

**Detección de agentes virales presentes en apiarios destinados a la  
producción de material vivo y evaluación de estrategias para su control  
mediante ARN interferente**

*Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Área  
Ciencias Agropecuarias*

**Cecilia Ferrufino**

Licenciada en Genética - Universidad de Morón- 2013

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias (INTA)



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## **COMITÉ CONSEJERO**

Director de tesis

**María José Dus Santos**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

**Ricardo Salvador**

Licenciado en Biología (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor en Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata)

Consejero de Estudios

**Teresa Boca**

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae, Área Biometría (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

## **JURADO DE TESIS**

### **JURADO**

**Graciela Adriana Rodríguez**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Sur)

Doctora en Ciencia Animal (Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires)

### **JURADO**

**Francisco José Reynaldi**

Licenciado en Biología (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor en Ciencias Naturales (Universidad Nacional de La Plata)

### **JURADO**

**María Gabriela López**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 02 de noviembre de 2023

## **DEDICATORIA**

A mis hijos, Agus, Juli e Isa, que aceptan cualquier desafío que se les presente y viven de  
manera única.

A mi compañero de vida y padre de mis hijos, Mariano, que no solo me acompañó en este  
proceso, sino que siempre me motivó a seguir formándome académicamente.

A mi familia y amigos.

## AGRADECIMIENTOS

A mis Directores, María José y Ricardo quienes me acompañaron en este proceso de aprendizaje, por sus valiosos aportes y sobre todo su calidez humana.

A mi Consejera de Estudios, Teresa que siempre ha estado a disposición.

A Clau Mongini por estar siempre.

A la gente linda del Lab C con la que comparto el día a día.

A las personas que forman parte del Instituto de Virología, que me hicieron el aguante en esta importante etapa de mi vida.

A Ale Scannapieco y Romi Russo, que gracias a su buena predisposición, acompañamiento y organización, logré realizar los experimentos.

A la Escuela de Posgrados donde realicé los cursos y conocí a excelentes profesores y compañeros.

A los integrantes del Proapi, que colaboraron en el desarrollo de este proyecto.

A Emilio Figini quien colaboró en toda la primera etapa de esta Tesis.

A todas las personas que, de alguna manera u otra participaron de este proyecto.

A mi familia y amigos.

## DECLARACIÓN

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Cecilia Ferrufino', with a stylized flourish at the end.

Lic. en Genética Cecilia Ferrufino

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	xix
ABSTRACT .....	xxi
CAPITULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	2
Apicultura Argentina .....	2
Factores ambientales, parásitos y enfermedades que afectan a las abejas .....	4
Virus que afectan a las abejas .....	8
Inmunidad apícola.....	12
OBJETIVO GENERAL .....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
HIPÓTESIS .....	15
CAPÍTULO 2 .....	16
DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGENTES VIRALES EN CABAÑAS APÍCOLAS DE LA ARGENTINA.....	17
2.1 INTRODUCCIÓN .....	17
Virus en cabañas apícolas .....	17
Virus en Argentina .....	18
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.2.1 Área de estudio.....	19
2.2.2 Procesamiento de las muestras y extracción del ARN viral.....	22
2.2.3 Detección de los agentes virales.....	22
2.2.4 Amplificación de virus de interés.....	24
2.2.5 Purificación viral .....	25
2.2.6 Cuantificación de cargas virales.....	26
2.2.7 Preservación del material conteniendo virus.....	27
2.2.8 Caracterización molecular.....	27

2.2.9 Amplificación por PCR de fragmentos génicos.....	27
2.2.10 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa .....	28
2.2.11 Secuenciación automática .....	28
2.2.12 Análisis filogenéticos .....	28
2.3 RESULTADOS .....	29
2.3.1 Muestras .....	29
2.3.2 Detección de Virus de abejas .....	29
2.3.3 Amplificación de virus de interés.....	35
2.3.4 Purificación viral .....	37
2.3.5 Caracterización molecular.....	40
2.3.6 Análisis filogenéticos .....	40
2.4 DISCUSIÓN .....	41
2.5 CONCLUSIÓN.....	43
CAPITULO 3 .....	45
DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL PARA ABPV Y BQCV MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE ARN INTERFERENTE.....	46
3.1 INTRODUCCIÓN .....	46
Control de virus mediante el uso de ARN interferente .....	46
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
3.2.1 Producción de ARNdc <i>in vivo</i> .....	47
3.2.1.1 Clonado de fragmentos génicos de ABPV y BQCV en vectores de síntesis de ARNdc .....	47
3.2.1.2 Transformación de Bacterias HT115 y síntesis de ARN doble cadena (ARNdc) específico. ....	50
3.2.2 Producción de ARNdc <i>in vitro</i> .....	50
3.2.3 Ensayo de estabilidad del ARNdc producido.....	51
3.2.4 Insectos.....	51
3.2.5 Experimento de infección.....	52
3.2.5.1 Procesamiento de las muestras y extracción del ARN viral.....	54
3.2.5.2 Detección y cuantificación de cargas virales .....	55
3.2.6 Bioensayos de silenciamiento viral .....	55

3.2.7 Análisis estadísticos .....	57
3.3 RESULTADOS .....	58
3.3.1 Metodología I: Producción de ARNdc <i>in vivo</i> .....	59
3.3.1.2 Clonado de fragmentos génicos de ABPV y BQCV en vectores de síntesis de ARNdc.....	59
3.3.2 Metodología II: Producción de ARNdc <i>in vitro</i> .....	61
3.3.3 Estabilidad del ARNdc.....	62
3.3.4 Experimentos de infección viral.....	64
3.3.4.1 Experimento de infección de ABPV .....	64
3.3.4.2 Experimento de infección de BQCV.....	66
3.3.5 Experimento de silenciamiento de ABPV .....	67
3.3.5.1 Análisis estadístico de las cargas virales .....	68
3.3.5.2 Análisis estadístico de supervivencia de abejas .....	69
3.3.6 Experimento de silenciamiento de BQCV .....	72
3.3.6.1 Análisis estadístico de las cargas virales .....	72
3.3.6.2 Análisis estadístico de supervivencia de abejas .....	73
3.4 DISCUSIÓN .....	74
3.4.1 Producción de ARNdc.....	74
3.4.2 Experimentos de infección.....	74
3.4.3 Experimentos de silenciamiento génico.....	75
3.5 CONCLUSIONES .....	77
CAPÍTULO 4 .....	79
DISCUSIÓN GENERAL .....	79
4.1 Detección de Virus de abejas en cabañas apícolas .....	79
4.2 Caracterización molecular y análisis filogenéticos.....	81
4.3 Experimentos de infección.....	81
4.5 Experimentos de silenciamiento .....	82
CONCLUSIONES GENERALES .....	82
BIBLIOGRAFÍA .....	85
APÉNDICE .....	100

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Detalle del muestreo realizado por año y provincia. ....	21
Cuadro 2: Secuencias de los cebadores y tamaño de los fragmentos amplificados para cada uno de los virus. ....	23
Cuadro 3: Secuencias de los cebadores y tamaño de los fragmentos amplificados para cada uno de los virus. ....	48
Cuadro 4: Descripción de las condiciones y días del ensayo de estabilidad de ARNdc. ....	51
Cuadro 5: Descripción de los tratamientos realizados por grupo para el ensayo de infección de ABPV. ....	53
Cuadro 6: Descripción de los tratamientos realizados por grupo para el ensayo de infección de BQCV. ....	54
Cuadro 7: Descripción de los tratamientos y grupos de abejas utilizados para el ensayo de silenciamiento de ABPV. ....	55
Cuadro 8: Descripción de los tratamientos y grupos de abejas utilizados para el ensayo de silenciamiento de BQCV. ....	56
Cuadro 9: Esquema de comparación entre los diferentes agentes y las variables meteorológicas con sus correspondientes p valores. ....	33
Cuadro 10: Detección de virus en pupas de reinas de los establecimientos que presentaban pérdidas en la producción. ....	34
Cuadro 11: Contrastes realizados entre los tratamientos para el día 5 en adelante y sus correspondientes p-valores. En verde se resaltan diferencias significativas del tratamiento B respecto los tratamientos C y E; y en amarillo se resalta que no hay diferencias significativas entre el tratamiento B y los tratamientos A y D. ....	71
Apéndice:	
Cuadro 1: Condiciones de ciclado de PCR para el fragmento del gen VP1 de ABPV. ....	100

Cuadro 2: Condiciones de ciclado de PCR para el fragmento del gen Replicasa de ABPV. .....	100
Cuadro 3: Condiciones de ciclado de PCR para el fragmento del gen VP1 de BQCV.....	101
Cuadro 4: Condiciones de ciclado de PCR para el fragmento del gen Helicasa de BQCV. .....	101
Cuadro 5: Descripción de las condiciones meteorológicas (Temperatura media, Porcentaje de Humedad relativa promedio y Precipitación) en cada año y provincia durante los muestreos realizados.....	102
Cuadro 6: Medidas resumen de la variable logaritmo de la concentración de ABPV (copias génicas/ul) para cada uno de los tratamientos y tiempos.....	103
Cuadro 7: Medidas resumen de la variable número de abejas vivas para cada tratamiento en los diferentes tiempos correspondiente al experimento de silenciamiento de ABPV. ....	104
Cuadro 8: Medidas resumen de la variable logaritmo de la concentración de virus (copias génicas/ $\mu$ l) para cada uno de los tratamientos y tiempos del experimento de silenciamiento de BQCV. ....	105
Cuadro 9: Medidas resumen de la variable respuesta N° de abejas vivas para cada uno de los tratamientos en los diferentes tiempos del experimento de silenciamiento de BQCV.	106

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de densidad de apiarios y ubicación de las cabañas apícolas. Figura realizada con Biorender.com .....	3
Figura 2: Representación esquemática de los principales patógenos que afectan a <i>Apis mellifera</i> . Entre los patógenos se mencionan los siguientes virus: Virus de las celdas reales negras (BQCV), Virus de las alas deformadas (DWV), Virus de la cría ensacada (SBV), Virus filamentoso <i>A. mellifera</i> (AmFV), Virus de Cachemira (KBV), Virus israelí de la parálisis aguda (IAPV), Virus varroa destructor (VDV), Virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV). (Modificado de: Lannutti et al., 2022) .....	6
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Varroa destructor</i> en fase reproductiva y fase forética. (Modificado de: Nazzi & Le Conte, 2016).....	7
Figura 4: Representación esquemática de los genomas virales de las abejas melíferas. A: Representación esquemática de los genomas de ABPV, IAPV y BQCV. B: Representación esquemática de los genomas de SBV y DWV. Proteína del virión ligada al genoma (VPg), región no traducida (UTR), sitio de entrada ribosomal interno (IRES), marco abierto de lectura (ORF), región intergénica (IGR), poliproteína estructural 1 (VP1), poliproteína estructural 2 (VP2), poliproteína estructural 3, poliproteína estructural 4 (VP4), cola de nucleótidos A (Poly A). (Modificado de: Chen et al., 2006).....	9
Figura 5: Signos clínicos del Virus de las celdas reales negras. En la foto se muestra una pupa al 3er día post infección, con la sintomatología típica causada por este virus. ....	11
Figura 6: Signos clínicos del Virus de la parálisis aguda de las abejas. A la izquierda se observa una abeja adulta al 3er día post infección con la sintomatología típica causada por este virus; a la derecha se muestra una abeja adulta sana.....	12
Figura 7: Vías inmunitarias de las abejas melíferas. La activación inmunitaria ocurre con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En negrita se resaltan los genes implicados en cada una de las vías. A continuación se detallan las abreviaturas: vía de señalización Janus quinasa/transductor de señales y activador de la transcripción (Jak/STAT), proteínas que contienen tioéster (TEPS), supresor de la señalización de citoquinas (SOCS); Mecanismo de ácido ribonucleico interferente (ARNi),	

ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc), pequeños ARN inhibidores (ARNsi), complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), peptidogluano (PGN), proteína de reconocimiento de péptidoglicano LC (PGRP-LC), vía Jun N-terminal quinasa (JNK), receptores de reconocimiento de patógenos (PRR). (Modificado de: McMenamin et al., 2018).....	14
Figura 8: Localización de las cabañas muestreadas en las diferentes provincias de la Argentina .....	20
Figura 9: Toma de muestra de abejas nodrizas de un cuadro de cría. ....	20
Figura 10: Proceso de extracción y colección de pupas del marco de cría. ....	25
Figura 11: Gráfico de proporción de muestras positivas para cada virus.....	30
Figura 12: Detección de virus en cabañas apícolas. El gráfico presenta las muestras en las que se realizaron detecciones de virus por provincia durante los tres años de muestreo. En color gris el porcentaje de las muestras en las cuales no se detectaron virus, en amarillo porcentaje de muestras positivas para SBV, en petróleo el porcentaje de muestras positivas para BQCV, en magenta el porcentaje de muestras positivas para ABPV y en turquesa el porcentaje de muestras positivas para DWV.....	30
Figura 13: Detección de Varroa destructor en cabañas apícolas. El gráfico muestra el porcentaje promedio de detección de Varroa destructor por provincia durante los tres años de muestreo. La línea punteada color rojo representa el límite de % de infestación a partir del cual se recomienda realizar acciones para contrarrestar el impacto. ....	31
Figura 14: Detección de Nosema apis en cabañas apícolas. El gráfico representa el recuento de esporas promedio por provincia durante los tres años de muestreo. La línea punteada color rojo representa el límite de % de infestación a partir del cual se recomienda realizar acciones para contrarrestar el impacto.....	32
Figura 15: Celdas reales que no fueron aceptadas; las abejas nodrizas aceptaron 12 de 21 celdas con larvas.....	34
Figura 16: Celdas reales afectadas por BQCV. A. Celda real con bordes roídos. B. Pared interior oscura de una celda real afectada (marcada con flechas negras) en comparación con	

una celda real sana. C. Celda real con la pared interior oscura y pupa oscurecida producto de una infección viral. .... 34

Figura 17: Amplificación de virus “in vivo”. Se muestran pupas de abejas infectadas con el virus de las celdas reales negras al tercer día post infección. Dos pupas fueron inyectadas con PBS, como control del procedimiento (marcadas con flechas negras). .... 36

Figura 18: Pupas de abejas infectadas con el virus de las celdas reales negras al tercer día post infección. (A) Control de pupa de abeja inyectada con PBS. (B) Pupa de abeja inyectada con el virus de las celdas reales negras. .... 37

Figura 19: Purificación de ABPV por gradiente de densidad de sacarosa. El gráfico presenta las absorbancias del gradiente de sacarosa cosechado en fracciones consecutivas. En cada fracción se evaluaron las proteínas y los ácidos nucleicos a 280 y 260 nm, respectivamente. .... 38

Figura 20: Purificación de BQCV por gradiente de densidad de sacarosa. El gráfico presenta las absorbancias del gradiente de sacarosa cosechado en fracciones consecutivas. En cada fracción se evaluaron las proteínas y los ácidos nucleicos a 280 y 260 nm, respectivamente. .... 38

Figura 21: Cuantificación de la carga viral de BQCV por RT-qPCR. A: Gráfico de amplificación de unidades de fluorescencia relativa (RFU) en función de los ciclos de las 5 diluciones del plásmido. B: Gráfico de puntos de los ciclos umbrales (Ct) en función de las diluciones del plásmido (log cg/ $\mu$ l) y ajuste de la recta de regresión lineal. .... 39

Figura 22: Análisis filogenéticos de los virus ABPV y BQCV. A. Árbol filogenético del fragmento del gen de 500 pb que codifica una proteína estructural de ABPV incluyendo aislamientos de otros países. B. Árbol filogenético del gen del fragmento de 700 pb que codifica una poliproteína de la cápside de BQCV incluyendo aislamientos de otros países. Los números de registro de GenBank se indican entre paréntesis delante del nombre del país de procedencia. Se muestran los valores de Bootstraps por encima de las ramas. .... 41

Figura 23: Efecto en abejas adultas cuyas larvas fueron administradas con los diferentes tratamientos. (A) Larvas alimentadas con DWV+ARNdc: sin signos de deformidad de las alas en abejas adultas. (B) Larvas alimentadas con ARNdcGFP+ARNdc+DWV: alas

deformadas, abdomen hinchado en abejas adultas. (C) Larvas alimentadas sólo con DWV: deformidad de alas en abejas adultas (Desai et al., 2012) .....	47
Figura 24: Transformación de bacterias DH5 $\alpha$ con las construcciones en pGEM -Teasy. A: Placa de cultivo en la que se observan colonias blancas y azules debido a la transformación de bacterias electrocompetentes. B: Selección y estriado de colonias blancas para chequear clones positivos .....	49
Figura 25: Procedimiento de colección y pintado de abejas para colocarlas en los frascos y asignarles un tratamiento. ....	53
Figura 26: Esquema de infección viral. Figura realizada con Biorender.com .....	54
Figura 27: Esquema de silenciamiento viral. Figura realizada con Biorender.com .....	57
Figura 28: Obtención de los fragmentos de los genes blanco de silenciamiento de cada virus. Los amplificadores obtenidos por RT-PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. ....	59
Figura 29: Subclonado de los fragmentos de los genes blanco de silenciamiento de cada virus. El gel de la izquierda muestra cada uno de los fragmentos y el de la derecha el plásmido linealizado. M: marcador de peso molecular; 1: fragmento de 646pb correspondiente al gen de Replicasa de ABPV; 2: fragmento de 310 pb correspondiente al gen helicasa de BQCV; 3: fragmento de 700 pb correspondiente al gen VP1 de BQCV; pl4440: plásmido linealizado para el subclonado. ....	59
Figura 30: Selección de clones positivos para el gen de la Helicasa de BQCV. Las amplificaciones por colony-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa observando una banda de 310 bp en las colonias que poseen el plásmido con el inserto correspondiente a la helicasa de BQCV. 1-12: clones evaluados; C-: control negativo; C+: control positivo; M: marcador de peso molecular de 100pb. ....	60
Figura 31: Selección de clones positivos para los genes de la replicasa de ABPV y la VP1 de BQCV. Las amplificaciones por colony-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa observando una banda de 646 bp en las colonias que poseen el plásmido con el inserto correspondiente a la replicasa de ABPV y una banda de 700 bp en las que	

contienen el plásmido con el inserto de la VP1 de BQCV. 1-12: clones evaluados; C-: control negativo; C+: control positivo; M: marcador de peso molecular de 100pb. .... 61

Figura 32: Producción de ARNdc in vitro. Los ARNdc generados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. 1: ARNdc del gen Helicasa de BQCV; 2: ARNdc del gen Replicasa de ABPV; 3 y 4: ARNdc del gen VP1 de BQCV; 5 y 6: ARNdc del gen VP1 de ABPV. M: marcador molecular de 1Kb marca Invitrogen..... 62

Figura 33: Evaluación de la estabilidad del ARNdc. El ARNdc sometido a cada condición fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa. A: agua a 4°C; B: agua a 32°C; C: sacarosa a 32°C. 1 al 19: días de conservación. M: marcador de peso molecular..... 63

Figura 34: Frascos con abejas a los cuales se les asignaron los tratamientos al azar. .... 64

Figura 35: Ensayo de infección de ABPV. A: Gráfico de cargas virales (log copias/ul) en función de los días para cada uno de los 3 tratamientos (ABPV3,  $10^3$  cg/ $\mu$ l, en rojo; ABPV4,  $10^4$  cg/ $\mu$ l, en azul y el control sin virus en Amarillo). B: Gráfico de supervivencia (% de abejas vivas/total) en función de los días para cada uno de los 3 tratamientos (ABPV3 en rojo; ABPV4 en azul y el control en amarillo). .... 65

Figura 36: Signos de infección con ABPV. A la izquierda se observa una abeja sin infectar y a la derecha una abeja infectada ..... 66

Figura 37: Ensayo de infección de BQCV. A: Gráfico de cargas virales (log. copias génicas /ul) en función de los días para cada uno de los 3 tratamientos (BQCV4,  $10^4$  cg/ $\mu$ l, en rojo; BQCV5,  $10^5$  cg/ $\mu$ l, en azul y el control en amarillo). B: Gráfico de supervivencia (% de abejas vivas/total) en función de los días para cada uno de los 3 tratamientos (BQCV4, en rojo; BQCV5, en azul y el control en amarillo). .... 67

Figura 38: Ensayo de silenciamiento de ABPV. Gráfico de cargas virales (log copias génicas/ $\mu$ l) en función de los días para cada uno de los 5 tratamientos (Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: ABPV  $10^4$ cg/ $\mu$ l + ARNdc, en azul Tratamiento C: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l, en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico, en negro)..... 68

Figura 39: Análisis de las cargas virales de ABPV en los diferentes tratamientos y días del ensayo de silenciamiento. Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: ABPV  $10^4$

cg/ $\mu$ l + ARNdc, en azul; Tratamiento C: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l, en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico, en negro. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos señalados (calculadas mediante el ajuste de un modelo lineal general, realizando contrastes ortogonales). ..... 69

Figura 40: Análisis de la supervivencia frente a los diferentes tratamientos y días del ensayo de silenciamiento de ABPV. Se graficó la supervivencia (n° de abejas vivas) en función del tiempo (días) para cada uno de los 5 tratamientos (Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc, en azul; Tratamiento C: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l, en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico, en negro)..... 70

Figura 41: Ensayo de silenciamiento de BQCV. Gráfico de cargas virales (log copias génicas/ $\mu$ l) en función de los días para cada uno de los 5 tratamientos (Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc, en azul; Tratamiento C: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l, en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico, en negro)..... 72

Figura 42: Análisis de la supervivencia frente a los diferentes tratamientos y días del ensayo de silenciamiento de BQCV. Se graficó la supervivencia (n° de abejas vivas) en función del tiempo (días) para cada uno de los 5 tratamientos (Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc, en azul; Tratamiento C: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l, en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico, en negro)..... 73

## ABREVIATURAS

DWV: Virus de las alas deformadas

SBV: Virus de la cría ensacada

ABPV: Virus de la parálisis aguda de las abejas

CBPV: Virus de la parálisis crónica de las abejas

BQCV: Virus de las celdas reales negras

IAPV: Virus israelí de la parálisis aguda

ARNi: Ácido ribonucleico interferente

INDEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos

RENAPA: Registro Nacional de Productores Apícolas

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

KV: Virus kakugo

VDV-1: Virus Varroa destructor 1

SBPV: Virus de la parálisis lenta de las abejas

LSV: Virus del lago Sinaí

BeeMLV: Virus Macula-*like* de abeja

OcNV: *Osmia cornuta* nudivirus

ARV-1: *Apis* rhabdovirus

ARN: Ácido ribonucleico

ORF: Marco abierto de lectura

IGR: Región intergénica

UTR: Región no traducida

IRES: Sitio interno de entrada al ribosoma

VPg: Proteína del virión ligada al genoma

Toll: Vía de transducción de señales transmembrana

JNK: Vías de señalización intracelular

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AmFV: Virus filamentoso *A. mellifera*

CCD: Trastorno de colapso de las colonias

ARNdc: Ácido ribonucleico de doble cadena

siARNs: Pequeños ácidos ribonucleicos inhibidores

HR: humedad relativa

TA: Temperatura ambiente

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

RT: Retrotranscripción

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

°C: grados Celsius

rpm: revoluciones por minuto

ml: mililitro

Min: minuto

Nm: nanómetro

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

UV: ultravioleta

VP1: Poliproteína estructural 1

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

IPTG: isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

IAP: Gen inhibidor de la apoptosis

hs: horas

Log cg/ $\mu$ l: logaritmo de copias génicas por microlitro

PBS: buffer fosfato salino

Dpi: días post infección

## **Detección de agentes virales presentes en apiarios destinados a la producción de material vivo y evaluación de estrategias para su control mediante ARN interferente**

### **RESUMEN**

En el sector apícola, Argentina se posiciona como uno de los principales actores a nivel global. La actividad local se destaca principalmente en la producción de miel a granel y otros productos obtenidos de la colmena (cera, polen, propóleos, y material vivo), ocupando Argentina los primeros lugares entre los países productores y exportadores de miel. Por otro lado, la producción de material vivo tiene como objetivo aportar a otros apiarios, núcleos de abejas, abejas, celdas reales y reinas con características que garanticen colmenas con niveles de productividad y sanidad óptimas. Sin embargo, la productividad de la colmena se ve atentada por diversos factores, siendo de relevancia los agentes biológicos como patógenos y ectoparásitos. En nuestro país, se demostró la presencia de diferentes virus, entre los cuales se puede mencionar el Virus de alas deformadas (DWV), Virus de la cría ensacada (SBV), Virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV), Virus de la parálisis crónica de las abejas (CBPV), Virus de las celdas reales negras (BQCV) y el Virus de la parálisis israelí de las abejas (IAPV); estos virus se pueden transmitir de forma horizontal y algunos de ellos de forma vertical. Respecto a las estrategias de control de las virosis en abejas, el silenciamiento génico o ARN interferente (ARNi) aparece como una posible metodología para tal fin. Se ha demostrado que mediante la ingestión de ARN doble cadena específico contra genes virales, es posible lograr una disminución de la incidencia del mismo en la colmena. El objetivo de esta Tesis fue estudiar la presencia de agentes virales en cabañas apícolas y evaluar estrategias para el control de virus. Este trabajo implicó el primer relevamiento de virus de abejas en cabañas apícolas de la Argentina, los virus más prevalentes fueron ABPV, BQCV y DWV; además, en cabañas con grandes pérdidas en la producción de celdas reales, los agentes implicados fueron BQCV y ABPV. Por otro lado, se evaluó la administración de ARNi en bioensayos con abejas adultas en los que, por primera vez se logró disminuir de manera significativa la mortalidad provocada por ABPV. Es importante seguir desarrollando metodologías de control de virus con el fin de disminuir

pérdidas en la producción de material vivo y comercializar productos con la mayor sanidad posible.

**Palabras clave:** Virus de abeja, cabañas apícolas, silenciamiento génico, ABPV, BQCV

## **Detection of viral agents in queen rearing apiaries and evaluation of control strategies by RNA interference.**

### **ABSTRACT**

In beekeeping activity, Argentina is one of the most important exporters at global level. Local activity involves honey production and other beehive products (royal jelly, bee pollen, propolis, bee venom, beeswax, queen bees, queen cells and package bees). For decades, Argentina has been one of the most important producers and exporters worldwide. Bee queen rearing is a beekeeping activity that provides beekeepers with bee's nuclei and queen bees with characteristics that guarantee optimal levels of productivity and health. However, biological agents such as pathogens and parasites affect hive productivity. In our country, the presence of different viruses has been described; among them, it is important to mention the Deformed Wings Virus (DWV), Sacbrood Virus (SBV), Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Black Queen Cell Virus (BQCV), and Israeli Bee Paralysis Virus (IAPV). These viruses can be transmitted horizontally and some of them, vertically. About strategies for controlling viruses in bees, gene silencing or interfering RNA (RNAi) is one of the most promising strategies. Previous reports described that ingestion of specific double-stranded RNA against viral genes triggered a decrease in its incidence in the hive. This Thesis proposes to study the presence of viral agents in queen rearing apiaries and to evaluate strategies for their control, focused on the use of RNAi. This work reported the first bee virus detection in queen rearing apiaries from Argentina, the most prevalent bee viruses were ABPV, BQCV y DWV; in addition, ABPV and BQCV were detected in queen rearing apiaries with large losses in the production of queen cells. On the other hand, the administration of RNAi was evaluated in bioassays with adult bees and, for the first time, it was possible to significantly reduce the mortality caused by ABPV. It is relevant to developed bee viruses control strategies in order to decrease the losses in the production and to commercialize healthy bee products.

