAPA SYBR FAST Universal 2x qPCR Máster Mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras se llevaron a un volumen de reacción de 15 μ L, incluidos 20 ng de ADNc, 530 nM de cada cebador específico para la detección de la hebra negativa (Tabla 1) y agua de grado molecular filtrada estéril, para alcanzar los 15 μ L.

Análisis estadístico

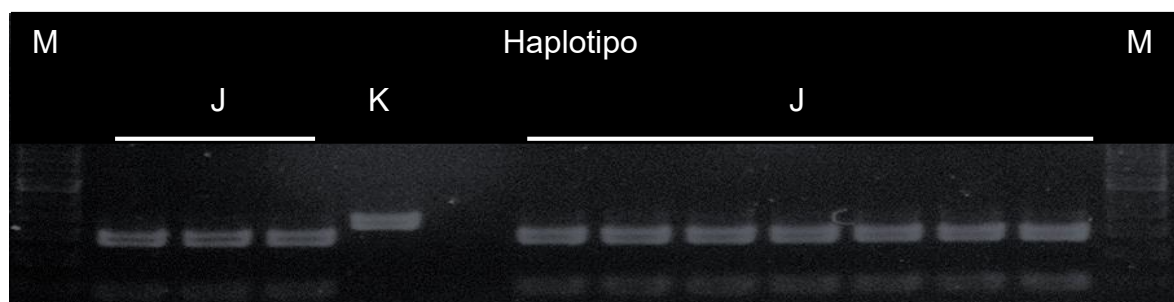
Las diferencias estadísticas en las cargas virales en las abejas se estimaron mediante ANOVA. Luego se utilizó la prueba HSD de Tukey ($p < 0,05$) para separar las medias entre los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de haplotipos de *V. destructor*, utilizando el marcador RFLP, indicó una predominancia en la distribución del haplotipo J por sobre el haplotipo K (Figura 1). En efecto, en las regiones de Coquimbo (n=40 ácaros) y Los Ríos (n=40), el 100 % de las muestras de *V. destructor* correspondieron al haplotipo J, mientras que en las regiones Metropolitana y Ñuble están presentes ambos haplotipos, donde el 97,5 % y 92,5 % corresponden al haplotipo J y el 2,5 % y 7,5 % al haplotipo K, respectivamente (Tabla 2). En cuanto al porcentaje de infestación del ácaro sobre las colmenas analizadas, el mayor índice se reporta en la región de Coquimbo (14,9 %), mientras que el menor índice lo presenta la región de los Ríos (3,8 %), ambos presentando el 100 % de muestras de ácaros identificados como haplotipo J (Tabla 2), mientras que el haplotipo K solo se identificó en las regiones Metropolitana y Ñuble, con baja prevalencia.

En un estudio previo, el 95 % de los ácaros provenientes de Chile, (n=128) correspondieron al haplotipo K (Solignac *et al.*, 2005). Estudios similares realizados en distintas provincias de Argentina indican que el 100 % de sus muestras corresponden al haplotipo K (Maggi *et al.*, 2012; Muntaabski *et al.*, 2020), al igual que lo reportado en Uruguay (Mendoza *et al.*, 2020). Con las múltiples entradas de colonias provenientes de distintas partes del mundo a Sudamérica la distribución de las poblaciones de haplotipos de *V. destructor* puede variar en el tiempo, como lo reportado en Brasil, en donde previamente el haplotipo J era el más prevalente (Garrido *et al.*, 2003). En estudios posteriores, se demostró la predominancia del haplotipo K en regiones con distintas características climáticas y geográficas a lo largo de Brasil (Pinto *et al.*, 2022; Strapazzon *et al.*, 2009), exceptuando áreas con barreras geográficas que probablemente han retrasado o impedido la diseminación del haplotipo K.

Figura 1. Patrones RFLP de la secuencia Cox1 representando los haplotipos de *V. destructor*.



Dos bandas correspondientes al haplotipo J (250 y 120 bp) y banda única correspondiente al haplotipo K (370 bp). M:100 bp ladder

Tabla 2. Haplotipos de *V. destructor* en diferentes regiones del país.