**Keywords:** Bee viruses, queen-rearing apiaries, gene silencing, ABPV, BQCV

# CAPITULO 1



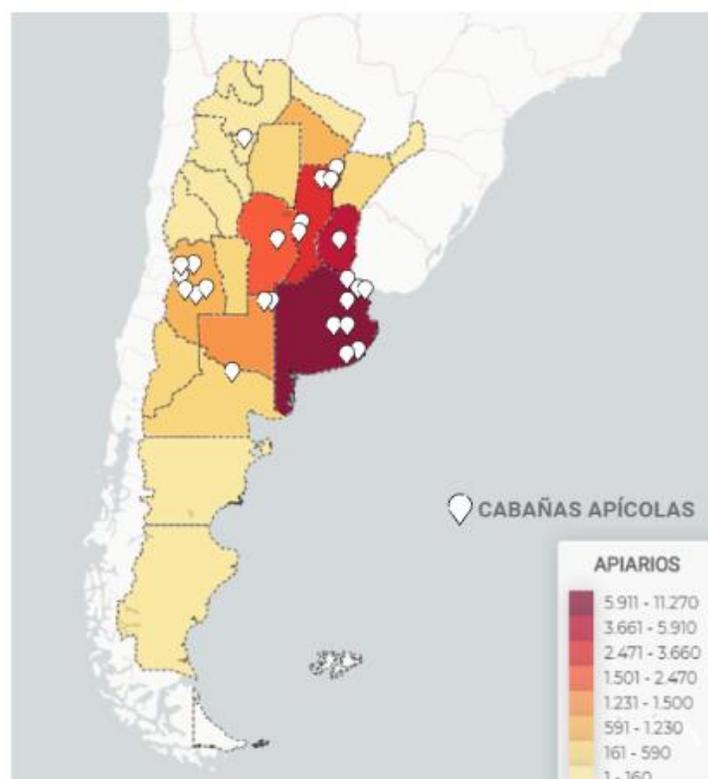
## INTRODUCCIÓN GENERAL

### Apicultura Argentina

La apicultura argentina destina más del 95 % de la producción de al mercado externo. Argentina es el país con mayor cantidad de colmenas del hemisferio sur. Actualmente ocupa el 7° lugar como productor de miel y el 2° como exportador. (Ministerio de Hacienda, Presidencia de la Nación Argentina, 2018). Asimismo, la producción de miel argentina representa el 70% de la miel de América del Sur, el 25% de América y el 6% del total mundial. Las exportaciones argentinas de miel en la última década alcanzaron un promedio anual de 70.000 toneladas, y al mercado interno se destina un promedio anual de 6.000 tn. Actualmente, el sector apícola aporta un ingreso superior a los 200 millones de dólares anuales por la exportación de miel. En relación con las exportaciones de reinas y material vivo, en los últimos años se registró un volumen promedio anual de 21662 unidades, generando ingresos al país del orden de los U\$S 284000 (Ministerio de Economía Argentina). Además, existen otros productos y servicios como propóleos, polen, jalea real, cera, apitoxina y polinización de cultivos, cuyo comercio se encuentra en crecimiento. Por otro lado, la apicultura contribuye a la biodiversidad ambiental y a la producción de alimentos, ya que en el mundo el 74% de los cultivos dependen de la polinización natural, elevando los beneficios del sector agropecuario.

La actividad apícola argentina está presente en 22 provincias, provocando un importante impacto en las economías locales, especialmente en las regiones alejadas de los centros urbanos, donde genera empleo para más de 100.000 personas de manera directa e indirecta. Según informes del RENAPA (Registro Nacional de Productores Apícolas), esta actividad es desarrollada, actualmente, por algo más de 15.306 apicultores que cuentan con 3.548.894 colmenas georreferenciadas de las cuales 28.127 son certificadas como orgánicas (SENASA, 2020). Además, hay inscriptas 25 cabañas apícolas en el registro nacional de apiarios de crianza (figura 1). Estas cabañas que producen material vivo constituyen un elemento esencial que contribuye especialmente a mejorar la productividad apícola local. La producción de material vivo es una actividad clave en la apicultura, ya que provee nuevas reinas para reemplazar a las que envejecen, contribuye a reducir la enjambrazón, aumentar la cría y la producción de miel, permite iniciar nuevas colonias y cambiar ciertas

características genéticas en la población (Dietemann et al., 2013). Otros productos que se obtienen son celdas reales, reinas fecundadas, núcleos, paquetes de abejas y cualquier otro producto apícola vivo, los cuales son generados bajo un sistema que pretende asegurar la calidad de los mismos. En Argentina, las cabañas son sometidas a dos inspecciones sanitarias obligatorias anuales (inspección de otoño e inspección de primavera) realizadas por un inspector sanitario apícola, acreditado por el SENASA; además, el propietario o el responsable sanitario de la Cabaña debe realizar inspecciones sanitarias y monitoreos de Varroosis y Nosemosis cada 30 días, durante el periodo de producción, cuyos resultados se presentan en el Registro Sanitario del establecimiento (SENASA, Resolución N° 278/2013). Aun así, esta actividad no está exenta de las principales amenazas que afectan a la apicultura, como el incremento de los problemas sanitarios potenciados por los cambios en los ecosistemas que generan la actividad antropogénica y el cambio climático global.



*Figura 1: Mapa de densidad de apiarios y ubicación de las cabañas apícolas. Figura realizada con Biorender.com*

## **Factores ambientales, parásitos y enfermedades que afectan a las abejas**

Numerosas amenazas afectan a las abejas; entre ellas se pueden nombrar a los productos tóxicos, el cambio en los ecosistemas, especies invasoras, enfermedades causadas por patógenos y parásitos (figura 2). Entre los factores climáticos, la temperatura, precipitaciones y humedad relativa influyen de manera directa e indirecta tanto a la producción como a la sanidad apícola. La temperatura afecta las actividades que realizan las abejas tanto fuera como dentro de la colonia. Las actividades externas incluyen el vuelo para la búsqueda de alimentos o las acciones de la reina y zánganos; por otro lado, las actividades dentro de la colonia involucran la alimentación de las crías, almacenamiento de alimentos y la homeostasis de la colonia a un rango adecuado de temperatura que varía de 33° a 36° C (Kleinhenz et al., 2003). Además, los rasgos fisiológicos de los insectos están determinados por las temperaturas ambientales, los cuales pueden influir en sus interacciones con patógenos como los virus, contribuyendo a las variaciones estacionales en las incidencias de los mismos (Dalmon et al., 2019). Otro factor importante es la humedad relativa (HR), la cual, dentro de la colonia puede ser regulada por las abejas (Li et al., 2016), en caso de condiciones de baja HR, las abejas muestran un comportamiento específico, como la evaporación del agua de néctar y forrajeo para la recolección de agua para aumentar la HR (Human et al., 2006); durante una HR elevada, el comportamiento de ventilación reduce la HR para estar dentro del rango óptimo. Sumado a esto, es muy importante para la eclosión de huevos, el rango óptimo de humedad relativa para una normal eclosión es del 90 al 95%. Una humedad relativa más alta o más baja reduce significativamente el número de huevos normalmente eclosionados (Doull, 1976). Por otra parte, para la cría *in vitro* de larvas de abejas melíferas, se sugirió una temperatura de 34° C y HR de 96% (Aupinel et al., 2005; Silva et al., 2009) o HR del 90% (Kaftanoglu et al., 2011). Además, se ha encontrado que una HR baja (del 50% al 15%) impactó negativamente sobre la supervivencia de las abejas adultas (Abou-Shaara et al., 2012).

La sanidad de las colmenas también se ve amenazada por ectoparásitos y patógenos (bacterias, virus, hongos), los cuales pueden provocar daños que van desde una disminución en la producción hasta la mortalidad de las colonias. Éstos pueden actuar en forma individual o interactuando entre ellos (Allen & Ball, 1996; Martin, 2001; Sumpter & Martin, 2004). Entre las parasitosis, la producida por el ácaro *Varroa destructor*, es

considerada una de las principales causas de disminución en la producción de miel y pérdida de colmenas ya que influye de manera negativa, no solo en el individuo sino en la colonia completa (Guzmán-Novoa et al., 2010; Le Conte et al., 2010). El ciclo de vida de este ácaro involucra dos etapas distintas, la fase forética, ocurre en la abeja adulta y la fase reproductiva, dentro de una celda de cría de abeja (figura 3). La invasión de la celda de cría ocurre algunas horas antes de que se selle una celda que contiene una larva de abeja. Dentro de la celda, el ácaro se alimenta de la hemolinfa de la pupa y pone sus huevos en la superficie de la pared celular, estos huevos producen primero un macho y luego algunas hembras. Las crías se aparean entre sí de modo que, cuando la abeja adulta sale de la celda, tanto la hembra invasora como las crías del ácaro abandonan la celda. Luego se transfieren a una abeja adulta, donde pasan a la fase forética, antes de ingresar a una celda de cría para reproducirse nuevamente. En las abejas adultas, los ácaros se fijan a los esternitos, perforan la cutícula y debilitan al individuo afectando su comportamiento y provocando desorientación en el vuelo. Además, se alimentan de los cuerpos grasos de las abejas considerados el centro homeostático de las abejas adultas, lo que compromete su estatus nutricional e inmunológico (Ramsey et al., 2019). Por otro lado, los ácaros machos no pueden sobrevivir fuera de la celda y mueren. Respecto a los ácaros hembra, pueden pasar por dos o tres ciclos a lo largo de su vida (Nazzi & Le Conte, 2016).

Además, *Varroa destructor* también actúa como vector de numerosas virosis, aumentando de esta forma el daño sobre la población de abejas.

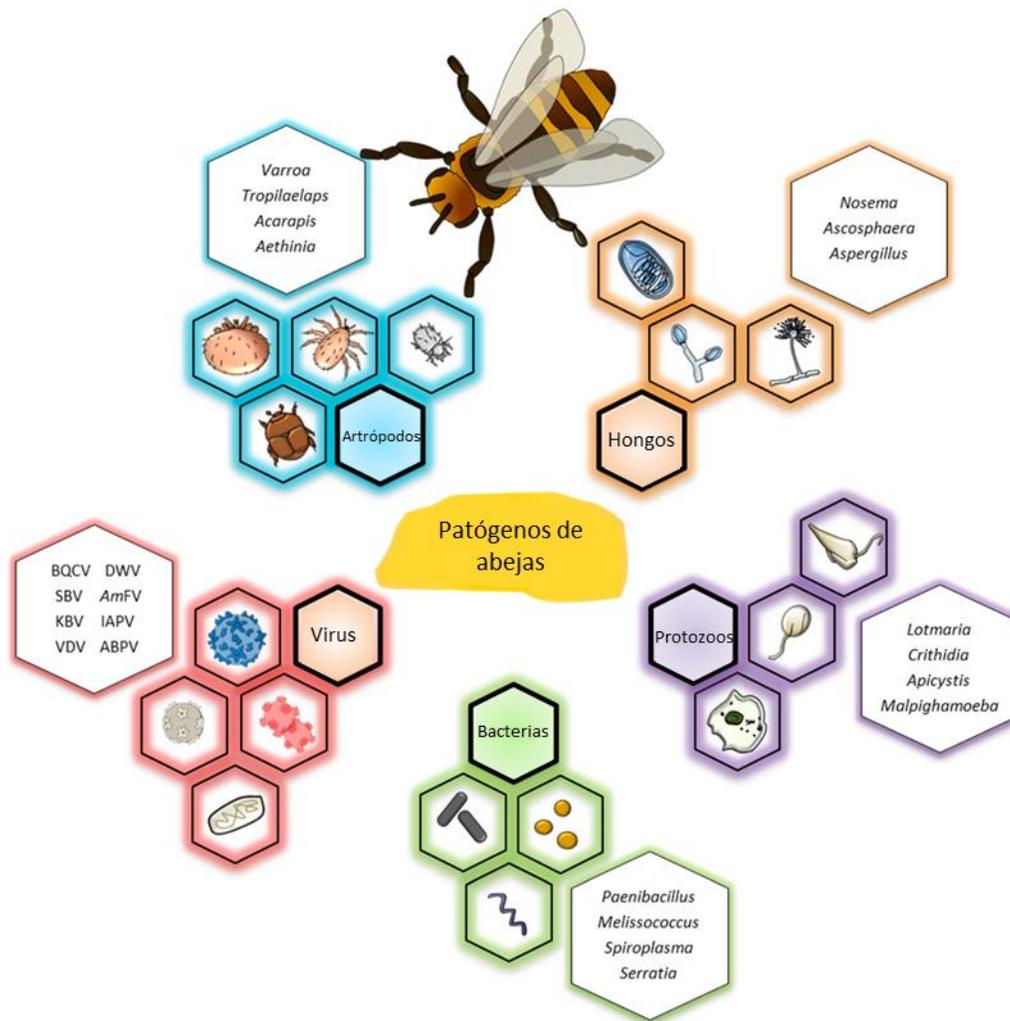


Figura 2: Representación esquemática de los principales patógenos que afectan a *Apis mellifera*. Entre los patógenos se mencionan los siguientes virus: Virus de las celdas reales negras (BQCV), Virus de las alas deformadas (DWV), Virus de la cría ensacada (SBV), Virus filamentoso *A. mellifera* (AmFV), Virus de Cachemira (KBV), Virus israelí de la parálisis aguda (IAPV), Virus varroa destructor (VDV), Virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV). (Modificado de: Lannutti et al., 2022)

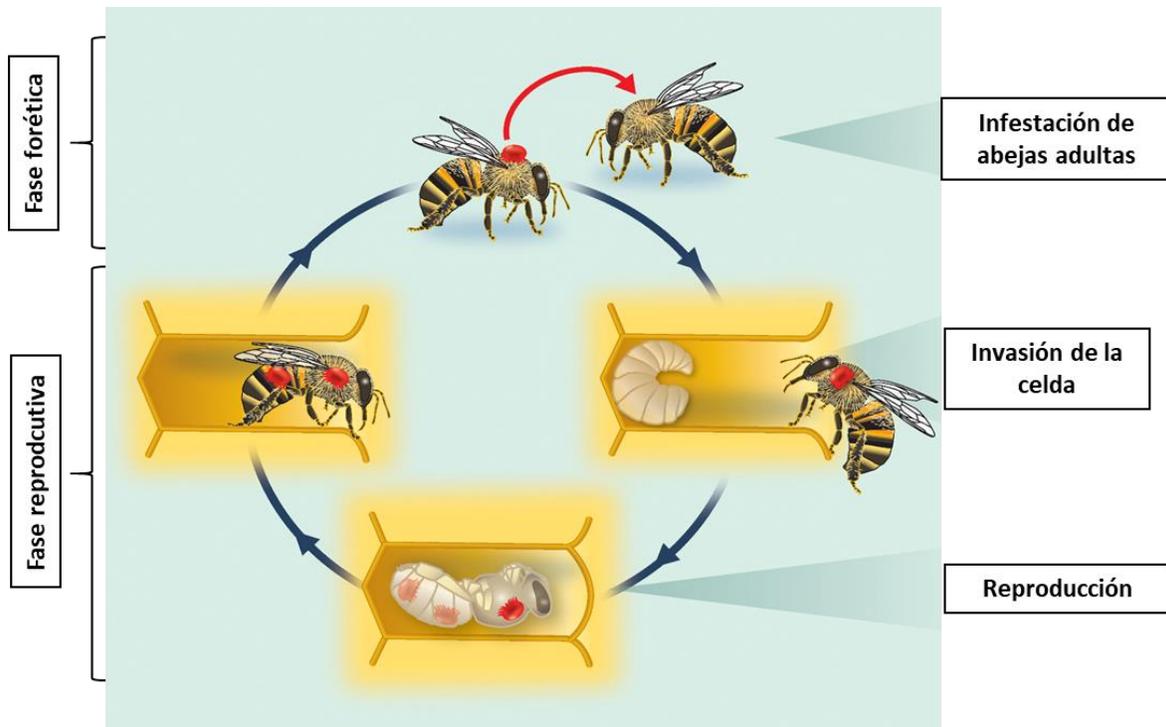


Figura 3: Ciclo de vida de *Varroa destructor* en fase reproductiva y fase forética. (Modificado de: Nazi & Le Conte, 2016)

Otra de las patologías en los apiarios, es la presencia de Nosemosis, una enfermedad parasitaria intestinal y contagiosa, descrita por primera vez en el año 1909 (Zander, 1909); es causada por el hongo microsporidio denominado *Nosema apis*, que parasita las células de la pared interna del intestino de las abejas causando, muerte prematura, incapacidad para el vuelo, temblores de alas y movimientos espasmódicos. Produce además, una disminución de la vida media de las abejas debido a la reducción de reservas proteicas. Otro signo clínico frecuente, es la diarrea muy líquida y de color marrón más o menos oscuro, perceptible en piquera y en el interior de los cuadros (Kang et al., 1976). La tolerancia a otras enfermedades es menor cuando las colonias están afectadas por Nosemosis, ya que algunos virus que ingresan al organismo de la abeja por vía digestiva encuentran el medio óptimo para su desarrollo en aquellos individuos, cuyos intestinos se encuentran alterados por la acción del parásito. La enfermedad puede ser diagnosticada mediante el conteo de esporas (SENASA, 2020).

## Virus que afectan a las abejas

Entre los patógenos, los virus se destacan por el nivel de daño que son capaces de producir en la colmena. Hasta el momento, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, se detectaron en el mundo más de 70 virus en abejas melíferas (Beaurepaire et al., 2020). Muchos de ellos, pertenecen a las familias Districtoviridae (Virus israelí de la parálisis de las abejas, IAPV; virus de las abejas de Kashmer, KBV; Virus de la parálisis aguda de las abejas, ABPV; Virus de las celdas reales negras, BQCV) e Iflaviridae (Virus de alas deformadas, DWV; Virus kakugo, KV; Virus varroa destructor 1, VDV-1/DWV- B, Virus de la cría ensacada, SBV; Virus de la parálisis lenta de las abejas, SBPV), mientras otros no están clasificados, como el Virus de la parálisis crónica de las abejas (CBPV) o el Virus del lago Sinaí (LSV). Avances recientes en metagenómica han permitido identificar nuevos virus en abejas y otros polinizadores; incluyendo el Virus Macula-like de abeja (BeeMLV) de la familia Tymoviridae, *Osmia cornuta nudivirus* (OcNV) de la familia Nudaviridae, *Apis rhabdovirus* (ARV-1), *A. mellifera iflavirus* y *A. mellifera feranovirus*, entre otros (Hartmann et al., 2015; Hou et al., 2017).

El genoma viral de la mayoría de los virus descritos es de ARN de cadena simple y polaridad positiva cubierto por una cápside proteica. Está unido covalentemente a una proteína de virión ligada al genoma (VPg) en el extremo 5' y posee una cola poli(A) en el extremo 3'. Además, los genomas de varios virus de las abejas melíferas están organizados en dos maneras (Chen et al., 2006). Por un lado, los genomas de ABPV, IAPV y BQCV son bicistrónicos monopartitos con genes no estructurales en el extremo 5' y genes estructurales en el extremo 3' organizados en dos marcos abiertos de lectura (ORF) separados por una región intergénica no traducida (IGR). La región 5' UTR y la región IGR entre los dos ORF puede iniciar eficientemente la traducción con el sitio de entrada ribosomal interno (IRES) (Figura 1 A), y por otro lado, los genomas de SBV y DWV son monocistrónicos monopartitos con genes estructurales en el extremo 5' y genes no estructurales en el extremo 3'; poseen además, un solo ORF (Figura 4 B). Los virus de ARN tienen altas tasas de mutación y a menudo, forman diversas poblaciones de variantes o cuasi-especies (J. Kevill et al., 2017). Por el contrario, se han identificado muy pocos virus con genomas de ADN, como el virus filamentoso *A. mellifera* (AmFV) (Hou et al., 2017) y OcNV (Galbraith et al., 2018).

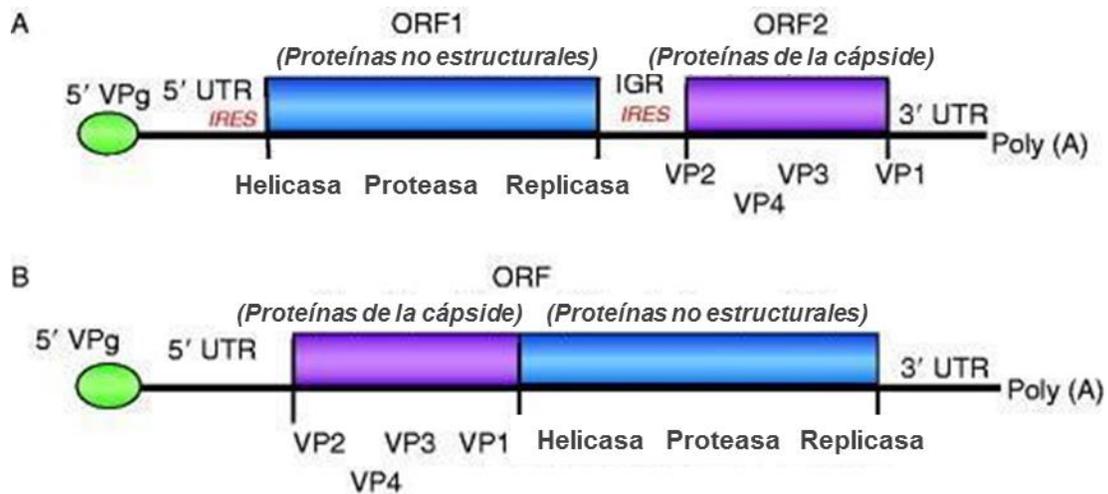


Figura 4: Representación esquemática de los genomas virales de las abejas melíferas. A: Representación esquemática de los genomas de ABPV, IAPV y BQCV. B: Representación esquemática de los genomas de SBV y DWV. Proteína del virión ligada al genoma (VPg), región no traducida (UTR), sitio de entrada ribosomal interno (IRES), marco abierto de lectura (ORF), región intergénica (IGR), poliproteína estructural 1 (VP1), poliproteína estructural 2 (VP2), poliproteína estructural 3, poliproteína estructural 4 (VP4), cola de nucleótidos A (Poly A). (Modificado de: Chen et al., 2006).

DWV es uno de los principales virus que afectan a la abeja melífera. Se han descrito tres variantes, que comprenden DWV-A, DWV-B (también conocido como V. destructor virus-1) y DWV-C. Las variantes de DWV-C agrupan todas las secuencias resultantes de la recombinación entre DWV-A y DWV-B (J. L. Kevill et al., 2019). DWV se propaga a través de varias rutas de transmisión y el ectoparásito *V. destructor* funciona como un vector eficiente dentro de la colonia (Posada-Florez et al., 2019). Este virus infecta a todas las castas de abejas (zángano, obrera, reina) y se ha detectado en todas las etapas de desarrollo de *A. mellifera* (huevo, larva, pupa y adulto). La infección por este virus se asocia con la aparición de abejas con deformidades en las alas, imposibilitando su vuelo, lo que da como resultado una esperanza de vida más corta que se manifiesta a nivel de colonia por una disminución progresiva del tamaño de la población (Anguiano-Baez et al., 2016)

SBV se describió por primera vez en 1913 y fue caracterizado en 1964 (Bailey et al., 1964). La larva de aproximadamente 2 días es la más susceptible. La diseminación inicial en la colmena comienza cuando las abejas se infectan al remover las larvas muertas por este virus. Las partículas virales se acumulan en glándulas hipofaríngeas y diseminan el virus cuando alimentan larvas con sus secreciones glandulares; también contaminan el polen de flores con sus secreciones (Chen & Siede, 2007). El virus replica en las larvas y éstas se tornan amarillas pálidas, a medida que la infección avanza, la piel se engrosa y la larva no puede evolucionar hacia pupa ya que no puede digerir su cutícula. Las larvas quedan como un saco lleno de líquido.

CBPV fue el primer virus de abeja aislado y descrito de las abejas melíferas (Genersch & Aubert, 2010), pero su familia y género actualmente no están asignados. El CBPV tiene una distribución mundial y afecta a las colonias con dos tipos diferentes de signos clínicos. El primer tipo incluye parálisis, temblor, abdomen hinchado y provoca que las abejas se arrastren en el suelo por la imposibilidad de vuelo; el segundo incluye abejas negras, sin pelo, con abdómenes más cortos. En ambos casos, la colonia sufre pérdidas masivas de abejas obreras (Dittes et al., 2020).

IAPV es uno de los virus más estudiados porque puede infectar a todos los miembros de la colonia y su detección se correlaciona fuertemente con el trastorno de colapso de colonias (CCD) (Hou et al., 2014; Soroker et al., 2011). Al igual que con otros virus de abejas, *V. destructor* es un vector eficaz de IAPV (Francis et al., 2013). La infección por IAPV induce un amplio espectro de signos clínicos que incluyen parálisis y temblor corporal. Sin embargo, aún no se ha resuelto si el sistema neuronal es el tropismo preferido del virus. Deng y colaboradores, en el año 2021, investigaron la abundancia viral en diferentes tejidos de las abejas melíferas, detectando en la tráquea una mayor carga viral que en otros tejidos. Los autores concluyeron que los signos de parálisis o los temblores mitigaron la taquipnea inducida por la infección por IAPV (Deng et al., 2021). Este virus se describió por primera vez como un patógeno distinto del KBV y el ABPV, según la secuencia de su genoma obtenida en Israel en 2004 (Maori et al., 2007). En un análisis filogenético de IAPV, realizado por Palacios y colaboradores en el año 2008, se informó la existencia de al menos tres linajes distintos de IAPV; los autores también sugirieron la

posibilidad de eventos de recombinación e identificaron diferencias en las secuencias de codificación que pueden tener implicancias para la virulencia (Palacios et al., 2008).

BCQV está asociado a la muerte de larvas y pupas de abejas reinas, las cuales se tornan de color oscuro cuando son infectadas con este patógeno (Bailey & Woods, 1977). También causa mortalidad en abejas obreras adultas (Berényi et al., 2006). Es un virus muy diseminado en los apiarios, en los que persiste como infecciones asintomáticas de las abejas obreras (Chen et al., 2006). Sin embargo, cuando la infección ocurre en las pupas de reinas, el virus afecta las células de la piel, la cual se torna de un color amarillo pálido y adquiere un aspecto ensacado. A medida que la infección avanza, las lesiones impiden la normal evolución de la pupa, llevándola a su muerte, oscureciéndola rápidamente (figura 5) y adquiriendo la pared de la celda real el color de marrón oscuro a negro característico (Aubert, 2008). BQCV a menudo está presente en las abejas infestadas con el parásito microsporidio *Nosema Apis* (Allen & Ball, 1996) y puede potenciar la mortalidad causada por este parásito.



*Figura 5: Signos clínicos del Virus de las celdas reales negras. En la foto se muestra una pupa al 3er día post infección, con la sintomatología típica causada por este virus.*

ABPV es un agente infeccioso común de las abejas, frecuentemente detectado en colonias aparentemente sanas (Tantillo et al., 2015). Estas infecciones a veces son

exacerbadas y activadas por factores ambientales estresantes tales como infestaciones de ácaros, infecciones bacterianas, contaminación y el uso habitual de químicos e insecticidas en la tecnología agrícola. ABPV afecta a todas las etapas de las abejas, pero los hospedadores más favorables para la multiplicación del virus son las pupas (Sanpa & Chantawannakul, 2009). La infección en adultos se caracteriza por una parálisis progresiva, incluyendo temblor, incapacidad para volar, oscurecimiento gradual (figura 6) y pérdida de cabello del tórax y el abdomen (de Miranda et al., 2010).



*Figura 6: Signos clínicos del Virus de la parálisis aguda de las abejas. A la izquierda se observa una abeja adulta al 3er día post infección con la sintomatología típica causada por este virus; a la derecha se muestra una abeja adulta sana.*

### **Inmunidad apícola**

Las abejas poseen sistemas de inmunidad poblacional e individual; el primer caso se refiere a aquellas acciones conductuales cooperativas entre los miembros de una colonia que facilitan la eliminación y control de factores estresantes. Entre ellas, se pueden

mencionar: i) la recolección y uso de propóleos, los cuales poseen propiedades antimicrobianas y antisépticas, e impermeabilizan y sellan las paredes de la colmena, promoviendo temperatura y humedad estables para reducir cargas microbianas; ii) el acicalamiento (*autogrooming* o *allogrooming*), un comportamiento en el que las abejas usan sus patas y mandíbulas para desprender un ácaro de su cuerpo o del de otro miembro de la colonia; iii) el comportamiento higiénico, que es la capacidad de las abejas de detectar una cría enferma operculada para sacarla de la colmena; y iv) la fiebre social, que es el resultado de la generación de calor por parte de las abejas en el nido, lo que permite el control de patógenos en los hospedadores infectados (Larsen et al., 2019)

El segundo caso se refiere a los mecanismos de defensa individuales como las barreras físicas, el exoesqueleto, tubo traqueal y mucosa intestinal (Larsen et al., 2019). Además, poseen un sistema de inmunidad innata que involucra respuestas celulares, como los procesos de fagocitosis, encapsulamiento, nodulación y melanización mediados por hemocitos, granulocitos y plasmocitos que son transportados por la hemolinfa.

Sumado a esto y, como una segunda categoría de la inmunidad innata, existen respuestas humorales que representan el sistema de defensa más importante en insectos, incluidas las abejas melíferas. Este mecanismo de defensa, es mediado por sustancias químicas y por péptidos antimicrobianos y en este sentido, las abejas presentan genes para los componentes centrales de las cuatro vías intracelulares de señalización involucrados en la activación de los efectores de esta inmunidad: la vía Toll (transducción de señales transmembrana) está involucrada en la defensa contra bacterias Gram (+) y hongos, la vía Imd (inmunodeficiencia) es activada por bacterias Gram (-), la vía JNK (Jun N-terminal quinasa) y vía de señalización JAK/STAT (Janus quinasa/transductor de señales y activador de la transcripción) que producen la síntesis de péptidos antimicrobianos, y el ARNi que es un importante mecanismo antiviral producido mediante el silenciamiento de genes (figura 7). Este mecanismo de silenciamiento de los virus es inducido por un ARN doble cadena (ARNdc), que es clivado por una endonucleasa Dicer en pequeños ARN inhibidores (ARNsi) (Gammon & Mello, 2015). Estos siARNs sirven como guías específicas de secuencia para el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) para localizar y

destruir moléculas de ARN homólogos, incluidos los ARN virales (Gammon & Mello, 2015).

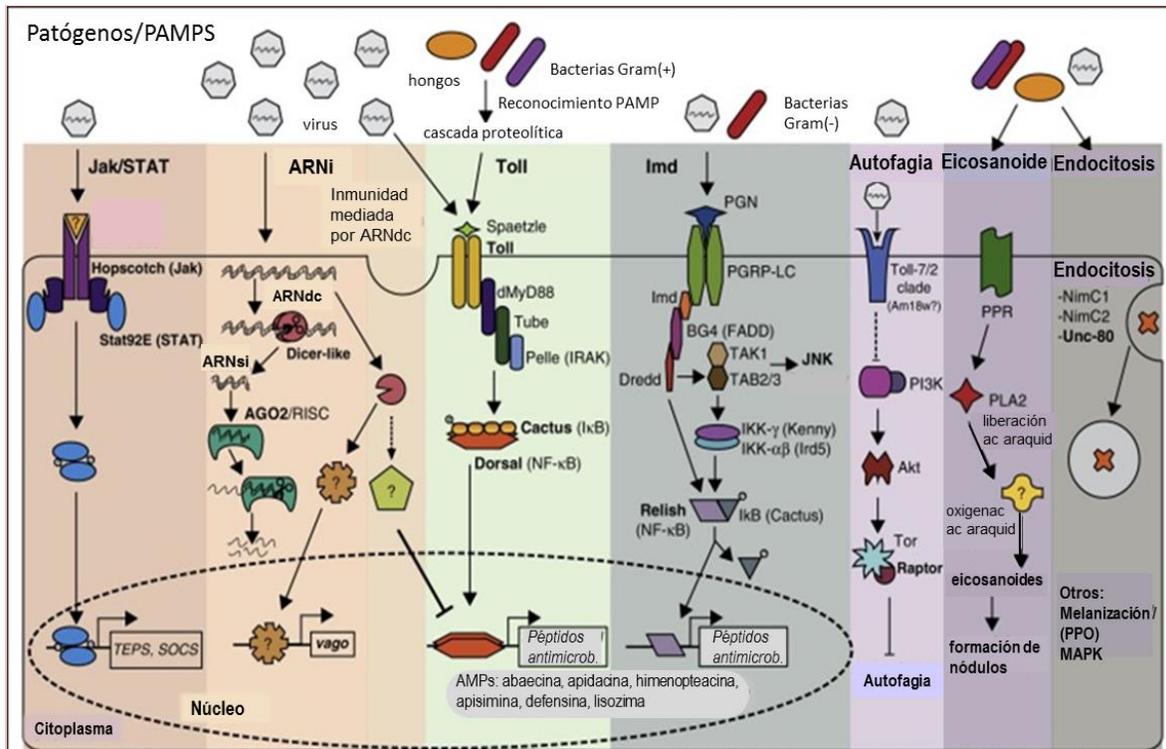


Figura 7: Vías inmunitarias de las abejas melíferas. La activación inmunitaria ocurre con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En negrita se resaltan los genes implicados en cada una de las vías. A continuación se detallan las abreviaturas: vía de señalización Janus quinasa/transductor de señales y activador de la transcripción (Jak/STAT), proteínas que contienen tioéster (TEPS), supresor de la señalización de citoquinas (SOCS); Mecanismo de ácido ribonucleico interferente (ARNi), ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc), pequeños ARN inhibidores (ARNsi), complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), peptidoglucano (PGN), proteína de reconocimiento de péptidoglicano LC (PGRP-LC), vía Jun N-terminal quinasa (JNK), receptores de reconocimiento de patógenos (PRR). (Modificado de: McMenamin et al., 2018)

Debido al impacto negativo que puede provocar la presencia viral en la producción apícola, esta Tesis aporta conocimiento sobre la presencia de virus de las abejas en apiarios productores de material vivo de Argentina; y evalúa una estrategia de control de virus mediante el uso ARN interferente, ya que este es un importante mecanismo antiviral producido de manera natural por las abejas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la presencia de virus de las abejas en establecimientos productores de material vivo con la finalidad de realizar una caracterización a nivel molecular de los mismos y evaluar una estrategia de control para dos de los virus más prevalentes, mediante el uso de ARN interferente.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **1. Detección y caracterización de agentes virales en cabañas apícolas de la Argentina.**

- Determinar mediante técnicas moleculares, la presencia de agentes virales (DWV, ABPV, BQCV, CBPV, SBV e IAPV) presentes en establecimientos productores de material vivo localizados en diferentes regiones de Argentina.
- Amplificar y secuenciar fragmentos genómicos de los virus ABPV y BQCV obtenidos a partir de muestras tomadas en las cabañas apícolas, y realizar análisis filogenéticos con secuencias de otros países.

### **2. Desarrollo de una estrategia de control para ABPV y BQCV mediante la administración de ARN interferente**

- Generar ARNdc correspondientes a fragmentos de genes de ABPV y BQCV a fin de ser utilizados como blanco de silenciamiento.
- Evaluar *in vivo*, el efecto de la administración oral de ARNdc específico de ABPV y BQCV en abejas adultas *A. mellifera* infectadas artificialmente con los respectivos virus.

## **HIPÓTESIS**

Las hipótesis asociadas a los objetivos específicos que se pondrán a prueba en esta tesis son:

1. En los apiarios productores de material vivo pueden detectarse diferentes agentes virales en formas de infecciones simples o múltiples.
2. La presencia de agentes virales en abejas puede reducirse mediante el uso de ARN interferente.

## CAPÍTULO 2



## **DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGENTES VIRALES EN CABAÑAS APÍCOLAS DE LA ARGENTINA.**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

#### **Virus en cabañas apícolas**

En condiciones óptimas de nutrición y sanidad, las abejas poseen mecanismos individuales y poblacionales de resistencia que les permiten mantener la circulación de estos virus en niveles subletales. Esto puede deberse a que una colonia contiene entre 20.000 a 80.000 miembros y poseen mecanismos de inmunidad social e individual, que van a contrarrestar la circulación de diferentes patógenos. De esta forma, pueden estar presentes en las colmenas sin que las abejas muestren síntomas claros (Gauthier et al., 2007). Sin embargo, los procedimientos metodológicos y la manipulación frecuente utilizados en la producción de material vivo, exponen a las abejas a condiciones de estrés que podrían determinar el incremento de la circulación de ciertos virus (Gregorc & Bakonyi, 2012). En el caso de cría de reinas, los virus pueden replicar de manera exponencial y determinar la mortandad de las mismas, influyendo directamente en la disminución de celdas reales y reinas para la comercialización y abastecimiento de otros apiarios, perjudicando la comercialización y economía tanto de los apiarios productores de material vivo como los apiarios receptores de ese material. En varios estudios se detectaron virus en cabañas apícolas, Gregorc y Bakonyi, hallaron un alto porcentaje de infección por ABPV en colmenares de cría de reinas en Eslovenia (Gregorc & Bakonyi, 2012). Por otro lado, Ravoet y colaboradores en el año 2015, describieron la presencia viral en huevos de reinas en un control sanitario de un programa de crianza, evidenciando la transmisión vertical de los virus (Ravoet et al., 2015). Prodelalová, en el año 2019, detectó genoma viral en el 91% de las muestras de semen de zánganos aparentemente sanos utilizados para la inseminación artificial, lo cual indica una vía de transmisión de virus de abejas favorecida por la comercialización (Prodělalová et al., 2019).

Por otro lado, se estudió la aparición de ABPV, BQCV y DWV en obreras y reinas durante la producción de reinas en diferentes castas (obreras, nodrizas y reinas) y en los materiales de colonias (tejido y heces de reinas) durante dos años consecutivos. Los virus se detectaron esporádicamente durante las etapas de desarrollo de la reina (Žvokelj et al.,

2020). En el primer año del experimento BQCV fue detectado en todas las muestras de obreras en núcleos de apareamiento, mientras que la prevalencia del mismo virus en reinas fue del 50% (reinas colectadas de diferentes núcleos de apareamiento). El siguiente año, la prevalencia de BQCV en núcleos de apareamiento fue baja (4.2%) y todas las muestras de reinas fueron negativas para BQCV. Además, trece muestras de reinas (72%) fueron positivas para DWV en el segundo año del experimento. Aunque se detectó DWV en reinas y heces de reinas, las obreras del mismo núcleo a menudo estaban libres de DWV. La aparición de ABPV en reinas fue poco frecuente. Los resultados del trabajo mencionado, indican que estos tres virus de abejas melíferas están presentes cuando se crían reinas, pero parecen asintomáticos para las abejas infectadas (Žvokelj et al., 2020). Este trabajo refuerza el hecho de que muchas veces los virus están presentes generando infecciones subclínicas, por lo que la comercialización de reinas (y otros productos de las cabañas apícolas) puede constituir una fuente importante de dispersión de estos patógenos en las colmenas receptoras.

### **Virus en Argentina**

En Argentina, los estudios de los virus capaces de infectar a las abejas son escasos; sin embargo, se detectó la presencia de varios virus que afectan a las abejas de la miel, particularmente, ABPV, CBPV, SBV (Reynaldi et al., 2010), IAPV (Reynaldi et al., 2011), BQCV y DWV (Ding et al., 2016). En otros trabajos, se encontró una asociación positiva entre los niveles de infestación de *Varroa* y la prevalencia de DWV (Giacobino et al., 2016; Reynaldi et al., 2010).

Por otra parte, en un trabajo realizado por Molineri, en el año 2017, se detectó la presencia de virus en colonias situadas en condiciones agroecológicas diferentes (clima templado y subtropical): DWV (35%), ABPV, (21,5%), BQCV (8,0%), CBPV, (2,2%) y SBV (1,1%); sin embargo, no se detectaron KBV, ni IAPV en las colonias analizadas. Además, la combinación de DWV, ABPV y BQCV fue la co-infección por virus triple más frecuente observada en este estudio (Molineri et al., 2017).

Por otro lado, Quintana describió una alta prevalencia de AmFV en colmenares argentinos, éste fue un estudio retrospectivo de muestras de abejas melíferas que reveló que AmFV estuvo presente en Argentina desde el año 2006 (Quintana et al., 2021).

Como se mencionó, en Argentina se reportó la presencia de diferentes virus en apiarios productores de miel (Ding et al., 2016; Molineri et al., 2017; Quintana et al., 2021; Reynaldi et al., 2011; Salina et al., 2021), pero hay poca o nula información sobre la presencia viral y su influencia en la producción de material vivo.

Por lo tanto, dado que hay poca o nula información sobre secuencias virales argentinas, es de suma importancia secuenciar las cepas argentinas circulantes de virus para identificar posibles relaciones con cepas de otros países.

En este capítulo se describe la detección mediante técnicas moleculares de la presencia de agentes virales (DWV, ABPV, BQCV, CBPV, SBV e IAPV) presentes en 13 cabañas apícolas de diferentes provincias de Argentina; y la caracterización mediante la secuenciación de fragmentos genómicos de los virus ABPV y BQCV con el fin de realizar análisis filogenéticos con secuencias de otros países.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Área de estudio**

La toma de muestras se realizó en 13 establecimientos productores de material vivo de distintas regiones y climas del país pertenecientes a las provincias de Entre Ríos, Córdoba, Santa Fe, Tucumán, Mendoza y Buenos Aires (figura 8, cuadro 1). Se recolectaron un total de 439 muestras de abejas nodrizas provenientes de 424 colonias y 15 pupas de reinas (con signos de infección viral) durante el período comprendido entre 2015 y 2017. En cada establecimiento se tomaron muestras de 30-50 abejas nodrizas de cuadros de cría (figura 9). De cada sitio se registró la siguiente información: datos de temperatura y humedad relativa del día y del lugar donde se realizó el muestreo a través del Sistema de Información y Gestión Agrometeorológica (SIGA, INTA) y presencia de otros agentes (*Varroa destructor* y *Nosema Apis*). Las muestras tomadas se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.



*Figura 8: Localización de las cabañas muestreadas en las diferentes provincias de la Argentina*



*Figura 9: Toma de muestra de abejas nodrizas de un cuadro de cría.*

*Cuadro 1: Detalle del muestreo realizado por año y provincia.*

Cabaña	Ubicación	Provincia	Mes-Año	N° muestras	Tipo de muestra
1	Alberdi	Tucumán	oct 2015	19	Abeja adulta
1	Alberdi	Tucumán	oct 2015	7	Pupa
1	Alberdi	Tucumán	oct 2017	19	Abeja adulta
2	Tunuyán	Mendoza	sept 2015	11	Abeja adulta
3	Tunuyán	Mendoza	sept 2015	15	Abeja adulta
2	Tunuyán	Mendoza	feb 2016	12	Abeja adulta
3	Tunuyán	Mendoza	feb 2016	12	Abeja adulta
2	Tunuyán	Mendoza	sept 2016	6	Abeja adulta
3	Tunuyán	Mendoza	sept 2016	6	Abeja adulta
2	Tunuyán	Mendoza	oct 2017	11	Abeja adulta
3	Tunuyán	Mendoza	oct 2017	15	Abeja adulta
4	Maciá	Entre Ríos	nov 2015	19	Abeja adulta
5	Maciá	Entre Ríos	nov 2015	8	Pupa
4	Maciá	Entre Ríos	feb 2016	20	Abeja adulta
4	Maciá	Entre Ríos	nov 2017	20	Abeja adulta
6	San Salvador	Entre Ríos	nov 2017	20	Abeja adulta
7	Carrilobo	Córdoba	sept 2017	96	Abeja adulta
8	Malabrigo	Santa Fe	sept 2016	10	Abeja adulta
9	Malabrigo	Santa Fe	sept 2016	20	Abeja adulta
10	Malabrigo	Santa Fe	sept 2016	20	Abeja adulta
9	Malabrigo	Santa Fe	nov 2017	15	Abeja adulta
10	Malabrigo	Santa Fe	nov 2017	17	Abeja adulta
11	Malabrigo	Santa Fe	nov 2017	10	Abeja adulta
12	Malabrigo	Santa Fe	nov 2017	10	Abeja adulta
13	Berisso	Buenos Aires	nov 2017	21	Abeja adulta

### **2.2.2 Procesamiento de las muestras y extracción del ARN viral**

El material colectado en cada colmena se agrupó en pooles de 30 abejas. Las abejas de cada pool se maceraron en mortero, resuspendiendo el macerado en buffer fosfato pH 7 (PBS). Se clarificó a 3645 x g durante 45 minutos y se colectó el sobrenadante. La extracción del ARN se realizó con Trizol<sup>®</sup>, según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, a 200 µl de macerado se le agregó 1 ml de Trizol, se mezcló con vortex y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego, se adicionaron 200 µl de cloroformo, se volvió a mezclar con vortex e incubar por 3 minutos a TA. Se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos y se colectó la fase acuosa. Se agregaron 10 µg de glucógeno (libre de ARNasas y ADNasas) y 0,5 ml de isopropanol. Luego de incubar por 10 minutos a TA, se centrifugó a 12.000 x g, 10 minutos a 4°C. El ARN precipitado se lavó con etanol 75% y se resuspendió de 10 a 50 µl de agua ultrapura (libre de ARNasas y ADNasas) con el agregado de 40U de RNAsin (Promega). Se cuantificó y verificó la calidad del ARN extraído en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop 2000, Thermofisher), finalmente se conservó a -80°C hasta su utilización.

### **2.2.3 Detección de los agentes virales**

La presencia de los virus DWV, SBV, ABPV, CBPV, IAPV y BQCV se realizó mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real utilizando los cebadores (cuadro 2) y controles descritos por Locke (Locke et al., 2012)

*Cuadro 2: Secuencias de los cebadores y tamaño de los fragmentos amplificados para cada uno de los virus.*

Virus	Nombre de los cebadores	Secuencia de los cebadores (5' a 3')	Tamaño del amplificado
ABPV	ABPV-F6548	TCATACCTGCCGATCAAG	197pb
	KIABPV-B6707	CTGAATAATACTGTGCGTATC	
BQCV	BQCV-qF7893	AGTGGCGGAGATGTATGC	294 pb
	BQCV-qB8150	GGAGGTGAAGTGGCTATATC	
CBPV	CBPV1-qF1818	CAACCTGCCTCAACACAG	296 pb
	CBPV1-qB2077	AATCTGGCAAGGTTGAGTGG	
DWV	DWV-F8668	TTCATTAAGCCACCTGGAACATC	136 pb
	DWV-B8757	TTTCCTCATTAAGTGTGCGTTGA	
IAPV	IAPV-F6627	CCATGCCTGGCGATTAC	206pb
	KIABPV-B6707	CTGAATAATACTGTGCGTATC	
SBV	SBV-qF3164	TTGGAACCTACGCATTCTCTG	335 pb
	SBV-qB3461	GCTCTAACCTCGCATCAAC	

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó empleando la enzima MMLV-RT (Promega) y hexámeros (Biodynamics). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 200U MMLV-RT, 0,1 µg/µl de hexámeros, 125 µM dNTPs, 5 µl ARN, buffer provisto por el fabricante del kit de MMLV-RT y agua ultrapura (libre de ADNasas y ARNasas) hasta un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se incubó 60 minutos a 42°C y luego 5 min a 95°C para inactivar la RT. Se incluyó un control sin templado y un control positivo (ARN de una muestra positiva). El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su utilización.

La PCR en tiempo real para cada virus se realizó empleando la metodología de intercalantes. Las condiciones de reacción fueron iguales para la detección de todos los virus. Se utilizó el kit master mix SYBER green PCR QuantiTect QIAGEN y se incluyeron los cebadores específicos (0,4 µM), 2 µl de ADNc y agua ultrapura (libre de ADNasas y ARNasas) hasta un volumen final de 12 µl. El perfil térmico empleado fue el siguiente: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 58 °C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, en el termociclador LightCycler 2.0 Roche.

Se incluyeron controles sin templado y controles positivos de PCR (ADN de plásmido recombinante con el amplicón de cada uno de los virus insertados en el vector pGEM-T Easy) previamente obtenidos en el laboratorio.

#### **2.2.4 Amplificación de virus de interés.**

La amplificación viral por inyección en pupas es generalmente muy eficiente, requiere dosis y concentraciones de virus muy bajas para establecer una infección ( $10^2$  - $10^4$  copias génicas/ $\mu$ l, dependiendo del virus). Se utilizó la metodología descrita por Miranda (de Miranda et al., 2013) con modificaciones detalladas en el siguiente párrafo.

Las muestras positivas por RT-PCR en tiempo real para los virus de ABPV y BQCV provenientes de las cabañas apícolas que tenían pérdidas en la producción, fueron amplificadas mediante técnicas “*in vivo*”. Las pupas utilizadas para la amplificación viral, se extrajeron de un marco de cría con pinzas, levantando con cuidado la pupa fuera de su celda. Luego fueron colocadas en una placa de Petri de vidrio que contenía un papel de filtro circular humedecido con agua estéril (figura 10).



*Figura 10: Proceso de extracción y colección de pupas del marco de cría.*

Para la técnica “*in vivo*” se realizaron inoculaciones con jeringa Hamilton (10 a 50  $\mu$ l) en pupas de estadio de ojos rojos, insertando la aguja entre el 4° y 5° segmento del abdomen, inyectando 1~5  $\mu$ l de suspensión de virus conteniendo  $10^3$  copias génicas/ $\mu$ l (cg/ $\mu$ l). Luego, fueron mantenidas en placas de cultivo celular de 24 pocillos a 30°C y 60% de humedad. Se las observó cada 24hs y a los 3 días post-inoculación se congeló la placa a -80 °C para su posterior procesamiento y purificación viral.

### **2.2.5 Purificación viral**

Se realizó la purificación de los virus ABPV y BQCV mediante gradientes continuos de sacarosa y ultracentrifugación (Pega et al., 2013). Se utilizaron 44 pupas previamente inyectadas para cada virus por separado. Las mismas se maceraron en 5 ml de buffer NET (NaCl 0.1 M, EDTA 0.004 M, Tris 0.05 M, pH 8.0), se centrifugaron durante 45 minutos a 3645 x g a 4°C, y se cosechó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron 3

lavados con cloroformo centrifugando durante 5 min a 405 x g y cosechando el sobrenadante en cada lavado. Se realizó una disgregación con 0.5 ml de sarkosyl 6% cada 2 ml de sobrenadante y se mantuvo la solución a 4°C por 15 minutos. A continuación, se sembró la suspensión viral en el gradiente continuo de sacarosa (15 a 41.25%) y se sometió a ultracentrifugación a 28000 rpm durante 3 horas a 4°C en rotor Beckman 28.38. Finalmente, se cosechó el gradiente conteniendo la suspensión viral en microplacas de 96 pocillos mediante bomba peristáltica con un flujo de 1.12 ml/min. Los eluatos se enumeraron correlativamente desde el de mayor densidad y se realizó una lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop 2000, Thermofisher). Los virus purificados se mantuvieron almacenados a -80°C.

### **2.2.6 Cuantificación de cargas virales**

La cuantificación de los virus ABPV y BQCV se realizó mediante la técnica de RT-qPCR utilizando los cebadores y controles descritos por Locke (Locke et al., 2012).

Para realizar la RT-qPCR de cada virus se utilizó el kit iTaq Universal SYBRGreen One-Step (BIORAD). Las condiciones de reacción fueron 6 µl de enzima SYBRGreen One-Step, 0,96 µl de cada primer específico (0,4 µM), 0,15 µl de transcriptasa reversa, 1,93 µl agua ultrapura (libre de ADNasas y ARNasas) y 2 µl de ARN hasta un volumen final de 12 µl. Las muestras se sembraron por duplicado y en cada reacción, se incluyeron controles sin templado y 5 diluciones seriadas, cada una sembrada por triplicado, de ADN de plásmido recombinante con el amplicón de cada uno de los virus clonados en el vector pGEM-T Easy previamente obtenidos en el laboratorio. El perfil térmico empleado fue el siguiente: 50°C durante 10 minutos (para la transcripción reversa), 95 °C durante 1 minuto, 40 ciclos a 95 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 30 segundos, en el termociclador CFX96 (BIORAD). Se consideraron aceptables aquellos ensayos que arrojaron valores entre 90-110% para la eficiencia de la reacción (Bustin et al., 2009).

Las cargas virales de los virus purificados se calcularon utilizando las curvas estándar elaboradas con las 5 diluciones de plásmidos recombinantes utilizados en cada reacción. La carga viral se expresó como copias génicas/ul en el tubo de reacción.