Región	N.º Colmenas	Fecha de colecta	Infestación (%)	N.º de Ácaros	Haplotipo
Coquimbo	59	Noviembre 2021	0,2-14,9	40	100 % (J)
Santiago	29	Marzo 2022	1,1-7,9	40	97,5 % (J) 2,5 % (K)
Ñuble	49	Noviembre 2021	0,8-7,7	40	92,5 % (J) 7,5 % (K)
Los Ríos	25	Enero 2022	0,7- 3,8	40	100 % (J)

En Chile debido a la existencia de barreras geográficas presentes a lo largo del territorio, como lo son, la cordillera de Los Andes, el océano Pacífico y el desierto de Atacama, posiblemente se de origen a un efecto de “isla geográfica” en la propagación del haplotipo K, lo que favorecería la prevalencia del haplotipo J en el territorio. Estos resultados contrastan con lo reportado previamente por Solignac *et al.* (2005), lo que puede deberse a que estos apiarios se encuentren en zonas con diferentes características geográficas, o con un bajo intercambio de material biológico entre apicultores de la zona con territorios aledaños y las muestras encontradas en la región de Ñuble y Metropolitana identificadas como haplotipo K sean provenientes de poblaciones aisladas.

El alineamiento de secuencias múltiple del gen Cox1 (Tabla 3) de 3 secuencias

del haplotipo J (Sec.Ñuble, japonés), determinadas por PCR-RFLP, indicó que comparten un 100 % de homología de secuencia con la secuencia tipo de *V. destructor* haplotipo J (GQ379069.1). A su vez, las secuencias (n=3) determinadas como haplotipo K (Sec.Ñuble, Coreano), difieren en la región de reconocimiento de la enzima *SacI* (5'...GAGCTC...3'), en donde el nucleótido Adenina es reemplazado por el nucleótido Guanina (5'..GGGCTC..3') (Tabla 3), lo que valida los resultados obtenidos usando el marcador RFLP y confirma la presencia de ambos haplotipos de *V. destructor* en Chile.

Tabla 3. Alineamiento de secuencias de *V. destructor* correspondiente al gen Cox1 según Blast (NBCI).

GQ379069.1 <i>V. destructor</i> (J)	T	G	T	A	T	G	A	G	C	T	C	A	T	C	A	T	A	T	A	T
Sec.Ñuble, japonés	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sec.Ñuble, coreano	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AF106899.1 <i>V. destructor</i> (K)	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
KU196784.1 <i>V. destructor</i> (K)	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

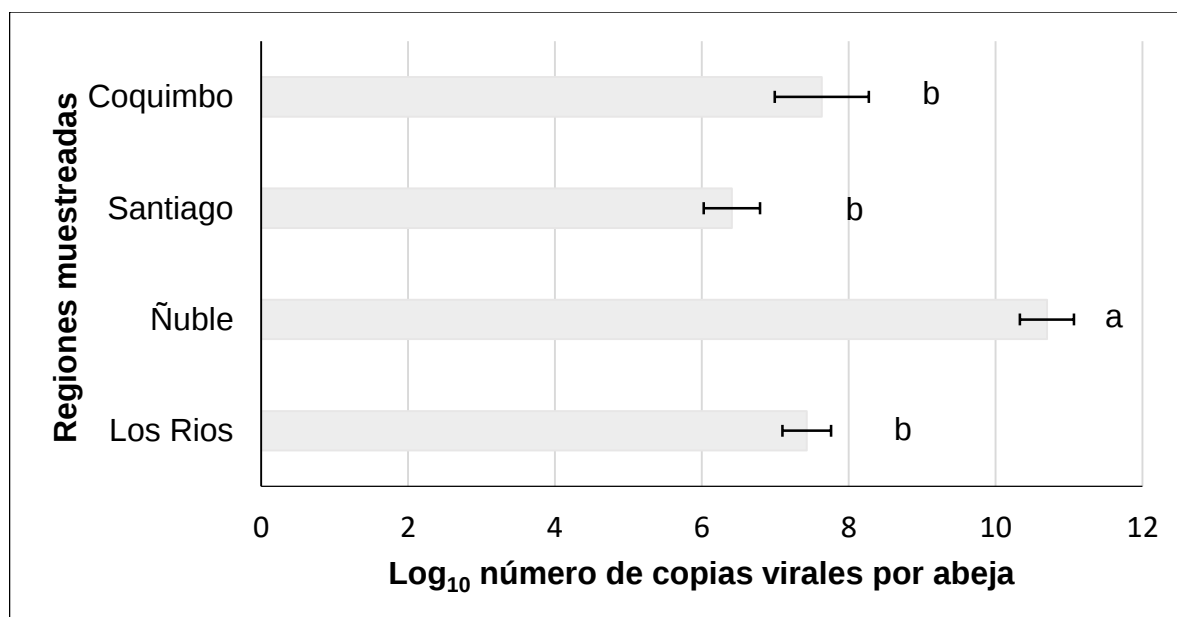
* Indica similitud de nucleótido. J indica haplotipo Japonés, K indica haplotipo Coreano.