### **2.2.7 Preservación del material conteniendo virus.**

Las muestras positivas a los distintos virus (abejas, pupas y sobrenadantes de macerados), semillas madres (hasta 3 pasaje “in vivo”), y virus purificados fueron depositadas en el cepario del Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas. Para ello, se realizó un registro indicando tipo de muestra, virus, carga viral, origen (apiario, región, si proviene de casos con sintomatología o no).

### **2.2.8 Caracterización molecular**

Se realizó un análisis filogenético empleando muestras positivas provenientes de abejas con signos de infecciones virales de las cabañas que presentaban pérdidas en la producción de celdas reales para evaluar la relación genética entre ABPV y BQCV detectados en la cabaña de Entre Ríos que presentaba pérdidas en la producción de celdas reales y signos de infección viral, con cepas de diversos orígenes geográficos.

### **2.2.9 Amplificación por PCR de fragmentos génicos**

Los fragmentos de genes BQCV y ABPV de muestras positivas se amplificaron mediante RT-PCR, utilizando los cebadores BQCV-F (5'-TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC-3') y BQCV-R (5'-GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC-3') (Benjeddou et al., 2001), ABPV-F (5'-TCTGATGATGCTGAAGAGAGAAA-3') y ABPV-R (5'-AATCATCATTTGCCGGCTCTA-3), (Teixeira et al., 2008). Ambos fragmentos ABPV y BQCV (500 pb y 700 pb, respectivamente) pertenecen a la región codificante de sus respectivas proteínas estructurales (VP). La transcripción inversa se realizó con 200U de MMLV-RT (Promega), 0,1µg/µl de hexámeros, 125 µM dNTPs, 5 µl ARN, buffer provisto por el fabricante del kit de MMLV-RT y agua ultrapura (libre de ADNasas y ARNasas) hasta un volumen final de 25 µl. Se incubó la reacción a 42°C durante 1 hora, seguida de 10 minutos a 95°C. La PCR se efectuó empleando 2,5U de la enzima GoTaq (Promega), 125 µM de dNTPs, 0,3 µM de cada cebador, 5µl de ADNc y agua ultrapura (libre de ADNasas y ARNasas) hasta un volumen final de 25 µl. El perfil térmico utilizado para cada amplificación se detalla en el apéndice, cuadros 1 y 3.

Los fragmentos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de

agarosa 1 % en buffer TAE 1x (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM). Para visualizar las bandas de ADN se utilizó Gel Stain® (Transgen) a una concentración de 0,5 µg/ml de gel y un transiluminador de luz UV. Los geles se fotografiaron utilizando el equipo Fotodyne y el programa Quantity One (BIORAD).

#### **2.2.10 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa**

Los productos de amplificación por PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa. Para ello, a partir de la electroforesis en gel de agarosa se escindieron del gel las bandas del tamaño esperado utilizando un bisturí. La purificación se realizó con el kit comercial *EasyPure*® Quick Gel Extraction (Transgene) según recomendaciones del fabricante. El ADN obtenido fue resuspendido en 50µl de agua libre de ADNasas y ARNasas y cuantificado por espectrofotometría en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop 2000. Thermofisher).

#### **2.2.11 Secuenciación automática**

La secuenciación por Electroforesis Capilar de los productos de amplificación por PCR se realizó en la Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG (Instituto de Biotecnología, CICVyA). En este sector se trabaja con el kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y con el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Todas las secuencias se realizaron en ambas cadenas.

#### **2.2.12 Análisis filogenéticos**

Se realizaron análisis filogenéticos para evaluar posibles relaciones entre las secuencias argentinas con las de otros países.

La secuencia correspondiente a ABPV (GenBank MH077964) de 500 pb que codifica la proteína estructural VP1, se alineó con secuencias de los siguientes países: Hungría (AY053374.1, AY053372.1 y AY053375.1), Polonia (AY053371.1 y AY053370.1), Austria (AY053366.1), Alemania (AY053367 y AY053368.1), Sudáfrica (AF150629.1), EE. UU. (HM228893.1 y HM228890.1), Brasil (EU292210.1), Uruguay (AY763414.1) y Chile (KF011920.1). Por otra parte, el fragmento de 700 pb que codifica la poliproteína de la cápside de BQCV (GenBank MH053385), se alineó con secuencias de

los siguientes: Suiza (HG779864.1), China (JX679492.1 y JN185926.1), Corea del Sur (EU375537.1), Taiwán (GU108221.1), Hungría (EF517515.1), Perú (HG974555.1), Inglaterra (GU903464.1), EE. UU. (HQ655458.1), Uruguay (DQ364629.1), Sudáfrica (AF183905.1), Alemania (AF521640.1), Chile (KF011921.1) y Brasil (EU292211.1). Las secuencias se alinearon primero usando el programa Clustal X (Thompson, 1997) y los árboles filogenéticos se infirieron usando el programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016) con parámetros predeterminados usando el método Neighbor-Joining (NJ) y Bootstrap con 1000 repeticiones.

## **2.3 RESULTADOS**

### **2.3.1 Muestreos**

Se realizaron muestreos para detección de virus en 13 cabañas apícolas del país pertenecientes a las provincias de Entre Ríos, Córdoba, Santa Fe, Tucumán, Mendoza y Buenos Aires. Se obtuvieron un total de 439 muestras con 30-50 abejas nodrizas de cuadros de cría y pupas de reinas. Las cabañas muestreadas poseían una sanidad muy controlada, realizaban varias inspecciones para controlar patógenos y parásitos que pudieran afectar su producción. Sólo dos cabañas (una de Tucumán y una de Entre Ríos) presentaban pérdidas del 60% al 100% en la producción de celdas reales, con signos de infección viral. Por otro lado, los apicultores comentaron que solían tener pérdidas de celdas reales al inicio del mes de octubre y noviembre, pero luego la producción se restablecía sin tener grandes pérdidas durante todo el verano.

### **2.3.2 Detección de Virus de abejas**

Se determinó la presencia de 6 virus mediante RT-qPCR, en un total de 439 muestras. Se detectó presencia viral en 70 de las muestras colectadas (16% de las muestras totales).

Los virus detectados fueron: ABPV (7%), DWV (5%), BQCV (3%), SBV (0,2%). Se detectó coinfección entre ABPV-BQCV (1%), DWV-BQCV (0,2%) y DWV-ABPV (0,2%). No se detectaron CBPV e IAPV (figura 11). En la figura 12 se pueden observar los diferentes virus detectados por provincia en cada año de muestreo.

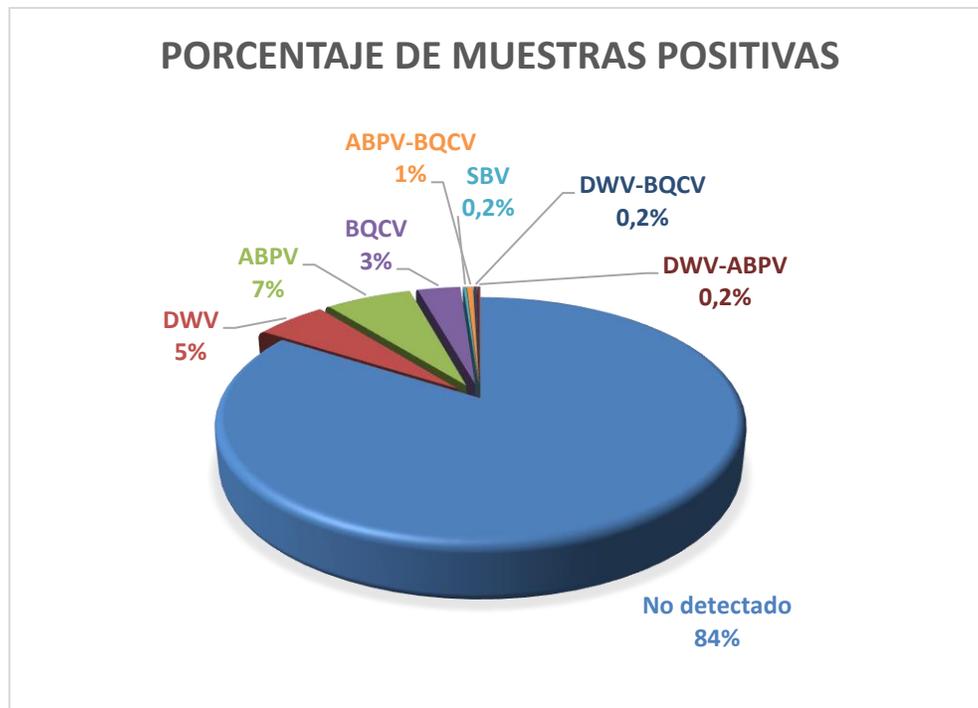


Figura 11: Gráfico de proporción de muestras positivas para cada virus

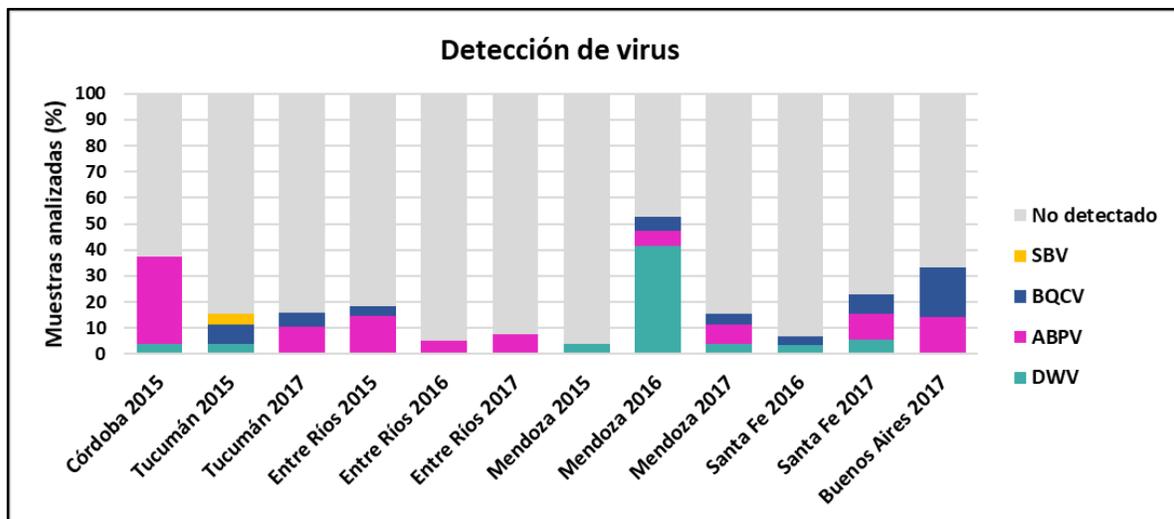


Figura 12: Detección de virus en cabañas apícolas. El gráfico presenta las muestras en las que se realizaron detecciones de virus por provincia durante los tres años de muestreo. En color gris el porcentaje de las muestras en las cuales no se detectaron virus, en amarillo porcentaje de muestras positivas para SBV, en petróleo el porcentaje de muestras positivas para BQCV, en magenta el porcentaje de muestras positivas para ABPV y en turquesa el porcentaje de muestras positivas para DWV.

Respecto al parásito *Varroa destructor*, se detectó en el 80,2% de las muestras y el porcentaje de colonias con alta infestación (mayor al 3%) fue del 6,56%; este nivel representa un valor crítico, dado que las colonias que pasan el invierno con más del 3% de carga de ácaros apenas sobreviven hasta la primavera siguiente (SENASA, 2010). Se detectó un porcentaje de infestación mayor a 3 % en Mendoza durante el año 2016. En la figura 13 se observan los porcentajes promedio de infestación con el ácaro por provincia en cada año de muestreo.

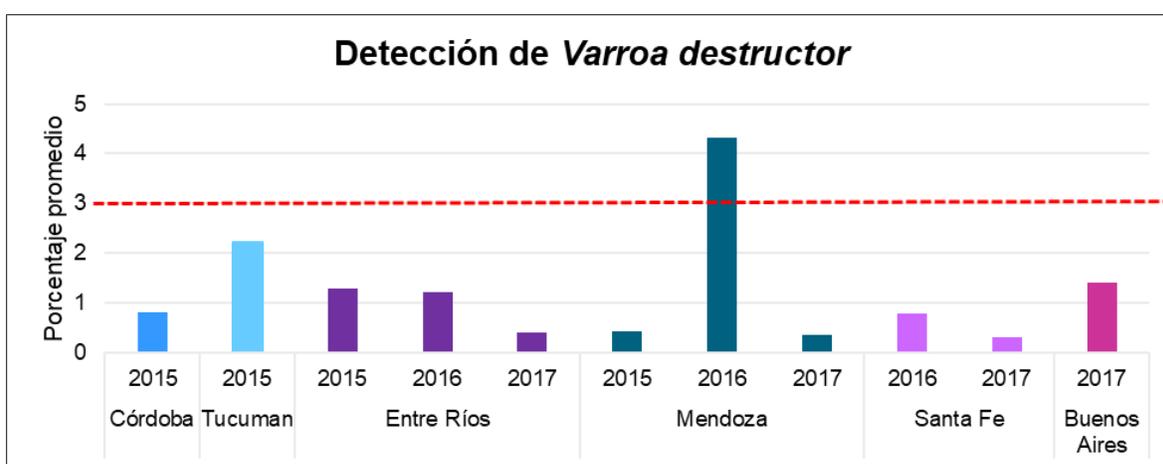


Figura 13: Detección de *Varroa destructor* en cabañas apícolas. El gráfico muestra el porcentaje promedio de detección de *Varroa destructor* por provincia durante los tres años de muestreo. La línea punteada color rojo representa el límite de % de infestación a partir del cual se recomienda realizar acciones para contrarrestar el impacto.

Por otra parte, el microsporidio *Nosema apis* se detectó en el 86,8% de las muestras analizadas. En la figura 14 se observa el recuento de espora promedio detectado por provincia y año de muestreo.

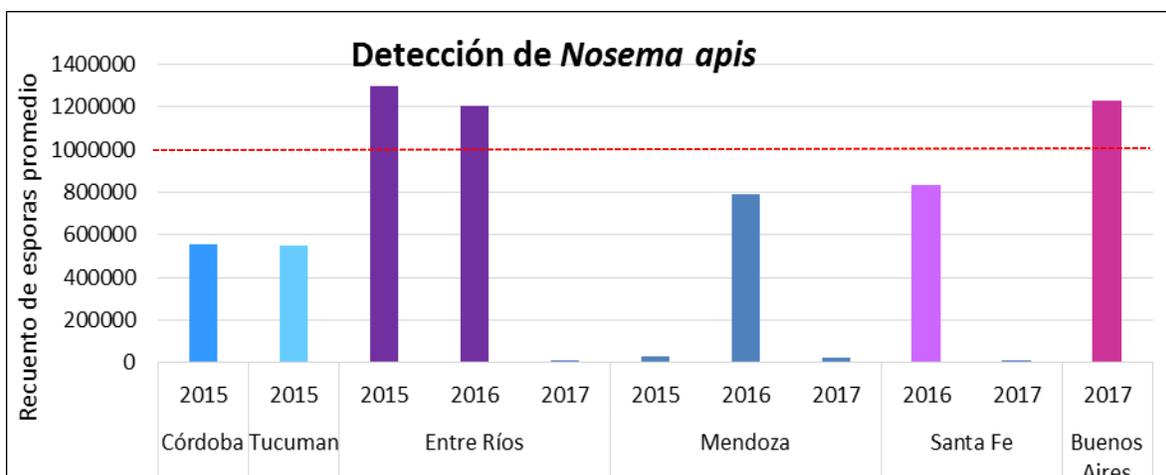


Figura 14: Detección de *Nosema apis* en cabañas apícolas. El gráfico representa el recuento de esporas promedio por provincia durante los tres años de muestreo. La línea punteada color rojo representa el límite de % de infestación a partir del cual se recomienda realizar acciones para contrarrestar el impacto.

Para analizar posibles relaciones entre los agentes y las variables meteorológicas registradas, se analizó la tendencia que presentaba la proporción de cabañas con distintos patógenos en función de las distintas variables meteorológicas (las cuales se pueden observar en el apéndice, cuadro 5). Se ajustaron modelos lineales generalizados en los que la variable respuesta fue la proporción de cabañas con presencia del patógeno en función de las variables meteorológicas (cuadro 9). El objetivo de este análisis fue meramente descriptivo, solo se buscaba determinar si existía tendencia y no su magnitud, dado que se cuenta con datos desbalanceados.

Cuadro 9: Esquema de comparación entre los diferentes agentes y las variables meteorológicas con sus correspondientes *p* valores calculados mediante el ajuste de un modelo logit (modelo lineal generalizado).

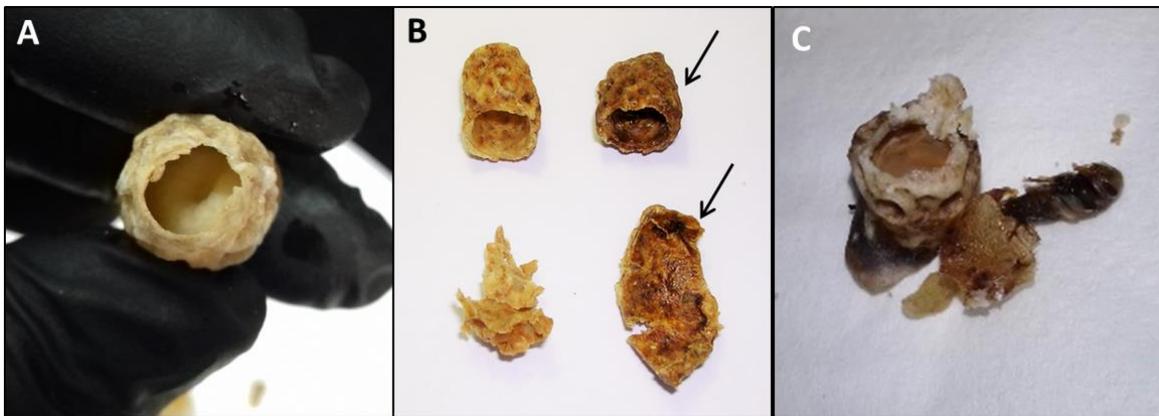
Variable		X2	Df	P
Presencia de Virus	Temp. Mínima	0.1102	1	0.7399
	Temp. Máxima	0.4593	1	0.4979
	Humedad relativa	28.984	1	0.0886
Presencia de Varroa	Temp. Mínima	0.7529	1	0.3856
	Temp. Máxima	0.4756	1	0.4904
	Humedad relativa	0.5560	1	0.4559
Presencia de Nosema	Temp. Mínima	0.6801	1	0.4095
	Temp. Máxima	0.2826	1	0.4949
	Humedad relativa	92.362	1	<b>0.0023**</b>
Presencia de Virus	Presencia de Varroa	0.3048	1	0.5808
Presencia de Virus	Presencia de Nosema	0.5696	1	0.4504
Presencia de Varroa	Presencia de Nosema	4.928	1	<b>0.0264*</b>

Se observaron asociaciones entre la presencia de nosema y la humedad relativa ( $p=0.0023$ ), se encontró que la presencia de nosema tendía a incrementarse con la humedad relativa, también se observó que la presencia de virus tendía a incrementarse con la humedad relativa ( $p=0.0886$ ) y no así con la temperatura máxima ni con la temperatura mínima, en cambio la presencia de varroa no mostró relación alguna con las variables meteorológicas registradas. Por otro lado, se encontraron asociaciones entre la presencia de varroa y la de nosema ( $p=0.0264$ ).

Por otra parte, las cabañas en las que se observó un alto porcentaje de mortalidad en pupas de reinas, presentaron pérdidas en la producción de un 60% a un 100% de celdas reales y signos de infecciones virales (figuras 15 y 16). En la cabaña proveniente de la provincia de Entre Ríos, se detectaron ABPV en el 62,5% de las pupas de reinas y BQCV en el 25%. En la de Tucumán, se detectaron BQCV en el 28,5% de las pupas de reinas y SBV en el 14,3%. En el cuadro 10 se observa detalladamente en cuales pupas de reinas se detectaron virus. Debido a los virus detectados, se efectuó un análisis particular del estado sanitario a fin de sugerir al productor apícola ciertas recomendaciones para disminuir la circulación viral y mejorar sus parámetros productivos.



*Figura 15: Celdas reales que no fueron aceptadas; las abejas nodrizas aceptaron 12 de 21 celdas con larvas*



*Figura 16: Celdas reales afectadas por BQCV. A. Celda real con bordes roídos. B. Pared interior oscura de una celda real afectada (marcada con flechas negras) en comparación con una celda real sana. C. Celda real con la pared interior oscura y pupa oscurecida producto de una infección viral.*

Cuadro 10: Detección de virus en pupas de reinas de los establecimientos que presentaban pérdidas en la producción.

Provincia	Año	Muestra	Presencia viral
Entre Ríos	2015	Pupa de reina 1	No detectado
Entre Ríos	2015	Pupa de reina 2	ABPV-BQCV
Entre Ríos	2015	Pupa de reina 3	No detectado
Entre Ríos	2015	Pupa de reina 4	ABPV
Entre Ríos	2015	Pupa de reina 5	ABPV-BQCV
Entre Ríos	2015	Pupa de reina 6	No detectado
Entre Ríos	2015	Pupa de reina 7	ABPV
Entre Ríos	2015	Pupa de reina 8	ABPV
Tucumán	2015	Pupa de reina 1	No detectado
Tucumán	2015	Pupa de reina 2	BQCV
Tucumán	2015	Pupa de reina 3	SBV
Tucumán	2015	Pupa de reina 4	No detectado
Tucumán	2015	Pupa de reina 5	BCQV
Tucumán	2015	Pupa de reina 6	No detectado
Tucumán	2015	Pupa de reina 7	No detectado

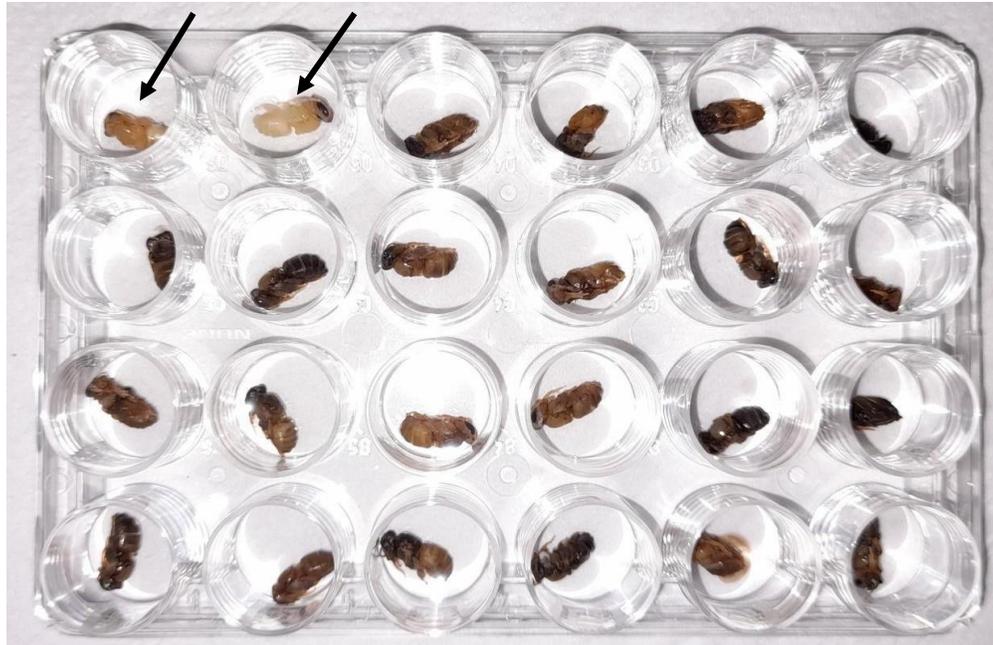
A partir de las detecciones de virus realizadas, se informó al productor apícola y se realizaron ciertas recomendaciones con la finalidad de disminuir la circulación viral, como la desinfección de todos los instrumentos involucrados en la producción de reinas (por ejemplo: pinzas para realizar el traslarve), el cambio de alimento para larvas y el ingreso de nuevas reinas fecundadas. Luego de estas recomendaciones, la cabaña apícola no ha vuelto a registrar la mortandad de larvas y pupas que venía ocurriendo, mejorando así la producción de celdas reales y de abejas reinas.

### 2.3.3 Amplificación de virus de interés.

Los virus presentes en las cabañas apícolas que tenían pérdidas en la producción fueron ABPV y BQCV, además de varios casos de co-infección entre ellos; debido a esto, se decidió realizar amplificación viral de los mismos para los posteriores ensayos de infección y silenciamiento de estos virus.

Las muestras positivas por RT-qPCR para los virus de ABPV y BQCV se amplificaron mediante técnicas “*in vivo*”. Se realizaron inoculaciones mediante inyección en pupas mantenidas en placas de cultivo celular de 24 pocillos, incubadas a 32°C con

humedad, recuperando la nueva producción de virus 3 días post-inoculación. Todas las pupas inyectadas con virus, se infectaron y mostraron signos típicos de infección viral (oscurecimiento gradual debido a la amplificación viral en los tejidos); por otro lado, en las pupas inyectadas con PBS no se observaron signos de infección viral y mostraron morfología normal. A modo de ejemplo se muestran las imágenes obtenidas para BQCV en las figuras 17 y 18.



*Figura 17: Amplificación de virus “in vivo”. Se muestran pupas de abejas infectadas con el virus de las celdas reales negras al tercer día post infección. Dos pupas fueron inyectadas con PBS, como control del procedimiento (marcadas con flechas negras).*



*Figura 18: Pupas de abejas infectadas con el virus de las celdas reales negras al tercer día post infección. (A) Control de pupa de abeja inyectada con PBS. (B) Pupa de abeja inyectada con el virus de las celdas reales negras.*

Luego de determinar la presencia de los virus amplificadas (mediante la técnica de RT-qPCR utilizando la metodología, cebadores y controles descritos en el punto 2.2.3) se procedió a realizar la purificación viral.

#### **2.3.4 Purificación viral**

Se realizó la purificación de los virus ABPV y BQCV mediante gradientes continuos de sacarosa y ultracentrifugación. Luego, se cosechó el gradiente conteniendo la suspensión viral en microplacas de 96 pocillos. Los eluatos se enumeraron correlativamente desde el de mayor densidad y se realizó la medición de proteínas y ácidos nucleicos totales por espectrofotometría. Para ambos virus, se observaron los picos de absorbancia a 260nm y 280 nm entre los pocillos 15 y 30, los cuales correspondían al virus purificado (figuras 19 y 20). Finalmente, se tomaron esos eluatos y se realizó la cuantificación de las cargas virales mediante RT-qPCR.

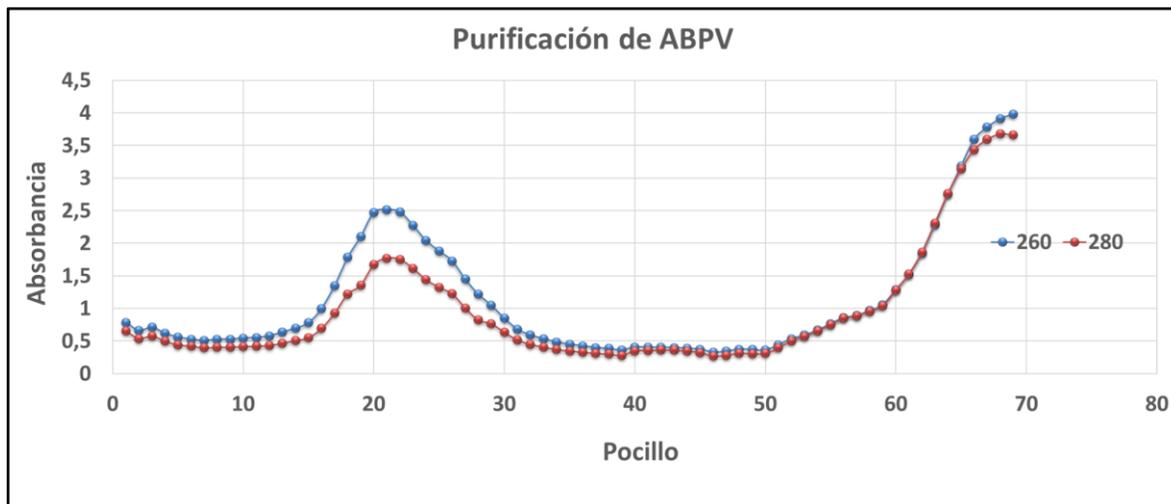


Figura 19: Purificación de ABPV por gradiente de densidad de sacarosa. El gráfico presenta las absorbancias del gradiente de sacarosa cosechado en fracciones consecutivas. En cada fracción se evaluaron las proteínas y los ácidos nucleicos a 280 y 260 nm, respectivamente.

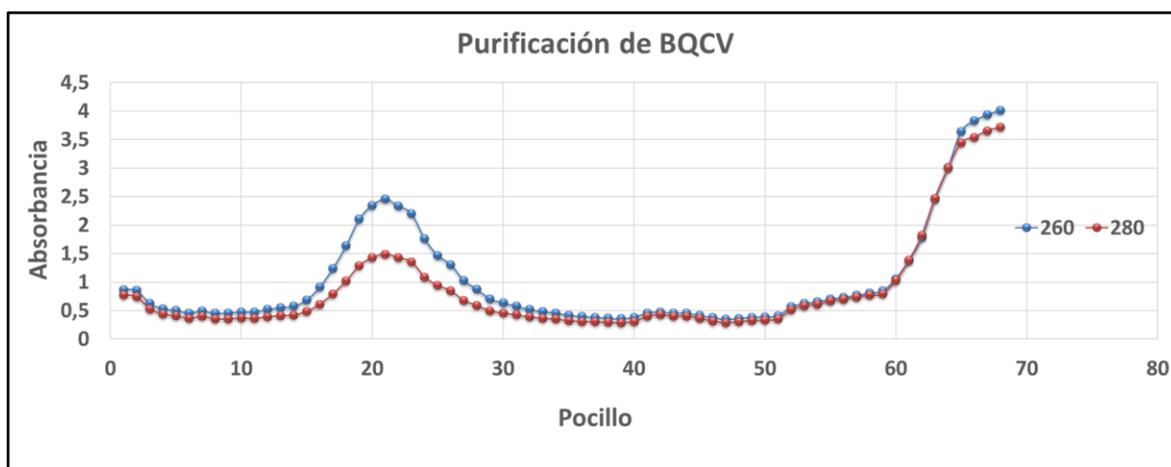


Figura 20: Purificación de BQCV por gradiente de densidad de sacarosa. El gráfico presenta las absorbancias del gradiente de sacarosa cosechado en fracciones consecutivas. En cada fracción se evaluaron las proteínas y los ácidos nucleicos a 280 y 260 nm, respectivamente.

Para la cuantificación de las cargas virales se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas de concentraciones conocidas de plásmido conteniendo el fragmento a amplificar, empleando 3 réplicas por dilución. Para BQCV, el  $R^2$  de la recta de

regresión fue de 0.996, la pendiente de -3.292 y la eficiencia de 101.3 % (figura 21). Por otro lado, para ABPV, el  $R^2$  de la recta de regresión fue de 0.969, la pendiente de -3.333 y la eficiencia de 99.536 %.

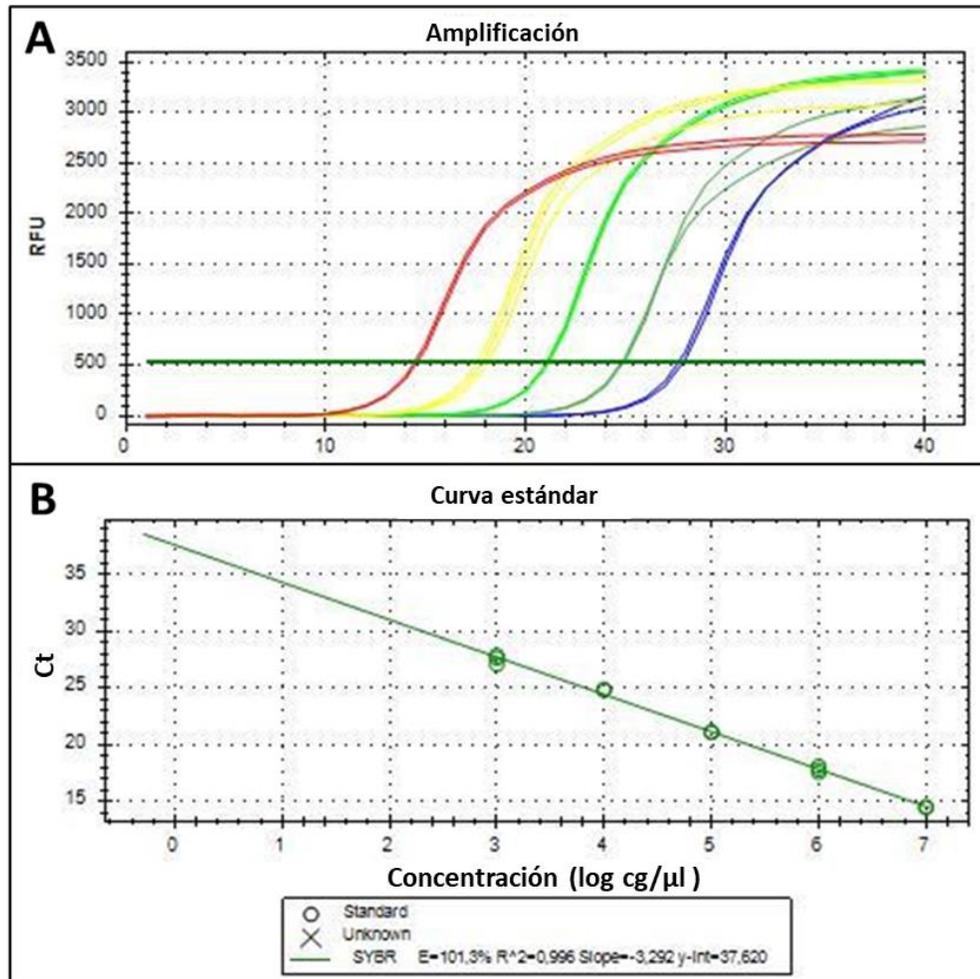


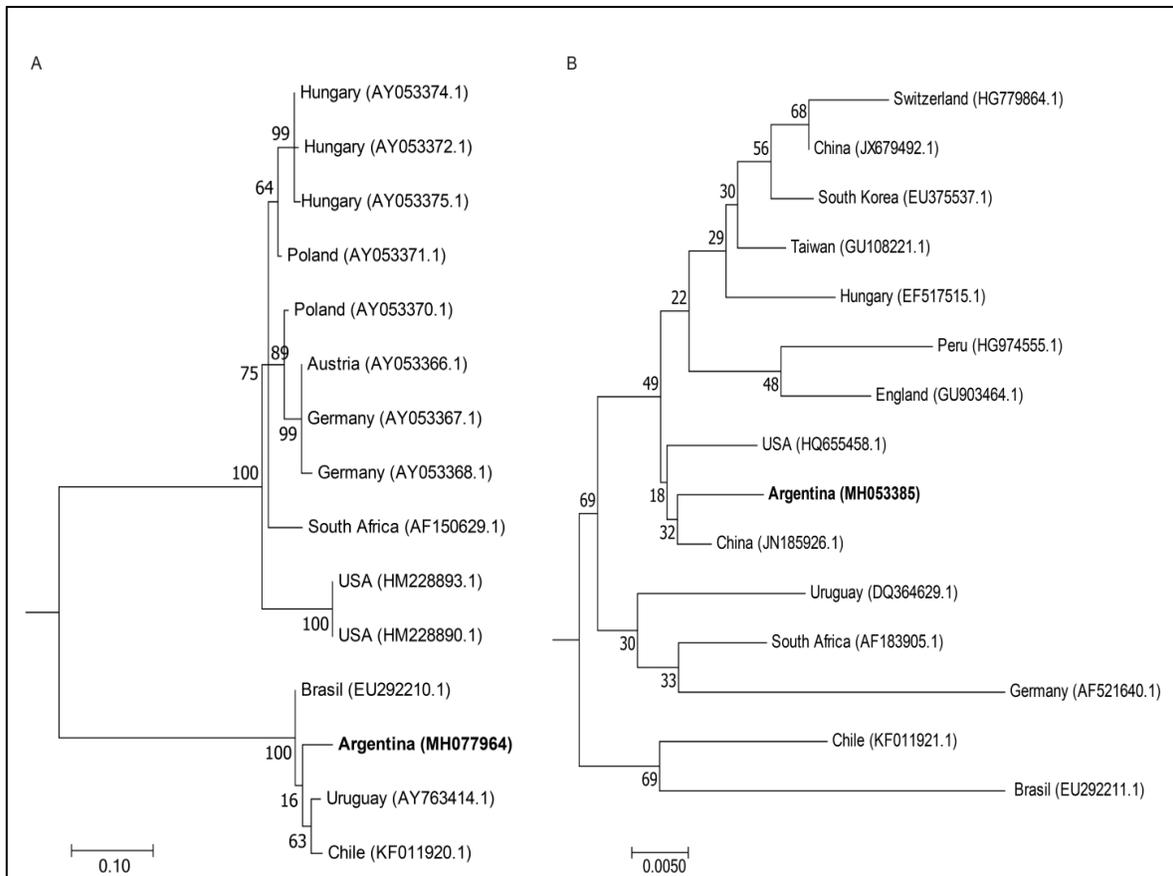
Figura 21: Cuantificación de la carga viral de BQCV por RT-qPCR. A: Gráfico de amplificación de unidades de fluorescencia relativa (RFU) en función de los ciclos de las 5 diluciones del plásmido. B: Gráfico de puntos de los ciclos umbrales (Ct) en función de las diluciones del plásmido (log cg/μl) y ajuste de la recta de regresión lineal.

### **2.3.5 Caracterización molecular**

Se seleccionaron, amplificaron y secuenciaron fragmentos genómicos de los virus ABPV y BQCV obtenidos a partir de pupas de reinas (con signos de infección viral: pupas oscurecidas y pared interna de la celda real oscura) tomadas en el establecimiento de Entre Ríos que presentaba pérdidas en la producción de reinas en noviembre del año 2015. Las secuencias de los fragmentos ABPV y BQCV que pertenecen a la región codificante de sus respectivas proteínas estructurales (VP), fueron subidas al Genbank, con los números de acceso MH077964 y MH053385 respectivamente.

### **2.3.6 Análisis filogenéticos**

Para evaluar la relación genética entre ABPV y BQCV detectados en la cabaña de Entre Ríos con cepas de diversos orígenes geográficos, se realizaron análisis filogenéticos del fragmento que codifica la proteína VP1 de ambos virus (figura 22). Los resultados mostraron que las secuencias de ABPV de Argentina, Brasil, Uruguay y Chile están estrechamente relacionadas en un grupo sudamericano que diverge de los grupos de Europa, Sudáfrica y EE. UU. La proximidad de secuencias ABPV sudamericanas sugiere un posible origen común (figura 22A). Curiosamente, el análisis de las secuencias BQCV no mostró agrupación geográfica. Se observó sin embargo, que la secuencia argentina se agrupaba más cerca de las secuencias de China y EE. UU. que de las sudamericanas (figura 22B).



*Figura 22: Análisis filogenéticos de los virus ABPV y BQCV. A. Árbol filogenético del fragmento del gen de 500 pb que codifica una proteína estructural de ABPV incluyendo aislamientos de otros países. B. Árbol filogenético del gen del fragmento de 700 pb que codifica una poliproteína de la cápside de BQCV incluyendo aislamientos de otros países. Los números de registro de GenBank se indican entre paréntesis delante del nombre del país de procedencia. Se muestran los valores de Bootstraps por encima de las ramas.*

## 2.4 DISCUSIÓN

Como se mencionó previamente, se ha descrito la presencia de diferentes virus en apiarios de producción de miel, pero poco se conoce sobre su circulación y el daño potencial que puede producir en las cabañas apícolas. En el año 2012, Gregorc y Bakonyi, hallaron un alto porcentaje de infección por ABPV en colmenares de cría de reinas en Eslovenia (Gregorc & Bakonyi, 2012). En este trabajo de Tesis, se detectaron porcentajes bajos de virus en abejas adultas: ABPV (7%), DWV (5%), BQCV (3%), SBV (0,2%); se encontró, además, confección entre ABPV-BQCV, DWV-BQCV y DWV-ABPV y no se evidenció la presencia de CBPV e IAPV. Además, en dos cabañas que mostraron un alto

porcentaje de mortalidad en pupas de reinas, presentando pérdidas en la producción de un 60% a un 100% de celdas reales y de signos de infecciones virales, se detectó ABPV en el 62,5% de las pupas de reinas y BQCV en el 25% en una cabaña proveniente de Entre Ríos; y BQCV en el 28,5% de las pupas de reinas y SBV en el 14,3% en una cabaña de Tucumán. Es de suma importancia conocer la presencia de virus en las diferentes etapas de la producción de material vivo, respecto a esto hay solo un trabajo, en el cual se estudió la presencia de ABPV, BQCV y DWV en abejas obreras y reinas durante el proceso de producción de reinas. Sus resultados indicaron que los tres virus de abejas melíferas estaban presentes de manera esporádica durante las etapas del proceso de cría de reinas (Žvokelj et al., 2020).

Por otra parte, en este trabajo de Tesis, también se realizó la detección de parásitos que afectan a las abejas. Respecto a *Varroa destructor*, se conoce que este ácaro, al alimentarse de la abeja o pupa, inyecta directamente una gran cantidad de partículas virales en el huésped (Di Prisco et al., 2011; Shen et al., 2005), seleccionando cepas de virus más virulentas y causando patologías virales, como inmunosupresión, pérdida de peso, disminución de la capacidad de vuelo y reducción vida media de las abejas adultas (Amiri et al., 2017; Nazzi et al., 2012). En las cabañas apícolas muestreadas, el ácaro se detectó en el 80,2% de las muestras analizadas, pero solo en una provincia el porcentaje de infestación fue superior al 3%, requiriendo tomar medidas para controlar la parasitosis y poder continuar con la producción de material vivo. Hay pocos trabajos que describen el impacto de este parásito sobre la producción de material vivo, en uno de ellos, criaron abejas reinas en cuatro islas hawaianas con y sin ácaros; posteriormente, recolectaron sus crías para determinar la frecuencia de apareamiento de reinas y el éxito de la inseminación. Finalmente, no encontraron diferencias significativas para el éxito de apareamiento entre las islas con y sin ácaros (Rusert et al., 2021).

Respecto a la presencia de *Nosema apis*, a principios de 1980, se demostró que las abejas infectadas con *N. apis* y BQCV vivían menos que las abejas infectadas sólo con *N. apis* (Bailey et al., 1983). Por esta razón se realizaron las detecciones de este parásito para evaluar cómo afecta a la producción de material vivo y que relaciones puede haber con los demás agentes. En este trabajo, se detectó en el 86,8% de las muestras analizadas, y

mostrando un recuento promedio de esporas mayor a 1 millón sólo en dos apiarios de las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires. En ambos se realizaron los tratamientos correspondientes para controlar estas infestaciones.

Por otro lado, en los análisis realizados para evaluar posibles relaciones entre los agentes (virus, varroa y nosema) y las variables meteorológicas, se encontró que la presencia de virus y de nosema tendían a incrementar con la humedad relativa, y no así con la temperatura máxima ni con la temperatura mínima. Respecto a la presencia de varroa, ésta no mostró relación alguna con las variables meteorológicas registradas. Además, se encontraron asociaciones entre la presencia de varroa y la de nosema.

Para caracterizar las secuencias de BQCV y ABPV de las cabañas que presentaban pérdidas en la producción, se secuenciaron y realizaron análisis filogenéticos con secuencias de otros países. Los mismos mostraron que las secuencias de ABPV de Argentina, Brasil, Uruguay y Chile están relacionadas en un grupo sudamericano que diverge de los grupos de Europa, Sudáfrica y EE. UU. Estudios previos demostraron que la diversidad genética ABPV respalda el concepto de segregación geográfica de las cepas de virus de las abejas (Bakonyi et al., 2002). La proximidad de secuencias ABPV sudamericanas sugiere un posible origen común. Por otro lado, el análisis de las secuencias de BQCV no mostró agrupación geográfica, pero se observó que la secuencia argentina se agrupa cerca de las secuencias de China y EE. UU. Esta misma situación, fue observada por Rodríguez en el 2014 con aislamientos de Chile; es decir, ABPV estaba relacionado con cepas sudamericanas, en cambio, BQCV lo estaba con cepas de Brasil, pero en ese estudio se analizó un gen no estructural (Rodríguez et al., 2014). La recombinación genética entre los genotipos o variantes de BQCV y el comercio apícola mundial, podría explicar la distancia genética de virus relacionados geográficamente (Tapaszti et al., 2009; Tsevegmid et al., 2016).

## **2.5 CONCLUSIÓN**

En este capítulo se describe el primer relevamiento de virus de abejas en cabañas apícolas de la Argentina, dónde se determinó mediante técnicas moleculares la presencia viral; los virus fueron detectados en porcentajes bajos en abejas adultas, pero en porcentajes

muy altos en pupas de reinas de cabañas con pérdidas en la producción de material vivo; debido a esto se ha asesorado a los productores para que implementen mayores medidas de desinfección durante el proceso de producción de reinas, logrando restablecer la producción durante esa temporada. Es relevante realizar detecciones de virus que pueden afectar la producción de reinas, dado que las cabañas apícolas abastecen de material vivo (paquetes de abejas, celdas reales, reinas y reinas fecundadas) a los demás apiarios (tanto los de producción de miel como los que realizan servicio de polinización) siendo las cabañas el primer eslabón de una gran cadena de comercialización. Además, el proceso de producción de reinas, implica una manipulación específica que puede beneficiar la circulación de ciertos virus.

Por otro lado, también se secuenciaron fragmentos genómicos de los virus ABPV y BQCV de muestras tomadas en las cabañas apícolas, con pérdidas en la producción de reinas, y se realizaron análisis filogenéticos con secuencias de otros países, donde se observó que las secuencias de ABPV de Argentina, Brasil, Uruguay y Chile están relacionadas en un grupo sudamericano que diverge de los grupos de Europa, Sudáfrica y EE. UU. Respecto al análisis de las secuencias de BQCV, no mostró agrupación geográfica, pero se observó que la secuencia argentina se agrupa cerca de las secuencias de China y EE. UU.

### CAPITULO 3



## **DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL PARA ABPV Y BQCV MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE ARN INTERFERENTE**

### **3.1 INTRODUCCIÓN**

#### **Control de virus mediante el uso de ARN interferente**

Como se mencionó en la introducción general de este trabajo, el silenciamiento génico, mediado por ARNi, es uno de los mecanismos de defensa más importante que poseen las abejas contra los patógenos. Teniendo conocimiento de esta vía inmunitaria, varios autores han realizado experimentos de silenciamiento génico mediados por ARNdc para controlar las infecciones producidas por diferentes virus. Maori y colaboradores en el año 2009 lograron reducir en gran medida la mortalidad de abejas provocada por IAPV (Maori, et al., 2009). Por otro lado, en el año 2012, Desai y colaboradores lograron reducir la infección producida por DWV en larvas de primer estadio y en abejas adultas mediante la administración oral de una construcción de ARN de doble cadena, específico de DWV (figura 23) (Desai et al., 2012). Además, en un estudio controlado llevado a cabo en condiciones de campo y a gran escala se realizó la aplicación de ARNdc específico contra el virus IAPV, ese trabajo incluyó un total de 160 colmenas de abejas melíferas en dos climas, estaciones y ubicaciones geográficas diferentes (Florida y Pensilvania). La administración oral de ARNi demostró ser un tratamiento efectivo para proteger a la población de los efectos causados por la infección viral y mejorar la salud general de las abejas (Hunter et al., 2010). Estos antecedentes evidencian la factibilidad de utilizar metodologías de control de patógenos virales de abejas mediante el uso de estrategias basadas en ARNi. Además, el sistema inmune de la abeja utiliza el silenciamiento génico de manera natural para controlar las infecciones virales, y se ha utilizado esta metodología con éxito para controlar las infecciones producidas por IAPV (Hunter et al., 2010), por CSBV (Liu et al., 2010) y por DWV (Desai et al., 2012).

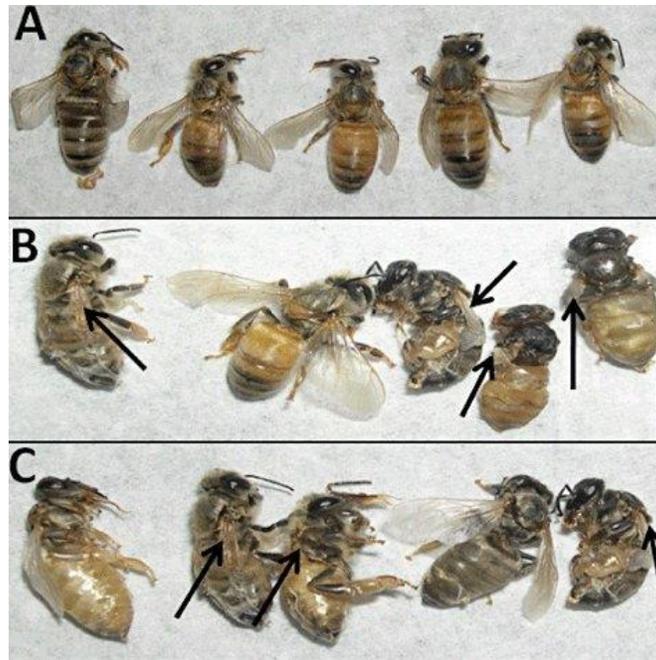


Figura 23: Efecto en abejas adultas cuyas larvas fueron administradas con los diferentes tratamientos. (A) Larvas alimentadas con DWV+ARNdc: sin signos de deformidad de las alas en abejas adultas. (B) Larvas alimentadas con ARNdcGFP+ARNdc+DWV: alas deformadas, abdomen hinchado en abejas adultas. (C) Larvas alimentadas sólo con DWV: deformidad de alas en abejas adultas (Desai et al., 2012)

En este capítulo se describe la producción de ARNdc correspondiente a fragmentos de genes de ABPV y BQCV a fin de ser utilizados como blanco de silenciamiento y lograr el desarrollo de una estrategia de control para ambos virus mediante la administración de ARN interferente. Además, se describe el efecto de la administración oral de ARNdc específico de ABPV y BQCV en abejas adultas *A. mellifera* infectadas artificialmente con los respectivos virus.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Producción de ARNdc *in vivo*

#### 3.2.1.1 Clonado de fragmentos génicos de ABPV y BQCV en vectores de síntesis de ARNdc

Cada uno de los fragmentos génicos fue amplificado por PCR y clonados inicialmente en un vector de clonado. Los cebadores utilizados se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 3: Secuencias de los cebadores y tamaño de los fragmentos amplificados para cada uno de los virus.

virus	gen blanco	cebadores	secuencia de los cebadores (5' a 3')	tamaño del amplificado
ABPV	VP1	ABPV-F	TCTGATGATGCTGAAGAGAGAAA	500 pb
		ABPV-R	AATCATCATTGCCGGCTCTA	
	Replicasa	ABPVreF	CTCAAGTTATACGTAAAATAGCTGGAATT	646 pb
		ABPVreR	AACCAACCTTGCTTCCCTTTA	
BQCV	VP1	BQCV-F	TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC	700 pb
		BQCV-R	GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	
	Helicasa	BQCVHeF	AGAACAAGAGTTCTGGGACGG	310 pb
		BQCVHeR	ACCACTTTCAGAAGGAGCCC	

Las amplificaciones se realizaron empleando como templado, ARN viral de muestras positivas por RT-PCR en tiempo real para los virus de ABPV y BQCV, provenientes de la cabaña apícola de la provincia de Entre Ríos. La transcripción inversa se realizó con 200U de MMLV-RT (Promega), 0,1 µg/µl de hexámeros, 125 µM dNTPs, 5 µl ARN, buffer provisto por el fabricante del kit de MMLV-RT y agua ultrapura (libre de ADNAsas y ARNAsas) hasta un volumen final de 25 µl.; se incubó la reacción a 42°C durante 1 hora, seguida de 10 minutos a 95°C. La PCR se efectuó empleando 2,5U de la enzima GoTaq (Promega), 125 µM de dNTPs, 0,3 µM de cada cebador, 5 µl de ADNc y agua ultrapura (libre de ADNAsas y ARNAsas) hasta un volumen final de 25 µl. El perfil térmico utilizado para cada amplificación se detalla en el apéndice (cuadros 1 al 4).

Los amplificados obtenidos se clonaron en el vector pGEM T-easy (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se verificó su identidad por secuenciación. Los fragmentos fueron luego subclonados individualmente en el vector pL4440, empleando metodologías clásicas de clonado (Sambrook et al., 1989). Para ello, el fragmento de interés se escindió del vector pGEM T-easy por digestión con la enzima de restricción EcoRI. El producto de la digestión se purificó de gel de agarosa utilizando el kit *EasyPure*® Quick Gel Extraction (Transgene) y de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La

concentración del fragmento purificado se cuantificó por espectrofotometría empleando el equipo Nanodrop2000 (Thermofisher).