Los resultados de la cuantificación de carga viral en las abejas indican que las muestras provenientes de la región de Ñuble poseen una carga viral de 10,7 (log₁₀ número de copias virales por abeja) siendo esta la región donde se detectó la mayor carga viral. Por otra parte, para el resto de las regiones analizadas no se observaron diferencias significativas en la cuantificación viral (Figura 2). Esto podría deberse a que, en la región de Ñuble, se detectó el mayor porcentaje de ácaros del haplotipo K (Tabla 3), y se ha descrito que este haplotipo es más infeccioso (De Guzmán et al., 1997; Anderson y Trueman, 2000), Sin embargo, nuevos estudios son

necesarios para validarlo.

En relación con la detección de las variantes de DWV, solo identificó la variante A, en las muestras de abejas seleccionadas al azar. La variante B no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas. Esto podría deberse a que la variante B ha sido recientemente detectada en apiarios del país y en una muy baja prevalencia (3 % aproximadamente), en contraste con la variante A, que se encuentra en el 71 % de los apiarios analizados por Riveros *et al.* (2019).

Figura 2. Carga viral de la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A) en *A. mellifera* provenientes de apiarios de diferentes regiones de Chile.

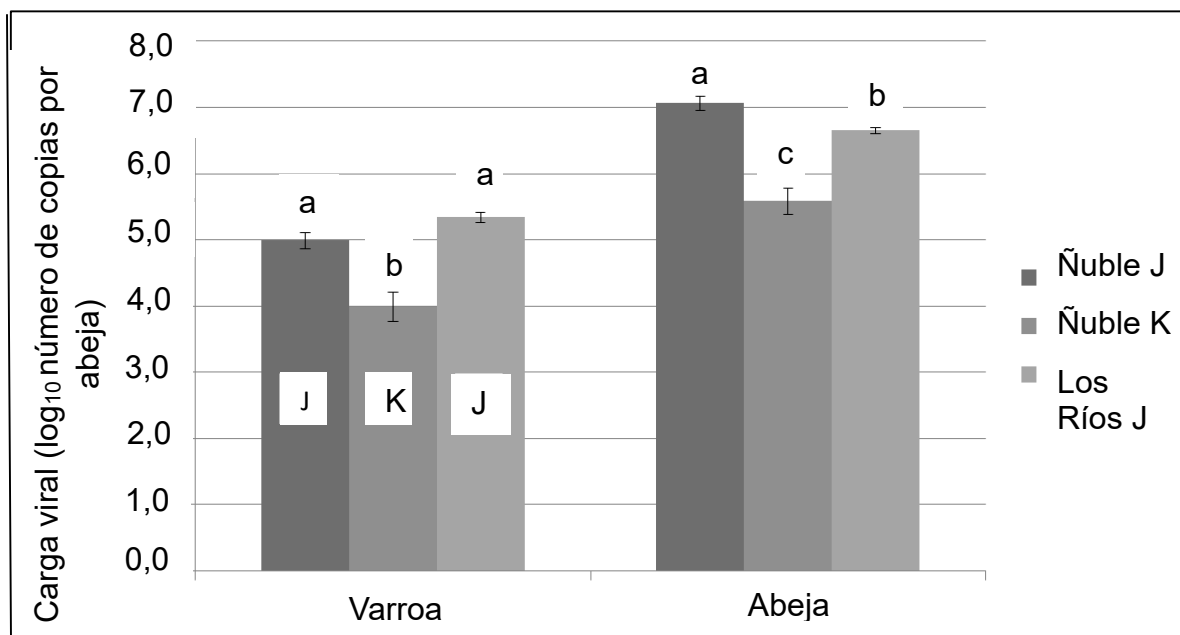