El vector pL4440, obtenido de Addgene Co. (Cambridge, USA), posee un sitio de clonado flanqueado en ambos extremos por un promotor T7 inducible que genera la síntesis de una cadena de ARN sentido y antisentido. Los plásmidos pL4440 con los fragmentos de interés fueron utilizados de forma individual para transformar, mediante electroporación, bacterias DH5a electrocompetentes. Al día siguiente se observaron colonias blancas y azules, se seleccionaron las colonias blancas y se realizó una estría por cada colonia blanca seleccionada en una nueva placa de cultivo LB (figura 24). El chequeo de los clones positivos se realizó mediante *colony*-PCR, con el uso de cebadores específicos de cada fragmento y el cebador T7 *promoter*. Cada colonia positiva se amplificó mediante cultivos líquidos de LB y ampicilina y las bacterias en crecimiento exponencial fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en 70% glicerol. El gen IAP (inhibidor de apoptosis) de *Varroa destructor*, clonado en el vector pL4440, se utilizó como control de ARNdc no específico en los ensayos, disponible en nuestro grupo de trabajo.

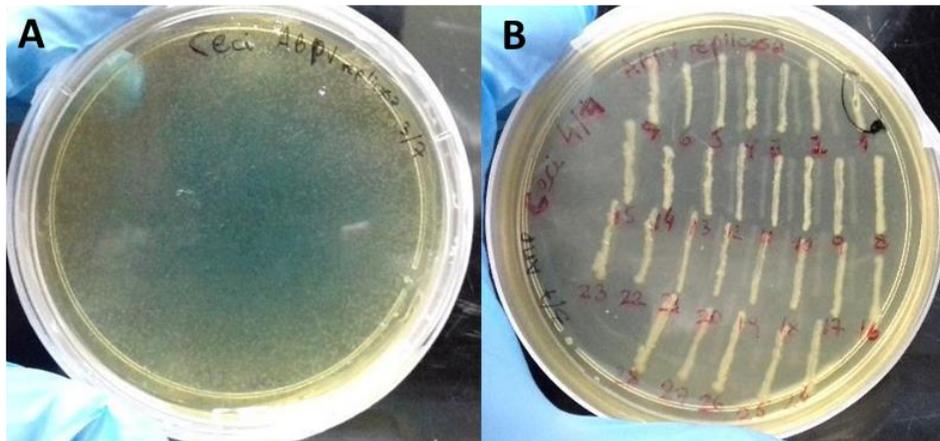


Figura 24: Transformación de bacterias DH5a con las construcciones en pGEM -Teasy. A: Placa de cultivo en la que se observan colonias blancas y azules debido a la transformación de bacterias electrocompetentes. B: Selección y estriado de colonias blancas para chequear clones positivos

### **3.2.1.2 Transformación de Bacterias HT115 y síntesis de ARN doble cadena (ARNdc) específico.**

Cada uno de los plásmidos pL4440 con el fragmento de interés obtenido fue introducido por transformación química en las bacterias *E. coli* HT115, obtenidas del Caenorhabditis Genetics Center (CGC, Universidad de Minnesota USA). Las condiciones de transformación y síntesis de ARNdc fueron provistas por el CCG. Luego de la transformación química, las bacterias fueron plaqueadas en LB con los antibióticos ampicilina (amp) y tetraciclina (tetr). La búsqueda de colonias positivas se realizó mediante *colony*-PCR con cebadores específicos de los fragmentos clonados y con el primer T7 *promoter*. Los clones que resultaron positivos fueron guardados en stock de glicerol al 70% a -80°C.

Para la síntesis de ARNdc se evaluaron 3 clones, debido a que según recomendación del proveedor de bacterias y por resultados obtenidos por nuestro grupo, no todos los clones positivos logran niveles óptimos de síntesis de ARNdc. Cada clon positivo fue cultivado en LB (amp/tetr) e inducido con Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) según las recomendaciones adjuntas con las bacterias por su proveedor.

El ARNdc, de los cultivos positivos, se extrajo mediante el uso del Kit comercial High Pure Viral RNA, Roche (según las recomendaciones del fabricante) y se analizó en gel de agarosa al 1%. Como control positivo de síntesis de ARNdc se utilizaron bacterias HT115 transformadas con plásmido pL4440-IAP y como control negativo de síntesis de ARNdc se utilizaron bacterias HT115 transformadas con plásmido pL4440 sin inserto. Ambas bacterias controles, fueron crecidas, inducidas y procesadas bajo las mismas condiciones que los clones con genes de interés. El ARNdc se cuantificó por espectrofotometría empleando el equipo Nanodrop2000 (Thermofisher).

### **3.2.2 Producción de ARNdc *in vitro***

La producción *in vitro* se realizó mediante el uso del Kit comercial MEGAscript™ RNAi Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. Como ADN molde se utilizaron las cuatro construcciones previamente obtenidas de los plásmidos pL4440 que contienen los genes blancos de silenciamiento. Luego, se analizaron los productos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se cuantificaron por espectrofotometría

empleando el equipo Nanodrop2000 (Thermofisher). A los controles previamente descritos, se sumó un control positivo de síntesis de ARNdc provisto por el fabricante del Kit comercial.

### 3.2.3 Ensayo de estabilidad del ARNdc producido

Se realizó un ensayo de estabilidad de los ARNdc producidos *in vitro* en diferentes condiciones: diluido en agua a 4°C, diluido en agua a 32°C y diluido en alimento para abejas a 32°C, durante 19 días. Para ello se colocó 1µg de ARNdc en 39 tubos (1µg/tubo), 13 para cada condición: diluidos en agua, se los llevó a 4 °C, diluidos en agua y se los llevó a una estufa a 32°C, diluidos en sacarosa y se los llevó a una estufa a 32°C. Luego se los retiró a los días pautados (cuadro 4) y se los congeló a -80°C hasta la finalización del ensayo. Luego se observaron los productos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Cuadro 4: Descripción de las condiciones y días del ensayo de estabilidad de ARNdc.

Días	4°C (en agua)	32°C (en agua)	32°C (en sacarosa)
1	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
2	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
3	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
4	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
5	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
6	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
7	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
8	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
9	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
10	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
11	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
18	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc
19	1ug ARNdc	1ug ARNdc	1ug ARNdc

### 3.2.4 Insectos

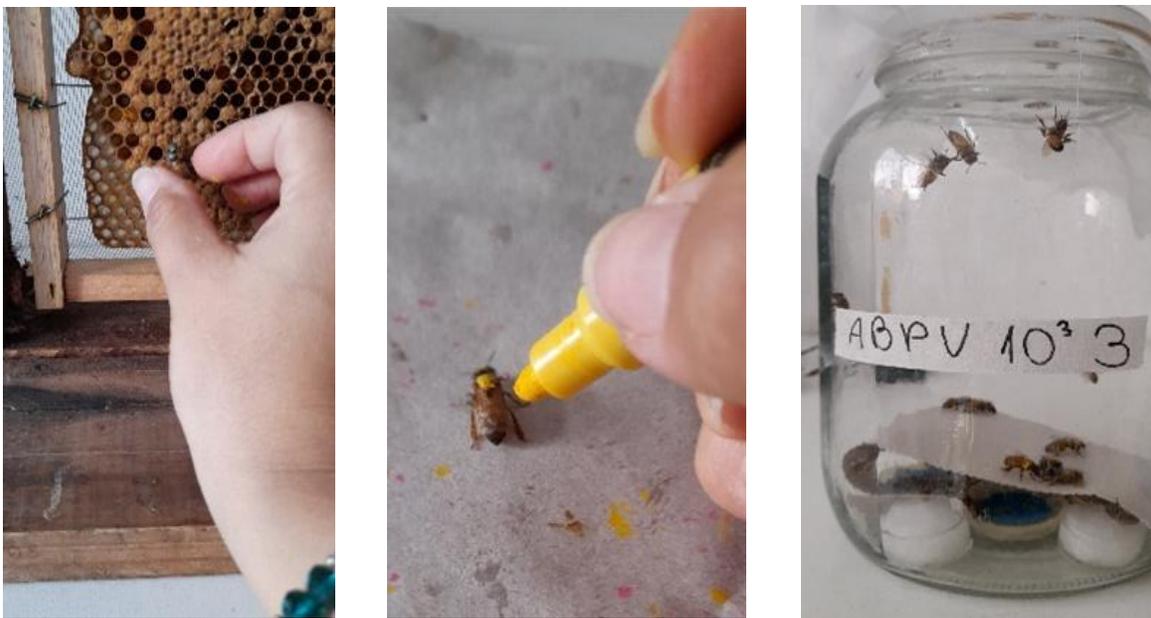
Las abejas utilizadas en los bioensayos provinieron de colmenas mantenidas en el campo experimental del Instituto de Genética del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, INTA. Los bioensayos se llevaron a cabo gracias a la colaboración de la Dra.

Alejandra Scannapieco y a la Lic. Romina Russo. Las colmenas fueron analizadas para detectar presencia viral de DWV, SBV, ABPV, CBPV, IAPV y BQCV, empleando la metodología descrita previamente. Se tomaron dos cuadros de crías operculadas de una colmena y se los colocó en una colmena de observación, la cual fue llevada a una cámara de cría con temperatura de 32°C y 60 % de humedad, durante 1 o 2 días para que nazcan las abejas nodrizas, las cargas virales para los virus de estudio de las colonias utilizadas se incorporaron al análisis estadístico como cargas virales basales (Dalmon et al., 2019).

### **3.2.5 Experimento de infección**

Se estableció la cantidad óptima de virus a utilizar en los ensayos de silenciamiento mediante dos experimentos de medidas repetidas (uno para cada virus de abeja) en abejas adultas. Cada experimento se diseñó con tres tratamientos (cuadros 5 y 6), 3 repeticiones de cada tratamiento y 50 abejas por repetición (30 abejas para registrar la supervivencia pintadas de color amarillo y 20 abejas para cuantificar las cargas virales pintadas de color rojo) (figura 25). Los stocks virales utilizados fueron previamente cuantificados por RT-qPCR.

Los 50 individuos fueron colocados en un frasco de vidrio cerrado con ventilación y mantenidos en estufas de cría a 32°C con 60% de humedad. El día 1 se suministró por vía oral 1 ml de alimento conteniendo 1 ml de ABPV con  $10^3$  cg/ $\mu$ l al tratamiento B; y 1 ml de ABPV con  $10^4$  cg/ $\mu$ l al tratamiento C. Respecto al tratamiento A se le administró alimento solo. Se retiraron 3 abejas de color rojo por grupo a los días 0, 2, 4, 6 y 8, para cuantificar cargas virales (figura 26). De igual manera se realizó el experimento de BQCV. Además, se alimentó a las abejas con miel y agua cada 24 hs. Ambos bioensayos fueron revisados diariamente durante 8 días, registrando la cantidad de abejas vivas cada 24 hs. Al octavo día, los individuos fueron congelados a -80°C.



*Figura 25: Procedimiento de colección y pintado de abejas para colocarlas en los frascos y asignarles un tratamiento.*

*Cuadro 5: Descripción de los tratamientos realizados por grupo para el ensayo de infección de ABPV.*

Grupos	Tratamiento	Descripción
1-2-3	A	Control
4-5-6	B	Virus ABPV $10^3$
7-8-9	C	Virus ABPV $10^4$

Cuadro 6: Descripción de los tratamientos realizados por grupo para el ensayo de infección de BQCV.

Grupos	Tratamiento	Descripción
1-2-3	A	Control
4-5-6	B	Virus BQCV $10^4$
7-8-9	C	Virus BQCV $10^5$

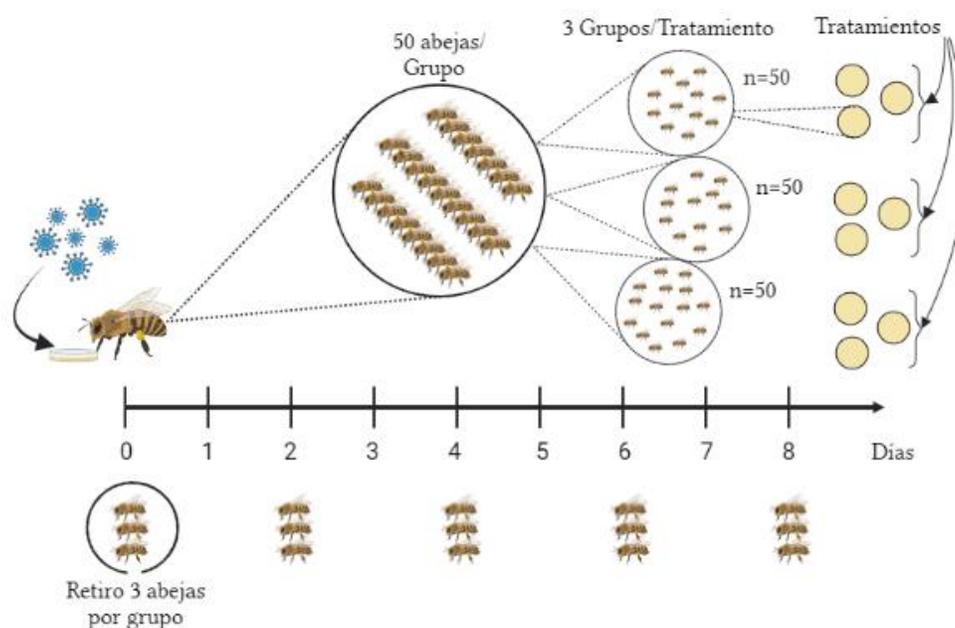


Figura 26: Esquema de infección viral. Figura realizada con Biorender.com

### 3.2.5.1 Procesamiento de las muestras y extracción del ARN viral

Las abejas colectadas de cada grupo de los tiempos inicial, días 2, 4, 6 y 8, se maceraron con pisón para microtubo, resuspendiendo el macerado en 500  $\mu$ l de buffer fosfato pH 7 (PBS) por abeja. Se clarificó a 3645 x g durante 45 minutos y se colectó el sobrenadante. La extracción del ARN se realizó mediante el kit comercial TIANamp Virus RNA Tiangen® según recomendaciones del fabricante. El ARN obtenido fue resuspendido en 60  $\mu$ l de agua libre de ADNasas y ARNasas, y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en las detecciones y cuantificación.

### 3.2.5.2 Detección y cuantificación de cargas virales

La presencia y cuantificación de los virus ABPV y BQCV se realizó mediante la técnica de RT-qPCR utilizando la metodología, cebadores y controles descritos en el punto 2.2.6. Las cargas virales de las muestras positivas se calcularon utilizando las curvas estándar elaboradas con las 5 diluciones de plásmidos recombinantes empleados en cada reacción. Se consideraron aceptables aquellos ensayos que arrojaron valores entre 90-110% para la eficiencia de la reacción (Bustin et al., 2009). Se seleccionó la dosis viral que generó claras diferencias entre los grupos infectados y no infectados.

### 3.2.6 Bioensayos de silenciamiento viral

Se realizaron 2 experimentos de medidas repetidas, uno para cada virus, en los que se designaron 5 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento, obteniendo un total de 20 unidades experimentales de 50 abejas c/u, de las cuales 30 abejas fueron pintadas de color amarillo para registrar la supervivencia y 20 abejas fueron pintadas de color rojo para cuantificar las cargas virales. Los tratamientos se describen en los cuadros 7 y 8.

*Cuadro 7: Descripción de los tratamientos y grupos de abejas utilizados para el ensayo de silenciamiento de ABPV*

Grupos (n=50 c/u)	Tratamiento	Descripción
1-2-3-4	A	Control
5-6-7-8	B	ABPV 10 <sup>4</sup> + ARNdc
9-10-11-12	C	ABPV 10 <sup>4</sup>
13-14-15-16	D	ARNdc solo
17-18-19-20	E	ABPV 10 <sup>4</sup> + ARNdc no específico

*Cuadro 8: Descripción de los tratamientos y grupos de abejas utilizados para el ensayo de silenciamiento de BQCV*

Grupos (n=50 c/u)	Tratamiento	Descripción
1-2-3-4	A	Control
5-6-7-8	B	BQCV $10^7$ + ARNdc
9-10-11-12	C	BQCV $10^7$
13-14-15-16	D	ARNdc solo
17-18-19-20	E	BQCV $10^7$ + ARNdc no específico

Las 50 abejas fueron colocadas en cada frasco de vidrio con ventilación (grupo), luego se le asignó a cada frasco un tratamiento al azar con sus respectivas repeticiones (4 por tratamiento) y fueron mantenidos en estufas de cría a 32°C con 60% de humedad (figura 27). Al día 0, a los tratamientos B y D se les suministró un recipiente con 1 ml de miel conteniendo ARNdc (un microgramo/abeja); al tratamiento A, solo alimento. Al tercer día se incorporó en el alimento, 1 ml de la dilución (en agua) de los virus mencionados en las tablas 4 y 5 a los tratamientos B, C y E.

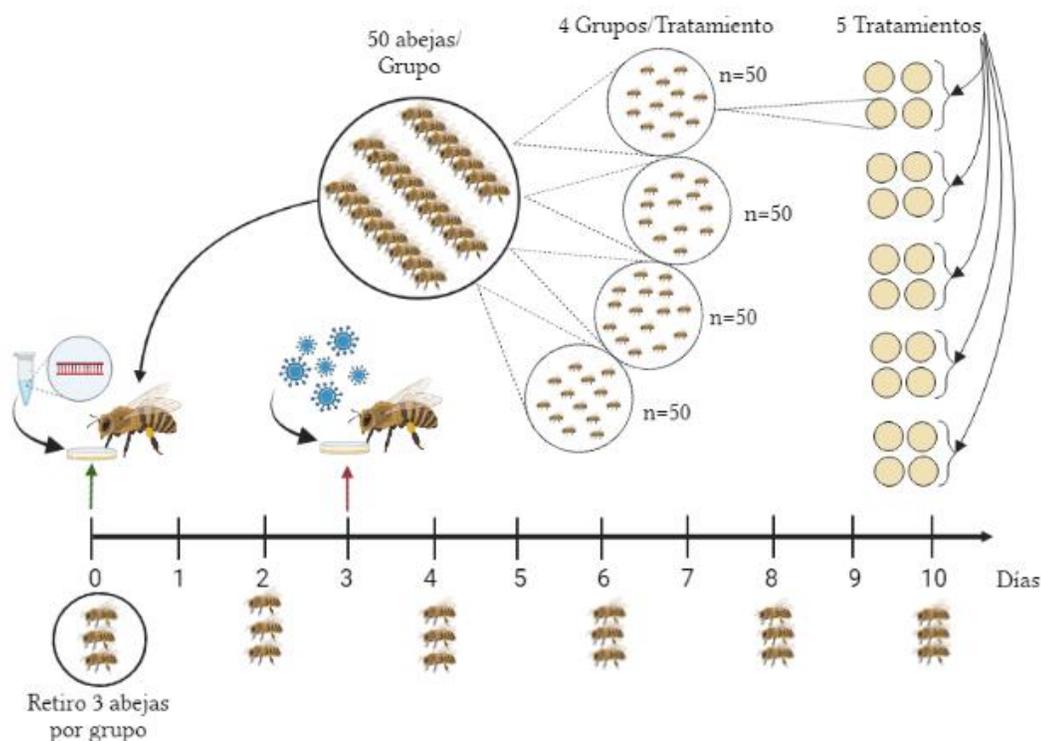


Figura 27: Esquema de silenciamiento viral. Figura realizada con Biorender.com

Se retiraron 3 abejas pintadas de color rojo por grupo a los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10, para cuantificar cargas virales. Además, se las alimentó con miel y agua cada 24 hs. Ambos bioensayos fueron revisados durante 10 días, registrando la cantidad de abejas vivas cada 24 hs. Al décimo día, los individuos fueron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El procesamiento de las muestras y extracción del ARN viral, se realizó como se detalla en el punto 3.2.5.1. Luego, la detección y cuantificación de cargas virales se realizó como se detalla en el punto 2.2.6.

### 3.2.7 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis exploratorio de los datos provenientes de ambos experimentos de silenciamiento, tanto para ABPV como para BQCV, calculando las medidas resumen (medias, desvíos estándar y varianzas) para cada tiempo en los diferentes tratamientos, y gráficos de puntos de las concentraciones medias de virus (log. copias génicas/ $\mu\text{l}$ ) y de

supervivencia (número de abejas vivas) en los diferentes tiempos para cada uno de los tratamientos.

Respecto a los datos obtenidos de las cargas virales, se analizaron mediante un Modelo Lineal General. Dado que la potencial distribución de probabilidad de la variable respuesta (concentración de virus en copias génicas/ $\mu$ l) es Normal, se realizó la transformación logarítmica en base 10. La variable respuesta fue el logaritmo de la concentración de virus y las variables explicativas fueron el tiempo y los tratamientos. Además, se realizó la prueba de Shapiro Wilks para evaluar el supuesto de Normalidad, arrojando esta un valor p de 0,1705 para ABPV, y un p valor de 0,1203 para BQCV, cumpliendo así con el mismo. Dado que no hay independencia entre las detecciones de virus tomadas de los grupos de abejas en los diferentes tiempos (se midieron los mismos grupos en 6 tiempos), se agregó una estructura de correlación (matriz de simetría compuesta) entre las observaciones de la variable grupo. Sumado a esto y dado que no había homogeneidad de varianzas entre los tratamientos, se modeló la estructura de varianzas, incorporando al modelo la función de Identidad (varIdent).

Por otro lado, los datos obtenidos de supervivencia (número de abejas vivas) se analizaron mediante un Modelo Lineal Generalizado para evaluar diferencias entre los tratamientos, donde la variable respuesta fue el número de abejas vivas y las variables explicativas fueron el tiempo y los tratamientos.

Por otra parte, y para evaluar si había diferencias significativas entre los tratamientos en cada día, se realizaron contrastes ortogonales. Todos los análisis se llevaron a cabo con el Software Infostat (Di Rienzo et al., 2020).

### **3.3 RESULTADOS**

Se evaluaron dos metodologías para la producción de ARNdc, *in vivo* mediante la inducción de bacterias HT115 y posterior purificación del ARNdc, e *in vitro* mediante el uso de un kit comercial para luego elegir la metodología más adecuada y desarrollar la cantidad de ARNdc necesaria que se utilizará en los experimentos de silenciamiento génico.

### 3.3.1 Metodología I: Producción de ARNdc *in vivo*

#### 3.3.1.2 Clonado de fragmentos génicos de ABPV y BQCV en vectores de síntesis de ARNdc

Se generó ARNdc *in vivo*, de fragmentos correspondientes a los genes VP1 (previamente desarrollado en el laboratorio, por el Ing. Agr. Pablo Nakaya) y Replicasa de ABPV y VP1 y Helicasa de BQCV. Se eligió un gen estructural y un gen no estructural de cada virus, a fin de ser utilizados como blanco de silenciamiento. Para llevar a cabo este proceso, se amplificaron mediante PCR los fragmentos correspondientes a la replicasa de 646pb de ABPV; y los fragmentos de la VP1 de 700pb y helicasa de 310pb de BQCV (figura 28). Cada fragmento fue luego subclonado individualmente en el vector pL4440 (figura 29).

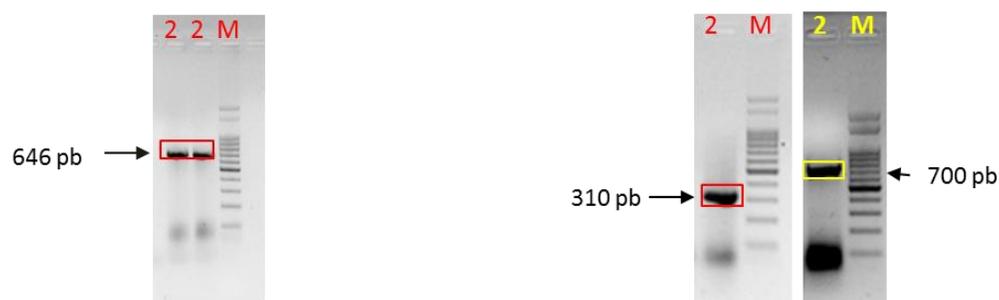


Figura 28: Obtención de los fragmentos de los genes blanco de silenciamiento de cada virus. Los amplificadores obtenidos por RT-PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

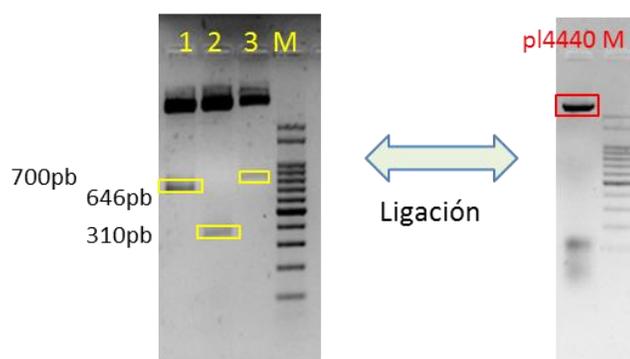
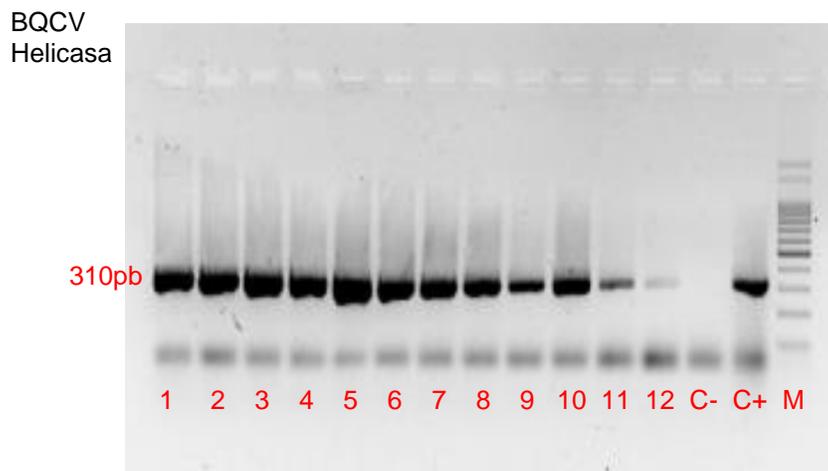


Figura 29: Subclonado de los fragmentos de los genes blanco de silenciamiento de cada virus. El gel de la izquierda muestra cada uno de los fragmentos y el de la derecha el plásmido linealizado. M: marcador de peso molecular; 1: fragmento de 646pb correspondiente al gen de Replicasa de ABPV; 2: fragmento de 310 pb correspondiente al gen helicasa de BQCV; 3: fragmento de 700 pb correspondiente al gen VP1 de BQCV; pL4440: plásmido linealizado para el subclonado.

Los productos de ligación de los plásmidos pL4440 con los fragmentos de cada uno de los genes, fueron utilizados de forma individual para transformar, mediante electroporación, bacterias DH5a electrocompetentes.

Posteriormente, se realizó el chequeo de los clones positivos mediante *colony-PCR*, con el uso de cebadores específicos de cada fragmento y el cebador T7 *promoter*. En la figura 30 se observan 12/12 clones que contienen, en este caso, el plásmido pL4440 con el inserto correspondiente al fragmento de 310 pb del gen de la Helicasa de BQCV.



*Figura 30: Selección de clones positivos para el gen de la Helicasa de BQCV. Las amplificaciones por colony-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa observando una banda de 310 bp en las colonias que poseen el plásmido con el inserto correspondiente a la helicasa de BQCV. 1-12: clones evaluados; C-: control negativo; C+: control positivo; M: marcador de peso molecular de 100pb.*

Por otra parte, en la figura 31 se observan 6/7 clones que contienen el plásmido pL4440 con el inserto correspondiente al fragmento de 646 pb del gen de la Replicasa de ABPV y 3/5 clones que contienen, el plásmido pL4440 con el inserto correspondiente al fragmento de 700 pb del gen de la VP1 de BQCV.

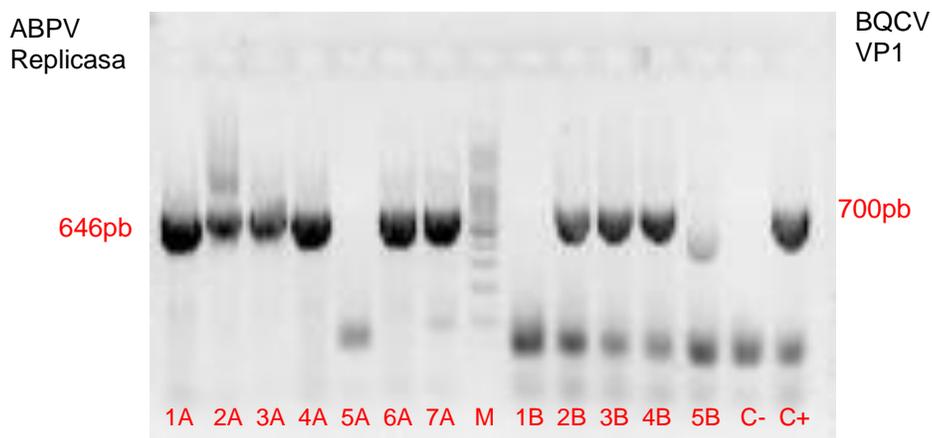


Figura 31: Selección de clones positivos para los genes de la replicasa de ABPV y la VP1 de BQCV. Las amplificaciones por colony-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa observando una banda de 646 bp en las colonias que poseen el plásmido con el inserto correspondiente a la replicasa de ABPV y una banda de 700 bp en las que contienen el plásmido con el inserto de la VP1 de BQCV. 1-12: clones evaluados; C-: control negativo; C+: control positivo; M: marcador de peso molecular de 100pb.

Cada clon positivo fue cultivado en LB (amp/Tetr) e inducido con IPTG. Los ARNdc se observaron mediante electroforesis en gels de agarosa, y la concentración de los mismos se cuantificó por espectrofotometría empleando el equipo Nanodrop2000 (Thermofisher).

### 3.3.2 Metodología II: Producción de ARNdc *in vitro*

La producción *in vitro* se realizó mediante el uso del Kit comercial MEGAscript™ RNAi siguiendo las instrucciones del fabricante. Como ADN molde se utilizaron las cuatro construcciones previamente obtenidas de los plásmidos p14440 que contienen los genes blancos de silenciamiento. Los ARNdc obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gels de agarosa (figura 32) y se cuantificaron mediante espectrofotometría empleando el equipo Nanodrop2000 (Thermofisher).

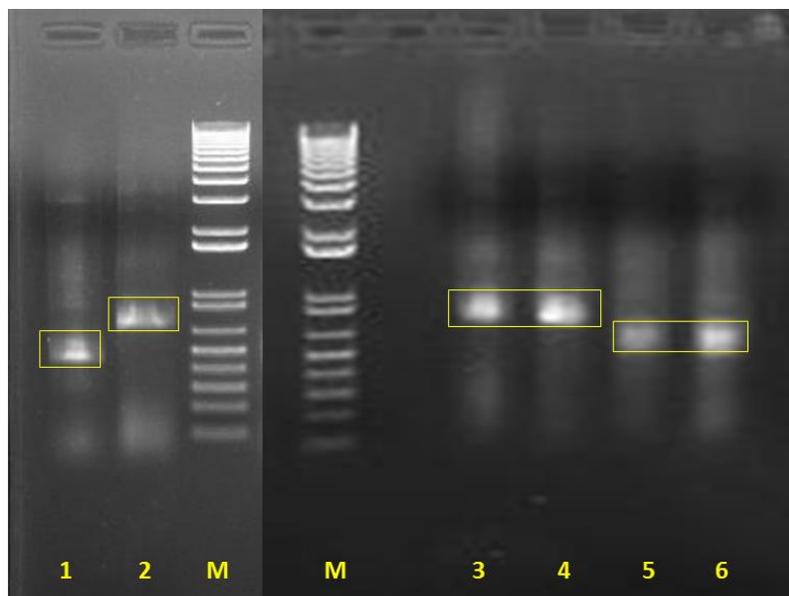


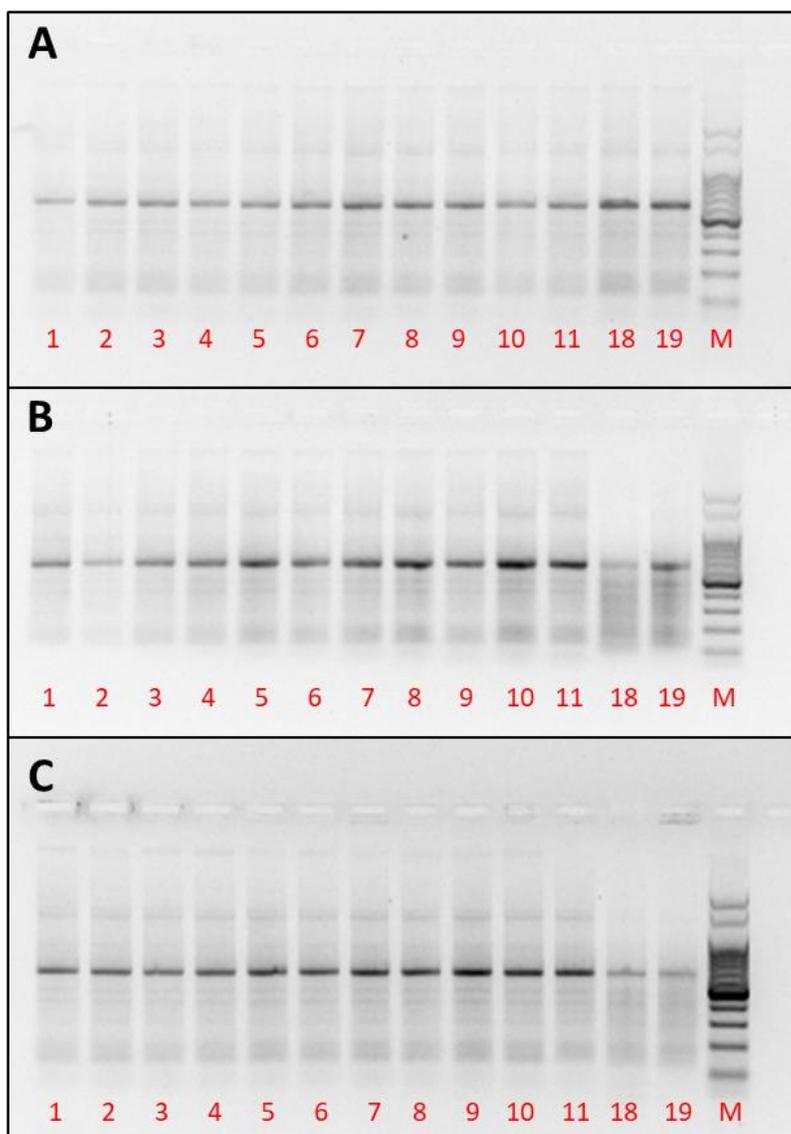
Figura 32: Producción de ARNdc *in vitro*. Los ARNdc generados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. 1: ARNdc del gen Helicasa de BQCV; 2: ARNdc del gen Replicasa de ABPV; 3 y 4: ARNdc del gen VP1 de BQCV; 5 y 6: ARNdc del gen VP1 de ABPV. M: marcador molecular de 1Kb marca Invitrogen.

Ambas metodologías de producción de ARNdc presentan ventajas y desventajas, como, por ejemplo, la producción *in vivo* es mucho menos costosa, pero es más difícil obtener un producto puro sin restos de otros contaminantes, además conlleva mucho más tiempo. En cambio, la producción *in vitro* se realiza en menos tiempo y se obtiene un producto más puro y en mayor cantidad, pero es muy costosa. Se decidió utilizar el ARNdc producido *in vitro*, ya que se priorizó la pureza y el tiempo requerido, a fin de poder comenzar con los bioensayos antes de que comenzara la invernada.

### 3.3.3 Estabilidad del ARNdc

Con el fin de determinar la estabilidad del ARNdc sintetizado *in vitro* ante condiciones de almacenamiento a diferentes temperaturas y tiempos, se realizó un ensayo manteniendo el ARNdc durante 19 días en tres condiciones diferentes: diluido en agua a 4 °C, diluido en agua a 32 °C y diluido en sacarosa a 32°C. Se puede observar en la figura 31 que los ARNdc diluidos en agua a 4°C no se degradaron con el transcurso de los días.

Respecto a los diluidos en agua y en sacarosa a 32°C, solo en los días 18 y 19 se observaron bandas más tenues (figura 33).



*Figura 33: Evaluación de la estabilidad del ARNdc. El ARNdc sometido a cada condición fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa. A: agua a 4°C; B: agua a 32°C; C: sacarosa a 32°C. 1 al 19: días de conservación. M: marcador de peso molecular.*

### 3.3.4 Experimentos de infección viral

Con el objetivo de definir una dosis de virus a utilizar en los experimentos de silenciamiento, se evaluaron inicialmente dos concentraciones virales en ensayos de infección (figura 34), evaluando la replicación viral (mediante el incremento en las cargas virales) y la supervivencia.

Luego, se evaluó el efecto de la administración oral de ARNdc específico de ABPV y BQCV producido *in vitro* sobre abejas adultas infectadas artificialmente con los respectivos virus.

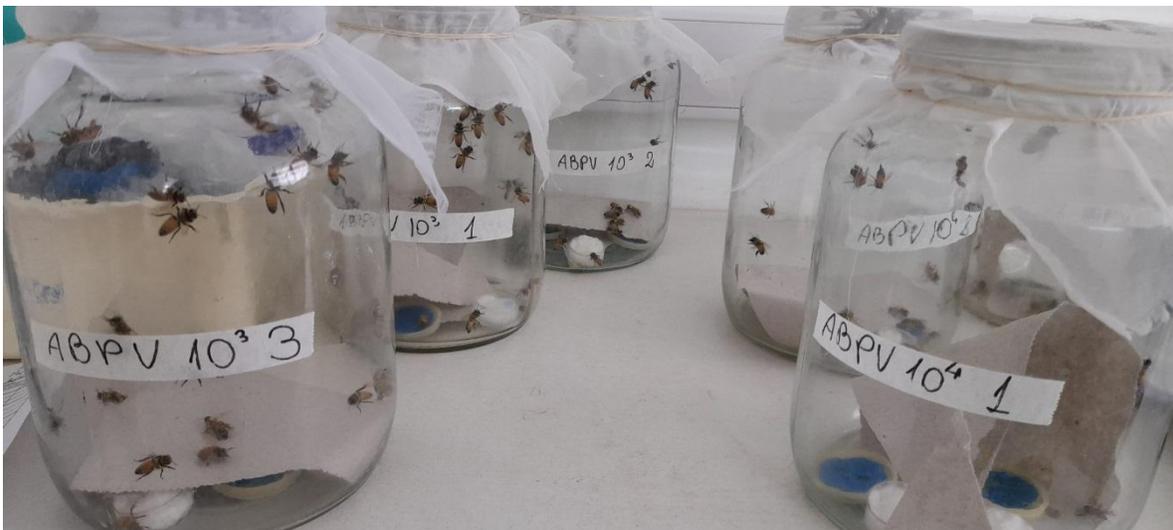


Figura 34: Frascos con abejas a los cuales se les asignaron los tratamientos al azar.

#### 3.3.4.1 Experimento de infección de ABPV

En el experimento de ABPV, al tercer día post infección (dpi) se observó un aumento exponencial en las cargas virales de ambos tratamientos con este virus (día 2 en la figura 35A), siendo el tratamiento que recibió  $10^4$  cg/ $\mu$ l el de mayor aumento, el cual alcanzó niveles de  $10^9$  cg/ $\mu$ l (figura 35A). Respecto a la supervivencia, se observó una disminución marcada al cuarto día post infección en el tratamiento con concentración de ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l (figura 35B). En el grupo control se observó una supervivencia mayor al 85 % y un leve aumento de la carga viral desde el 4to dpi. Además, se observaron signos clínicos de infección viral producida por este virus en los tratamientos infectados con el

virus, tales como: pérdida del cabello del tórax y del abdomen, oscurecimiento gradual (figura 36), temblores e incapacidad de vuelo.

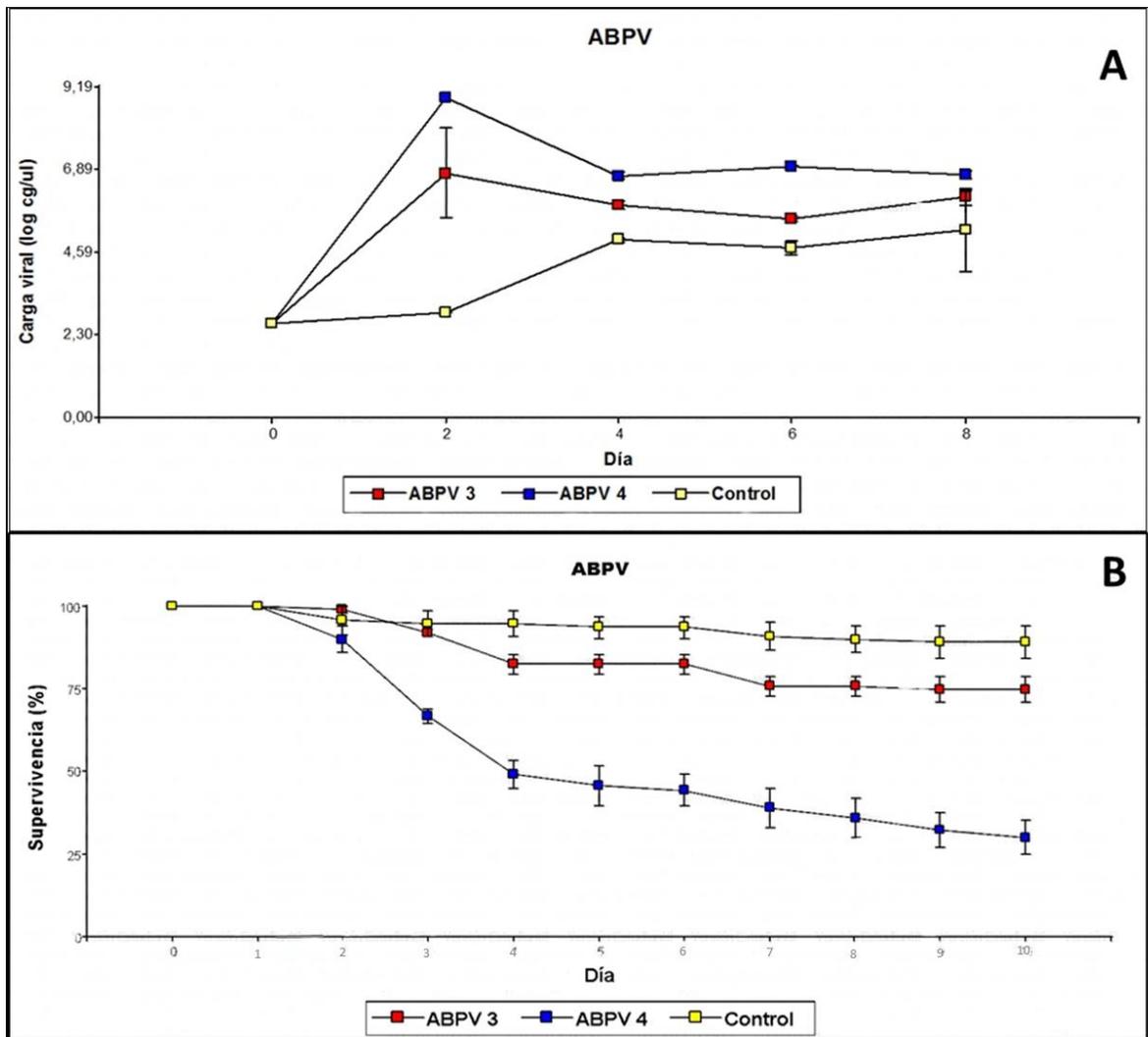


Figura 35: Ensayo de infección de ABPV. A: Gráfico de cargas virales (log copias/ul) en función de los días para cada uno de los 3 tratamientos (ABPV3,  $10^3$  cg/ $\mu$ l, en rojo; ABPV4,  $10^4$  cg/ $\mu$ l, en azul y el control sin virus en Amarillo). B: Gráfico de supervivencia (% de abejas vivas/total) en función de los días para cada uno de los 3 tratamientos (ABPV3 en rojo; ABPV4 en azul y el control en amarillo).



*Figura 36: Signos de infección con ABPV. A la izquierda se observa una abeja sin infectar y a la derecha una abeja infectada*

Para el bioensayo de silenciamiento de ABPV, se seleccionó la dosis viral que generó claras diferencias entre los grupos infectados y no infectados, que para el caso de este virus fue la de ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l.

#### **3.3.4.2 Experimento de infección de BQCV**

En el experimento de BQCV, al tercer día post infección, se observó un leve aumento en las cargas virales en el tratamiento infectado con la concentración más alta el cual alcanzó niveles de  $10^3$  cg/ $\mu$ l (figura 37A). Respecto a la supervivencia, no se observaron diferencias significativas entre los 3 tratamientos (figura 37B). En el tratamiento control se observó una supervivencia mayor al 85 %. Por otro lado, los signos clínicos que se observaron en algunas de las abejas infectadas con la concentración más alta fueron oscurecimiento gradual y pérdida del cabello del tórax y abdomen.

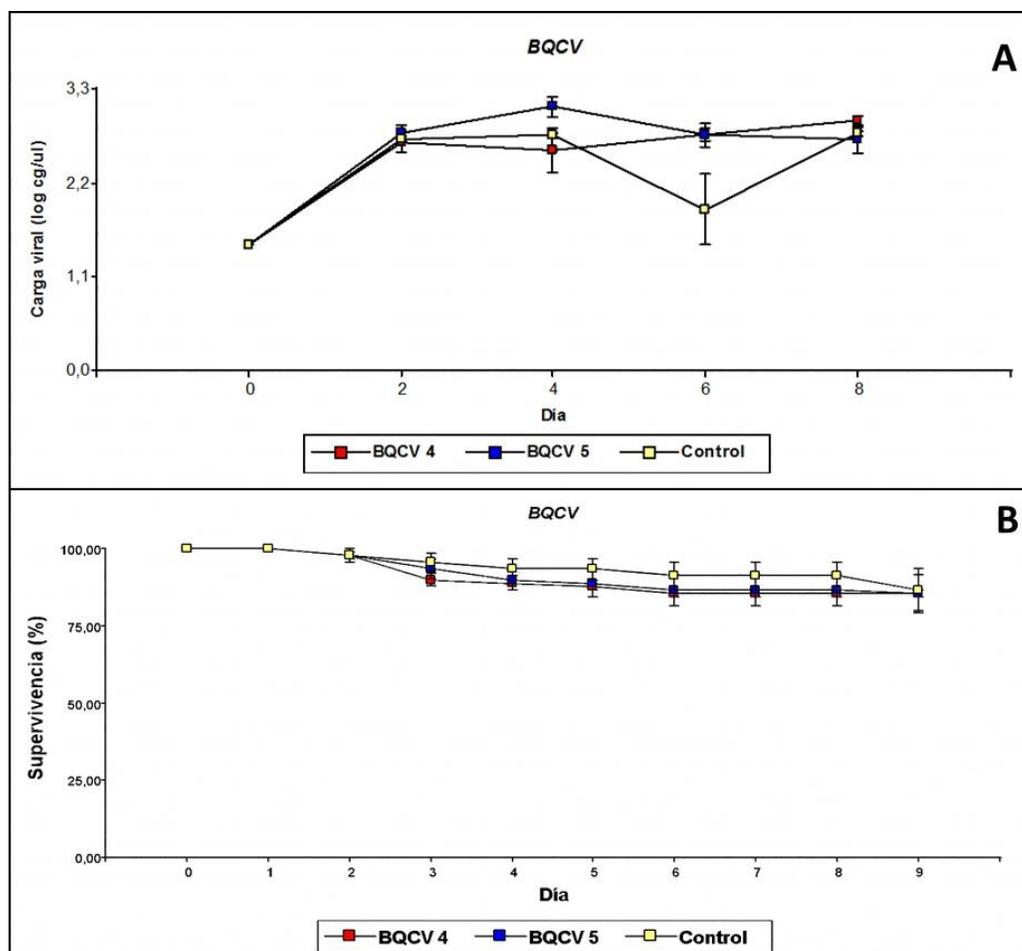


Figura 37: Ensayo de infección de BQCV. A: Gráfico de cargas virales (log. copias génicas /ul) en función de los días para cada uno de los 3 tratamientos (BQCV4,  $10^4$  cg/ $\mu$ l, en rojo; BQCV5,  $10^5$  cg/ $\mu$ l, en azul y el control en amarillo). B: Gráfico de supervivencia (% de abejas vivas/total) en función de los días para cada uno de los 3 tratamientos (BQCV4, en rojo; BQCV5, en azul y el control en amarillo).

Dado que la supervivencia se mantuvo elevada para todos los tratamientos, sumado al poco incremento en las cargas virales para los tratamientos BQCV4 ( $10^4$  cg/ $\mu$ l) y BQCV5 ( $10^5$  cg/ $\mu$ l), esto sugiere que la infección experimental a esas dosis no fue efectiva, por lo que se decidió aumentar la dosis infectiva en los bioensayos de silenciamiento con BQCV.

### 3.3.5 Experimento de silenciamiento de ABPV

Se evaluó el efecto de la administración por vía oral de ARNdc específico para dos genes virales sobre la posterior infección experimental con ABPV. Se procesaron un total

de 116 muestras correspondientes a los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10 de los tratamientos realizados. Luego de efectuar la extracción de ácidos nucleicos, se realizó la cuantificación de cargas virales mediante RT-qPCR, obteniendo los datos que se detallan en el siguiente punto.

### 3.3.5.1 Análisis estadístico de las cargas virales

En el análisis exploratorio de los datos, se presentan las medias, desvíos estándar y varianzas, para cada tiempo en los diferentes tratamientos (apéndice, cuadro 6), y en el gráfico de puntos que se observa a continuación, las concentraciones medias de virus (log copias génicas/ $\mu\text{l}$ ) en los diferentes tiempos para cada uno de los tratamientos (figura 38). Se observó un incremento exponencial en las cargas virales promedio en los tratamientos C (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu\text{l}$ ) y E (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu\text{l}$  + ARNdc no específico); y un leve incremento en el tratamiento B (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu\text{l}$  + ARNdc) al día 4, es decir, 1 dpi. Si bien las cargas virales de los tratamientos A (Control) y D (ARNdc sólo) van aumentado levemente, siempre se diferenciaron significativamente de los tratamientos con virus (tratamientos C y E).

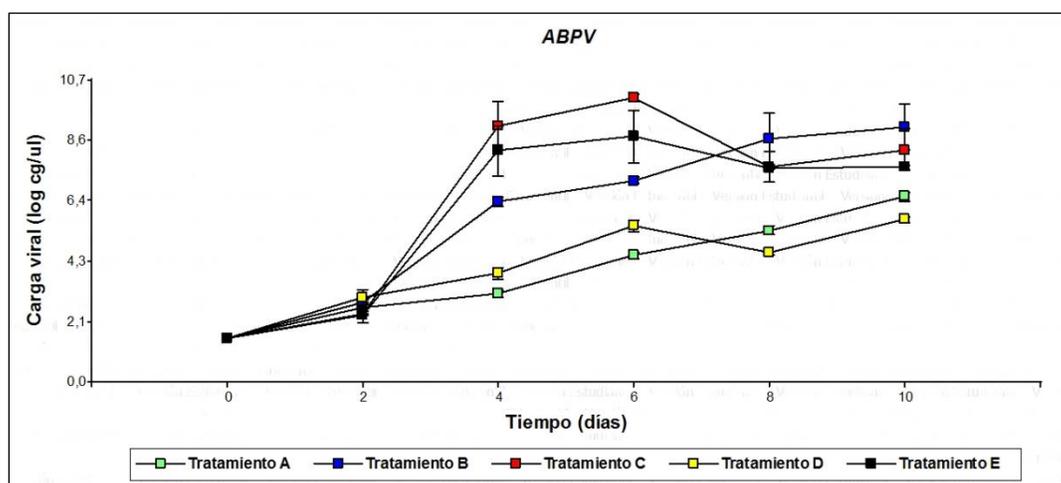


Figura 38: Ensayo de silenciamiento de ABPV. Gráfico de cargas virales (log copias génicas/ $\mu\text{l}$ ) en función de los días para cada uno de los 5 tratamientos (Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: ABPV  $10^4$ cg/ $\mu\text{l}$  + ARNdc, en azul; Tratamiento C: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu\text{l}$ , en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu\text{l}$  + ARNdc no específico, en negro).

Por otra parte, en los contrastes ortogonales realizados para evaluar si había diferencias significativas entre los tratamientos en cada día, al día 4, es decir 1 día post-infección (dpi), se observó una reducción significativa en las cargas virales promedio en el tratamiento B, respecto del tratamiento C ( $p=0,0006$ ) y, respecto del tratamiento E ( $p=0,0306$ ). También se observaron diferencias significativas al día 6 entre los tratamientos B y C ( $p=0,0002$ ) (figura 39).