Letras diferentes indica diferencia significativa entre medias según prueba de Tukey ($p < 0,05$)

Relación entre el haplotipo de *Varroa destructor* y la infección del virus de las alas deformadas (DWV) en sus hospederos.

Respecto de la carga viral detectada en *Varroa destructor*, se observó que los ácaros de haplotipo J provenientes de la región de los Ríos y de la región de Ñuble, presentaron una mayor carga viral que los ácaros de haplotipo K de la región de Ñuble (Figura 3). A su vez, las abejas asociadas a los ácaros del haplotipo J presentaron una carga viral de DWV-A significativamente superior a la carga viral en abejas asociadas a los ácaros de haplotipo K (Ñuble K) (Figura 3).

Figura 3. Carga viral de la variante A del virus de las alas deformadas (DWV-A) en *A. mellifera* y haplotipos de *V. destructor*.



Letras diferentes indican diferencia estadística entre medias según prueba Tukey ($p < 0,05$)

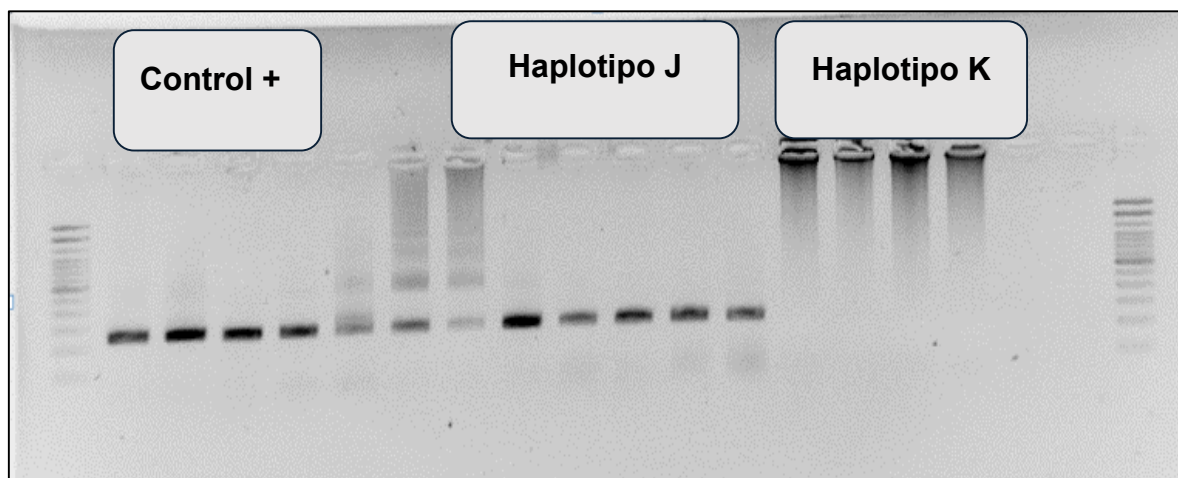
Por otra parte, sólo se detectó la cadena negativa de DWV-A en ácaros del haplotipo J (10/10) (Figura 4), lo cual indica que esta variante se está replicando en el ácaro, aumentando su carga viral. Esto tiene una implicancia epidemiológica, ya que un aumento de carga viral está asociado a una mayor severidad de síntomas en las abejas y una transmisión más efectiva y dañina (De Miranda y Genersch, 2010; Forsgren *et al.*, 2012).

Estos resultados difieren de los de Gisder y Genersch (2020), quienes determinaron que el DWV-A no se replica en Varroa. Estos autores detectaron mediante un análisis FISH (fluorescence *in situ*-hybridization) solo a la variante DWV-B en tejidos celulares en Varroa. No obstante, este estudio no caracteriza los haplotipos del ácaro, es decir, no se determina si las Varroas utilizadas para la detección del virus son haplotipo J o K.

En el presente estudio, la cadena negativa de DWV-A no se detectó en varroas del haplotipo K (0/10) (Figura 4). Los resultados de la presente investigación dan evidencia de que la variante DWV-A no se replica en varroas del haplotipo K y solo se replica en varroas del haplotipo J.

Aun cuando Gisder y Genersch (2020), no determinan el haplotipo de ácaro utilizado en su investigación, es probable que este presuntamente fuera del haplotipo K, que es el más prevalente en Europa (Traynor *et al.*, 2020). Esto podría explicar porqué no detectan a la variante DWV-A replicándose en las varroas y sólo detectan a la variante DWV-B.

Figura 4. Detección de cadena negativa de DWV-A.



M: Marcador de 100 bp; Control +: *A. mellifera* infectadas con DWV-A; Haplotipo J: *Varroa destructor* haplotipo Japonés, Haplotipo K: *Varroa destructor* haplotipo Coreano

Este estudio demuestra por primera vez que la variante DWV-A se replica en *V. destructor* y que esta replicación es dependiente del haplotipo del ácaro.

Para dar robustez a estos resultados, se sugiere realizar nuevos estudios con un mayor número de muestras del ácaro y con ambas variantes de DWV.

CONCLUSIONES

1. En las colmenas analizadas están presentes los haplotipos Coreano (K) y Japonés (J) de *Varroa destructor*.
2. El haplotipo prevalente en las colmenas analizadas es el haplotipo Japonés (J).
3. Se detecta la cadena negativa de la variante A del Virus de las alas deformadas (DWV-A) en ácaros del haplotipo J, demostrando que DWV-A se replica en *Varroa destructor*.

REFERENCIAS

- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., & Klein, A. M. 2008. Long-Term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current Biology*, 18 (20), 1572–1575.
- Aizen, M. A., & Harder, L. D. 2009. The global stock of domesticated honeybees is growing slower than agricultural demand for pollination. *current biology*, 19(11), 915–918.
- Anderson, D. L., & Morgan, M. J. (2007). Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. *Experimental and Applied Acarology*, 43(1), 1–24.
- Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24(3), 165–189.
- Amdam, G. V., K. Hartfelder, Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2004). Altered physiology in worker honeybees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering. *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 741–747.
- Annoscia, D., Brown, S. P., Di Prisco, G., De Paoli, E., Del Fabbro, S., Frizzera, D., Zanni, V., Galbraith, D. A., Caprio, E., Grozinger, C. M., Pennacchio, F., & Nazzi, F. (2019). Hemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and viruses in bees, as predicted by Volterra's model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1901), 20190331.
- Bailey, L., & Ball, B. V. (1991). Honeybee pathology. In repository Rothamsted. Academic Press, London.
- Benaets, K., vanGeystelen, A., Cardoen, D., De Smet, L., de Graaf, D. C., Schoofs, L., Larmuseau, M. H. D., Brettell, L. E., Martin, S. J., & Wenseleers, T. (2017). Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284 (1848).
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A., & Feldlaufer, M. F. (2006). Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 606–611.

- Campbell, E. M., Budge, G. E., Watkins, M., & Bowman, A. S. (2016). Transcriptome analysis of the synganglion from the honeybee mite, *Varroa destructor* and RNAi knockdown of neural peptide targets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 70(1), 116–126.
- Carreck, N. L., Ball, B. V. & Martin, S. J. (2010). Honeybee colony collapses and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 93–94.
- De Guzman, L. I., Rinderer, T. E., & Stelzer, J. A. (1997). DNA evidence of the origin of *Varroa jacobsoni* oudemans in the Americas. *Biochemical Genetics*, 35(9/10), 327–335.
- De Miranda, J. R., & Fries, I. (2008). Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(2), 184–189.
- De Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), S48–S61.
- Forsgren, E., Fries, I., & de Miranda, J. R. (2012). Adult honeybees (*Apis mellifera*) with deformed wings discovered in confirmed varroa-free colonies. *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 136–138.
- Gajic, B., Radulovic, Z., Stevanovic, J., Kulisic, Z., Vucicevic, M., Simeunovic, P., & Stanimirovic, Z. (2013). Variability of the honeybee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis. *Experimental & applied Ácarology*, 61(1), 97–105.
- Garibaldi, L. A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M. A., Bommarco, R., Cunningham, S. A., Kremen, C., Carvalheiro, L. G., Harder, L. D., Afik, O., Bartomeus, I., Benjamin, F., Boreux, V., Cariveau, D., Chacoff, N. P., Dudenhoffer, J. H., Freitas, B. M., Ghazoul, J., Greenleaf, S., & Hipolito, J. (2013). Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honeybee Abundance. *Science*, 339(6127), 1608–1611.
- Garrido, C., Rosenkranz, P., Paxton, R. J., & Gonçalves, L. S. (2003). Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie*, 34(6), 535–541.
- Genersch, E. (2010). Honeybee pathology: current threats to honeybees and

- beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 87–97.
- Genersch, E., & Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41(6), 54.
- Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Böhler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., & Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long-term study to understand periodically high winter losses of honeybee colonies. *Apidologie*, 41(3), 332–352.
- Gisder, S., Aumeier, P., & Genersch, E. (2009). Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 90(2), 463–467.
- Gisder, S., & Genersch, E. (2020). Direct evidence for infection of *Varroa destructor* mites with the bee-pathogenic deformed wing virus variant B - but not variant A - via fluorescence *in situ* hybridization analysis. *Journal of Virology*, 95(5), JVI.01786-20.
- Gisder, S., Möckel, N., Eisenhardt, D., & Genersch, E. (2018). *In vivo* evolution of viral virulence: switching of deformed wing virus between hosts results in virulence changes and sequence shifts. *Environmental Microbiology*, 20(12), 4612–4628.
- Grozinger, C. M., & Flenniken, M. L. (2019). Bee viruses: ecology, pathogenicity, and impacts. *Annual Review of Entomology*, 64(1), 205–226.
- Gusachenko, O. N., Woodford, L., Balbirnie-Cumming, K., Campbell, E. M., Christie, C. R., Bowman, A. S., & Evans, D. J. (2020). Green bees: reverse genetic analysis of deformed wing virus transmission, replication, and tropism. *viruses*, 12(5), 532.
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P. G., & Correa-Benítez, A. (2010). *Varroa destructor* the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honeybee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, 41(4), 443–450.
- Guzmán-Novoa, E., Emsen, B., Unger, P., Espinosa-Montaña, L. G., & Petukhova, T. (2012). Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of*

Invertebrate Pathology, 110(3), 314–320.

- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6(2), 65–70.
- Lanzi, G., de Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M., & Rossi, C. (2006). Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*, 80(10), 4998–5009.
- Le Conte, Y., Ellis, M., & Ritter, W. (2010). Varroa mites and honeybee health: can varroa explain part of the colony losses?. *Apidologie*, 41(3), 353–363.
- Maggi, M., Medici, S., Quintana, S., Ruffinengo, S., Marcángeli, J., Gimenez Martinez, P., Fuselli, S., & Eguaras, M. (2012). Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*, 56(4), 309–318.
- Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., Nikaido, S., & Schroeder, D. (2012). Global honeybee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086), 1304–1306.
- Mendoza, Y., Gramajo, E., Ciro Invernizzi, & Tomasco, I. H. (2020). Mitochondrial haplotype analyses of the mite *Varroa destructor* (acari: Varroidae) collected from honeybees *Apis mellifera* (hymenoptera, apidae) in Uruguay. *Systematic and Applied Acarology*, 25(8), 1526–1529.
- McMahon, D. P., Natsopoulou, M. E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M. J. F., Gogol-Döring, A., & Paxton, R. J. (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.
- Mordecai, G. J., Wilfert, L., Martin, S. J., Jones, I. M., & Schroeder, D. C. (2015). Diversity in a honeybee pathogen: first report of a third master variant of the deformed wing virus quasispecies. *The ISME Journal*, 10(5), 1264–1273.
- Moritz, R. F. A., Härtel, S., & Neumann, P. (2005). Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Écoscience*, 12(3), 289–301.
- Mortensen, A. N., Schmehl, D. R., Allsopp, M., Bustamante, T. A., Kimmel, C. B., Dykes, M. E., & Ellis, J. D. (2015). Differences in *Varroa destructor* infestation

rates of two indigenous subspecies of *Apis mellifera* in the republic of south africa. *Experimental and Applied Acarology*, 68(4), 509–515.

- Muntaabski, I., Russo, R., Liendo, M., Palacio, M., Cladera, J., Lanzavecchia, S., & Scannapieco, A. (2020). Genetic variation and heteroplasmy of *Varroa destructor* inferred from ND4 mtDNA sequences. *Parasitology Research*, 119(2), 411–421.
- Natsopoulou, M. E., McMahon, D. P., Doublet, V., Frey, E., Rosenkranz, P., & Paxton, R. J. (2017). The virulent, emerging genotype B of deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. *Scientific Reports*, 7(1).
- Navajas, M., Anderson, D. L., de Guzman, L. I., Huang, Z. Y., Clement, J., Zhou, T., & Le Conte, Y. (2009). New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie*, 41(2), 181–193.
- Pinto, F. A., Texeira, E. W., Cestaro, L. G., Martins, M. F., Alves, M. L. M. F. y Message, D. (2022). *Varroa destructor* in Africanized honeybees in Brazil: Genetic and reproductive profile. *Sociobiology*, 69(1), 7340.
- Pirk, C. W. W., Crewe, R. M., & Moritz, R. F. A. (2016). Risks and benefits of the biological interface between managed and wild bee pollinators. *Functional Ecology*, 31(1), 47–55.
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & vanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honeybee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792–1801.
- Riveros, G., Arismendi, N., Zapata, N., Evans, D., Pérez, I., Aldea, P., & Vargas, M. (2019). Occurrence, prevalence and viral load of deformed wing virus variants in *Apis mellifera* colonies in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 63–68.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S96–S119.
- Ryabov, E. V., Childers, A. K., Lopez, D., Grubbs, K., Posada-Florez, F., Weaver, D., Girtten, W., vanEngelsdorp, D., Chen, Y., & Evans, J. D. (2019). Dynamic evolution in the key honeybee pathogen deformed wing virus: Novel insights into virulence and competition using reverse genetics. *PLOS Biology*, 17(10).

- Ryabov, E. V., Wood, G. R., Fannon, J. M., Moore, J. D., Bull, J. C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., & Evans, D. J. (2014). A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-mediated, or *in vitro*, transmission. *PLoS Pathogens*, 10(6).
- Solignac, M., Cornuet, J.-M., Vautrin, D., Le Conte, Y., Anderson, D., Evans, J., Cros-Arteil, S., & Navajas, M. (2005). The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1561), 411–419.
- Strapazzon, R., Carneiro, F. E., Guerra Jr., J. C. V., & Moretto, G. (2009). Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honeybees *Apis mellifera* (hymenoptera, apidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 990–997.
- Thoms, C. A., Nelson, K. C., Kubas, A., Steinhauer, N., Wilson, M. E., & vanEngelsdorp, D. (2019). Beekeeper stewardship, colony loss, and *Varroa destructor* management. *Ambio*, 48(10), 1209–1218.
- Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A. Y., Chantawannakul, P., & McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A complex parasite, crippling honeybees worldwide. *Trends in Parasitology*, 36(7), 592–606.
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H. C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S. J. M., & Boots, M. (2016). Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science*, 351(6273), 594–597.
- Wu, Y., Dong, X., & Kadowaki, T. (2017). Characterization of the Copy Number and Variants of Deformed Wing Virus (DWV) in the Pairs of Honeybee Pupa and Infesting *Varroa destructor* or *tropilaelaps mercedesae*. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Yang, X., & Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7470–7475.
- Yue, C., Schroder, M., Gisder, S., & Genersch, E. (2007). Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of*

General Virology, 88(8), 2329–2336.