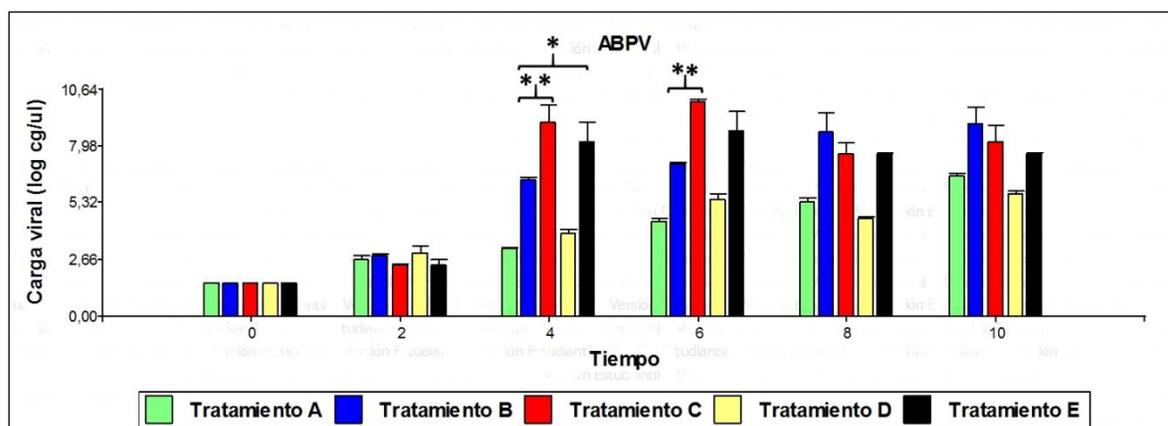


Figura 39: Análisis de las cargas virales de ABPV en los diferentes tratamientos y días del ensayo de silenciamiento. Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: ABPV  $10^4$   $cg/\mu l$  + ARNdc, en azul; Tratamiento C: ABPV  $10^4$   $cg/\mu l$ , en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: ABPV  $10^4$   $cg/\mu l$  + ARNdc no específico, en negro. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos señalados (calculadas mediante el ajuste de un modelo lineal general, realizando contrastes ortogonales).

### 3.3.5.2 Análisis estadístico de supervivencia de abejas

Respecto a la supervivencia de las abejas, el análisis exploratorio para cada tiempo en los diferentes tratamientos se presenta en el cuadro 7 (apéndice). La figura 40 muestra el número de abejas vivas promedio en los diferentes tiempos para cada uno de los tratamientos, en la misma, se observó una disminución marcada en el número de abejas vivas promedio en los tratamientos C y E, a partir del día 5 (2 dpi), y una leve disminución el número de abejas vivas promedio en el tratamiento B a partir del día 6. Respecto al tratamiento control se observan medias de 25 a 30 abejas vivas (del 83,3% al 100%) en los 10 días (apéndice, cuadro 7).

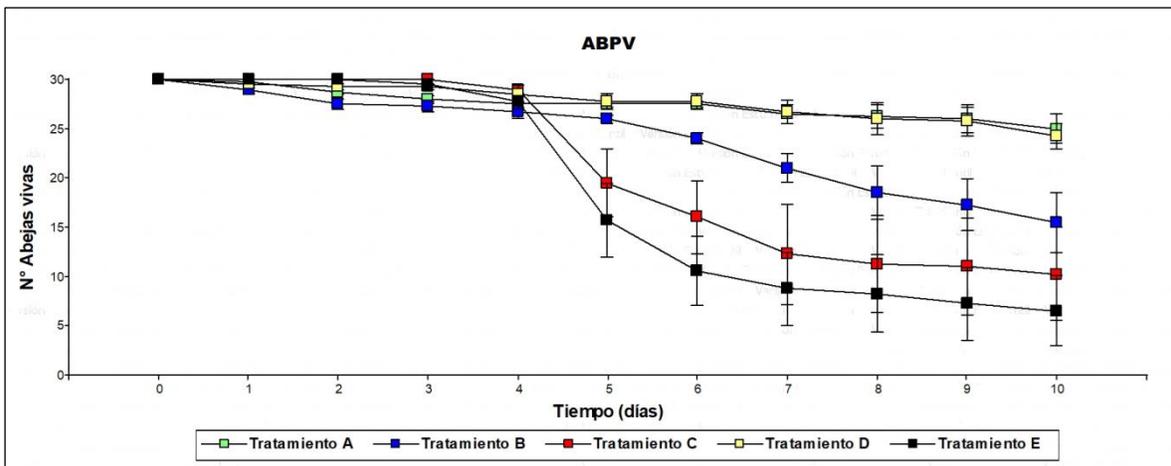


Figura 40: Análisis de la supervivencia frente a los diferentes tratamientos y días del ensayo de silenciamiento de ABPV. Se graficó la supervivencia (n° de abejas vivas) en función del tiempo (días) para cada uno de los 5 tratamientos (Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc, en azul; Tratamiento C: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l, en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico, en negro).

Sumado a esto, en los contrastes ortogonales realizados (cuadro 11), se observaron diferencias significativas ( $p= 0,0039$ ) en el número de abejas vivas promedio entre el tratamiento B y el tratamiento E (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico) al día 5 (2 dpi). A partir del día 6, es decir, 3 dpi, se observaron diferencias significativas (p-valores resaltados en color verde en el cuadro 12) entre el tratamiento B y los tratamientos C (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l) y E (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico). Además, y quizás uno de los resultados más prometedores fue que no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento B (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc) y los tratamientos A (Control) y D (ARNdc solo) hasta el día 7 (p valores resaltados en color amarillo); es decir, que el tratamiento B se comportó como los controles hasta el día 7.

Por otro lado, y para poder estimar la magnitud del efecto que produce la administración del ARNdc, se calcularon los intervalos de confianza para los parámetros de la parte fija (cargas virales y tiempo), obteniendo como resultado que el ARNdc produce

una disminución promedio de 2,31 a 3,06 log cg/ $\mu$ l (IC: 95%) en el tiempo 4 (1 dpi); y una disminución promedio de 2,48 a 3,48 log cg/ $\mu$ l (IC: 95%) en el tiempo 6 (3 dpi).

*Cuadro 11: Contrastes realizados entre los tratamientos para el día 5 en adelante y sus correspondientes p-valores. En verde se resaltan diferencias significativas del tratamiento B respecto los tratamientos C y E; y en amarillo se resalta que no hay diferencias significativas entre el tratamiento B y los tratamientos A y D (análisis realizado mediante el ajuste de un modelo lineal generalizado y comparación de tratamientos mediante contrastes ortogonales).*

<b>Tiempo (día)</b>	<b>Contrastes</b>	<b>p-valor</b>
5	Tratamiento B - Tratamiento A	<b>0,712</b>
	Tratamiento B - Tratamiento C	<b>0,0757</b>
	Tratamiento B - Tratamiento D	<b>0,6693</b>
	Tratamiento B - Tratamiento E	<b>0,0039</b>
6	Tratamiento B - Tratamiento A	<b>0,3841</b>
	Tratamiento B - Tratamiento C	<b>0,0195</b>
	Tratamiento B - Tratamiento D	<b>0,3532</b>
	Tratamiento B - Tratamiento E	<b>&lt;0,0001</b>
7	Tratamiento B - Tratamiento A	<b>0,1527</b>
	Tratamiento B - Tratamiento C	<b>0,0048</b>
	Tratamiento B - Tratamiento D	<b>0,1365</b>
	Tratamiento B - Tratamiento E	<b>&lt;0,0001</b>
8	Tratamiento B - Tratamiento A	0,0373
	Tratamiento B - Tratamiento C	<b>0,0126</b>
	Tratamiento B - Tratamiento D	0,0432
	Tratamiento B - Tratamiento E	<b>0,0002</b>
9	Tratamiento B - Tratamiento A	0,0166
	Tratamiento B - Tratamiento C	<b>0,0263</b>
	Tratamiento B - Tratamiento D	0,0195
	Tratamiento B - Tratamiento E	<b>0,0002</b>
10	Tratamiento B - Tratamiento A	0,0069
	Tratamiento B - Tratamiento C	<b>0,0487</b>
	Tratamiento B - Tratamiento D	0,0119
	Tratamiento B - Tratamiento E	<b>0,0003</b>

### 3.3.6 Experimento de silenciamiento de BQCV

Se evaluó el efecto de la administración por vía oral de ARNdc específico para dos genes virales sobre la posterior infección experimental con BQCV. El experimento se realizó de igual manera que para ABPV, pero se incrementó la dosis de virus ( $10^7$  cg/ $\mu$ l) respecto a la dosis máxima utilizada para los ensayos de infección ( $10^4$  cg/ $\mu$ l).

#### 3.3.6.1 Análisis estadístico de las cargas virales

En el análisis exploratorio de los datos, se presentan las medias, desvíos estándar y varianzas, para cada tiempo en los diferentes tratamientos (apéndice, cuadro 8), y en el gráfico de puntos, las concentraciones medias de virus (log. de copias génicas/ $\mu$ l) en los diferentes tiempos para cada uno de los tratamientos (figura 41). Se observó que hasta el día 4, las cargas virales permanecieron sin diferencias entre los tratamientos. Hubo un leve incremento en las cargas virales promedio en el tratamiento E (BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico) al día 8 (4 dpi) y un leve incremento en los tratamientos B (BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc) y C (BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l) al día 10, es decir, 6 días post-infección. Si bien comenzaron a verse diferencias, no se pudo obtener un patrón claro que permita definir el comportamiento de cada tratamiento.

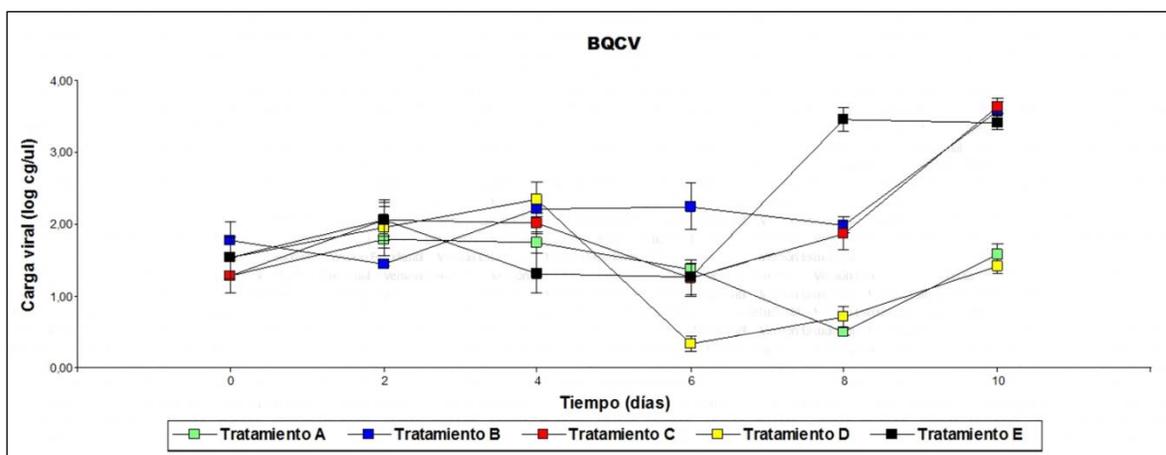


Figura 41: Ensayo de silenciamiento de BQCV. Gráfico de cargas virales (log copias génicas/ $\mu$ l) en función de los días para cada uno de los 5 tratamientos (Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc, en azul; Tratamiento C: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l, en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico, en negro).

### 3.3.6.2 Análisis estadístico de supervivencia de abejas

Respecto a la supervivencia de las abejas, el análisis exploratorio de la variable respuesta número de abejas vivas para cada tiempo en los diferentes tratamientos se presentan en el cuadro 9 (apéndice). Al analizar el número de abejas vivas promedio en los diferentes tiempos para cada uno de los tratamientos (figura 42), se observó una disminución en el número de abejas vivas promedio en los tratamientos C y E y una leve disminución en el número de abejas vivas promedio en el tratamiento B a partir del día 7 (4 días post-infección). Respecto al tratamiento A (control), y al tratamiento D (ARNdc solo) al día 10, el número de abejas vivas promedio fue de 28 y de 22,75 respectivamente (apéndice, cuadro 8).

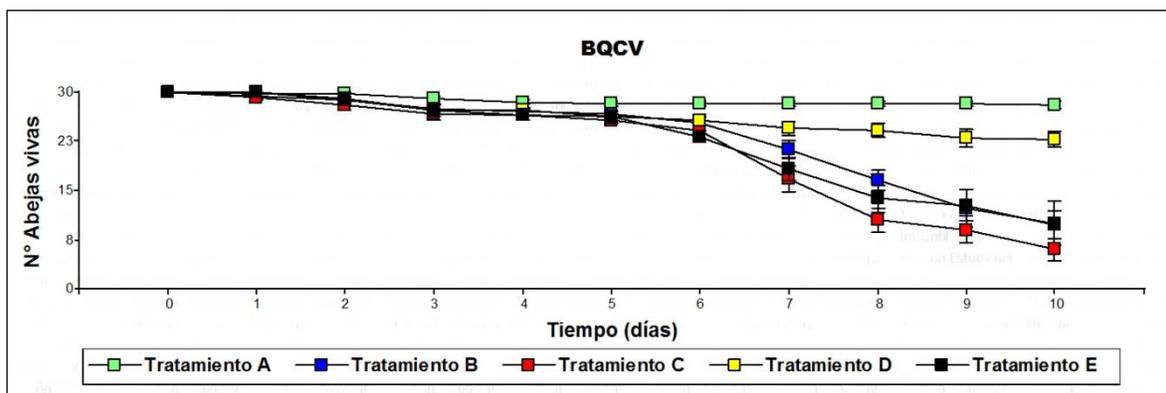


Figura 42: Análisis de la supervivencia frente a los diferentes tratamientos y días del ensayo de silenciamiento de ABPV. Se graficó la supervivencia (nº de abejas vivas) en función del tiempo (días) para cada uno de los 5 tratamientos (Tratamiento A: Control, en verde; Tratamiento B: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc, en azul; Tratamiento C: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l, en rojo; Tratamiento D: ARNdc solo, en amarillo; Tratamiento E: BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico, en negro).

A pesar de haber utilizado una dosis superior a la de los ensayos de infección, recién en el día 7 comenzaron a verse efectos de la infección en relación a la supervivencia, pero sin presentar diferencias significativas entre el tratamiento B y los tratamientos C y E.

### 3.4 DISCUSIÓN

#### 3.4.1 Producción de ARNdc

En este trabajo se realizaron dos metodologías de producción de ARNdc, *in vivo* e *in vitro*, de dos genes de ABPV y dos genes de BQCV para utilizarlo como metodología de control de virus. Ambas metodologías presentan ventajas y desventajas, la producción *in vivo* es menos costosa, pero es más difícil obtener un producto sin restos de otros contaminantes y conlleva mucho más tiempo; por otro lado, la producción *in vitro* se realiza en menos tiempo y se obtiene un producto más puro, pero es muy costosa. Debido a esto, se decidió utilizar el ARNdc producido *in vitro*, ya que se priorizó la pureza y el tiempo requerido para la producción. Además, la producción de ARNdc *in vitro* se ha realizado en varios trabajos de silenciamiento de virus de abejas (Desai et al., 2012; Maori et al., 2009). Sin embargo, es importante valorar la producción *in vivo* que se ha realizado en este trabajo, ya que permitiría una producción a mayor escala para avanzar a una obtención comercial a bajo costo.

También, se determinó una estabilidad del ARNdc de hasta 19 días diluido en agua y alimento de abejas a temperaturas de 4°C y 32°C, es muy importante tener en cuenta que el ARNdc, una vez que ingresa al organismo de la abeja, se encontrará en un entorno diferente, pudiendo ocurrir algún tipo de degradación en comparación con los ensayos de estabilidad, o consumo del mismo al producirse el silenciamiento génico lo cual determinaría un “agotamiento” del ARNdc disponible. Debido a esto, deben realizarse más estudios para comprender estos procesos de la dinámica de ARNdc dentro de la abeja.

#### 3.4.2 Experimentos de infección

En el experimento de ABPV, al 3er día post infección se observó un aumento exponencial en las cargas virales de ambos grupos infectados, siendo el grupo de concentración  $10^4$  cg/ $\mu$ l el de mayor aumento (de  $10^1$  a  $10^9$  cg/ $\mu$ l de ABPV). Estos resultados fueron similares a los reportados por Thaduri y colaboradores en el año 2019, quienes observaron picos de replicación viral al 2do día post infección. Si bien en el control hubo aumento de las cargas virales, debido al virus basal presente en las muestras, esos niveles no generaron mortalidad ni signos clínicos. Respecto a la supervivencia, se observó

una disminución marcada al día siguiente del pico de replicación viral en el grupo infectado con la concentración de ABPV  $10^4$  cg/ul, esta situación de mortalidad marcada 1 día luego del pico de replicación viral también se observó en el trabajo de Thaduri (Thaduri et al., 2019).

En el experimento de BQCV, al 3er día post infección, se observó un leve aumento en las cargas virales en el grupo infectado con la concentración más alta. Respecto a la supervivencia, no se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos, estos resultados son similares a los descritos por Doublet y col. del año 2014, quienes no encontraron diferencias significativas entre el grupo de abejas infectadas y el control. En este trabajo de tesis, las dosis evaluadas de BQCV fueron subóptimas ya que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos infectados y el control. Respecto a esto, se ha reportado que la infección causada por BQCV en abejas adultas suele ser exacerbada por otros patógenos o factores estresantes como por ejemplo pesticidas, en ese trabajo se infectaron abejas adultas con una concentración de BQCV de  $10^9$  cg/ $\mu$ l y recién al día 25 observaron una mortalidad del 50%, y una mortalidad mayor en una infección en conjunto con BQCV  $10^9$  cg/ $\mu$ l y *Nosema apis* (Doublet et al., 2015).

### 3.4.3 Experimentos de silenciamiento génico

La dosis de ARNdc utilizada en ambos experimentos de silenciamiento fue de 1  $\mu$ g por abeja, tal como se realizó en otros trabajos de silenciamiento de virus de abeja (Desai et al., 2012; Maori et al., 2009).

Respecto al experimento de silenciamiento de ABPV, al inicio del mismo y hasta el día 2 todos los tratamientos se comportaron de modo similar (no hubo aumento de cargas virales). Las cargas virales basales fueron aumentando muy levemente en todos los tratamientos de igual manera que en el experimento realizado por Dalmon, en el que se evaluaron cargas virales de DWV a diferentes temperaturas (Dalmon et al., 2019). Los motivos pueden ser el estrés provocado por el experimento, su manipulación fuera de la colmena, no estar en comunidad ni acompañadas de su reina. Estos factores pudieron haber actuado de manera individual o incluso sinérgica ocasionando el aumento leve y paulatino de las cargas virales basales.

Posteriormente, se observaron diferencias significativas a los días 4 (1 dpi) y 6, que es cuando en los tratamientos C (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l) y E (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico) ocurre el pico de replicación viral; además, hubo una reducción significativa en las cargas virales promedio en el tratamiento B (ABPV  $10^4$  cg/ $\mu$ l + ARNdc), respecto a los tratamientos C y E. Sumado a esto, al día 6, se observaron diferencias significativas en las cargas virales promedio, entre los tratamientos B y C. Es decir que, con la administración de ARNdc se ha logrado disminuir la curva de replicación viral, repercutiendo esto en una mayor supervivencia de abejas en el tratamiento B, en el cual, al día 5 (2 días post-infección) se observaron diferencias significativas en el número de abejas vivas promedio entre el tratamiento B y el tratamiento E, y a partir del día 6 (3 dpi) entre el tratamiento B y los tratamientos C y E. Resultados similares se obtuvieron en trabajos en los que se silenciaron otros virus, como por ejemplo el de Desai y col. en el 2012, quienes han demostrado que alimentar con ARNdc específico para DWV, redujo los efectos adversos de posteriores infecciones por ese virus (Desai et al., 2012).

Los resultados obtenidos permitieron estimar el efecto que produce la administración de ARNdc en el experimento de silenciamiento, es decir, que por cada  $\mu$ g de ARNdc administrado se produjo una disminución de las cargas virales promedio de 2,48 a 3,48 log cg/ $\mu$ l en el tiempo 6 (3 dpi). Estos resultados demuestran por primera vez el impacto de esta estrategia sobre la abundancia de virus.

Por otro lado, y quizás uno de los resultados más prometedores, es que el tratamiento con ARNdc (B) se comportó como los controles hasta el día 7, sin diferencias significativas entre ellos. Respecto a esto, se podría realizar una segunda administración de ARNdc al día 5 para conseguir que el tratamiento B se siga comportando como los controles. También podría evaluarse una concentración mayor de ARNdc o más genes blancos de silenciamiento, a fin de prolongar el efecto antiviral del ARNdc.

Además, es muy importante resaltar que el tratamiento D (ARNdc solo) se comportó como el control respecto a las cargas virales y a la supervivencia. Este tratamiento se realizó para evaluar la inocuidad del ARNdc administrado.

Respecto al experimento de silenciamiento de BQCV, hasta el día 4, las cargas virales permanecieron sin diferencias entre los tratamientos. Al día 8 (5 dpi) se observó un leve incremento en las cargas virales promedio en el tratamiento E (BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc no específico); y al día 10 (7 dpi) un leve incremento en los tratamientos B (BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l + ARNdc) y C (BQCV  $10^7$  cg/ $\mu$ l). Como se ha mencionado previamente, la infección causada por BQCV en abejas adultas suele ser exacerbada por otros patógenos o factores estresantes (Doublet et al., 2015). En este caso, a pesar de haber utilizado una dosis superior ( $10^7$  cg/ $\mu$ l) que la de los ensayos de infección, recién en el día 7 comenzaron a verse efectos de la infección en relación a la supervivencia, pero sin que haya diferencias entre el tratamiento con ARNdc y los tratamientos C y E. Es importante resaltar que, para ambos experimentos de silenciamiento, (ABPV y BQCV) es probable que entre el día 5 y 6 el ARNdc deje de ejercer su acción porque se agota o se degrada. Quizás, coincidiría con el "agotamiento" del ARNdc provocando que no se detecte efecto alguno. Si bien en los ensayos de estabilidad permaneció sin degradarse hasta el día 19, las condiciones del experimento son diferentes, ya que no se tiene información de su estabilidad dentro del organismo de la abeja. En el caso de BQCV es probable que requiera dosis aún más altas y más días para infectar, replicar y aumentar las cargas virales. Será necesario evaluar la cinética de infección con dosis superiores de BQCV para poder definir en qué momento ocurre el pico de infección y, en función de ello, decidir cuándo administrar el ARNdc.

### 3.5 CONCLUSIONES

En este capítulo se relata el desarrollo de una posible metodología de control de virus mediante el uso de ARNdc. Para llevar a cabo este objetivo, se realizó la producción de ARNdc tanto *in vivo* como *in vitro*, y se evaluó la estabilidad del ARNdc producido durante 19 días. Por otro lado, para conocer la dinámica de los virus, se realizaron dos experimentos de infección viral para poder desarrollar el diseño de experimento más adecuado a fin de evaluar el silenciamiento génico.

Finalmente se realizaron experimentos de silenciamiento donde se logró disminuir de manera significativa la curva de replicación viral, produciendo esto una disminución significativa en la mortalidad de abejas tratadas con ARNdc e infectadas con ABPV por primera vez en el mundo. Respecto al experimento de silenciamiento de BQCV, se

necesitan evaluar dosis más altas de virus u otra vía de administración del virus para poder determinar si el ARNdc produce silenciamiento génico.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN GENERAL

#### 4.1 Detección de Virus de abejas en cabañas apícolas

Han ocurrido diferentes episodios de mortalidad y reducciones en la producción de miel asociadas a presencia viral en todo el mundo (Bacandritsos et al., 2012; Chen et al., 2006; Chen & Siede, 2007; Genersch & Aubert, 2010; Gumusova et al., 2010). Existe una creciente preocupación por el efecto de las infecciones virales en abejas melíferas, en gran medida, debido a la posible relación entre las enfermedades virales y la mortalidad de las mismas (Cox-Foster et al., 2007; Hunter et al., 2010). Por otro lado, las cabañas apícolas proveen de material vivo a otros apiarios, ya sean los destinados a la producción de miel o al servicio de polinización. Respecto a los virus que afectan a las abejas, sólo algunos trabajos describen la presencia viral y que efectos producen en la producción de material vivo a nivel mundial.

Respecto a la abeja reina, ésta es apareada por aproximadamente 14 zánganos, pero a nivel productivo, una metodología muy utilizada es la inseminación artificial, para evitar la transmisión horizontal de diferentes enfermedades. Sin embargo, en el año 2019 se detectó genoma viral en el 91% de las muestras de semen de zánganos aparentemente sanos utilizados para la inseminación artificial (Prodělalová et al., 2019).

Por otro lado, Ravoet y colaboradores reportaron la presencia viral en huevos de reinas en un control sanitario de un programa de crianza de reinas, evidenciando la transmisión vertical de los virus (Ravoet et al., 2015). Además, se detectaron KBV y SBV en el alimento de la colonia, incluida la miel, el polen y la jalea real, lo que sugiere la propagación de infecciones virales mediante la distribución de alimentos de las colmenas (Shen et al., 2005).

En conclusión, la transmisión de virus en las cabañas apícolas puede darse por distintas vías. Esto, sumado a la falta de conocimiento respecto a la dinámica de los virus en estos sistemas productivos, complejiza el control de los mismos e impacta en la sanidad de las futuras reinas. En este trabajo de Tesis, se detectaron ABPV, DWV, BQCV, SBV y

confección entre ABPV-BQCV, DWV-BQCV y DWV-ABPV en porcentajes bajos en abejas adultas. Sin embargo, en una cabaña proveniente de la provincia de Entre Ríos, se detectó ABPV en el 62,5% de las pupas de reinas y BQCV en el 25%; y en otra de Tucumán, BQCV en el 28,5% de las pupas de reinas y SBV en el 14,3%. Estas dos cabañas mostraron un alto porcentaje de mortalidad en pupas de reinas, presentando pérdidas en la producción de un 60% a un 100% de celdas reales, además de signos de infecciones virales. Respecto a esto, es relevante recordar que los virus afectan de manera diferente dependiendo de la etapa de vida de las abejas; en las abejas adultas, por ejemplo, algunos virus no causan síntoma alguno, pero cuando infectan a las pupas (el individuo más susceptible de la colonia) amplifican de manera exponencial y causan la muerte. En este caso, se detectó poca presencia viral en las colmenas, esto puede deberse a que las cabañas apícolas poseen buenas prácticas de manejo, con nutrición adecuada y realizan tratamientos para controlar parásitos. Sin embargo, la presencia viral en las pupas de reinas pudo causar la muerte y grandes pérdidas en estas cabañas. En el año 2019 un equipo de trabajo detectó la presencia de ABPV, BQCV y DWV en obreras y reinas durante el proceso de producción de reinas, además mencionaron que BQCV representa una amenaza potencial al desarrollo de reinas durante el procedimiento de crianza de reinas (Žvokelj et al., 2020).

Se necesitan más estudios de la dinámica de los virus en la producción de material vivo para poder conocer los momentos críticos del proceso en los que puede haber presencia y replicación viral. Esto permitirá evaluar planes de contingencia y/o metodologías de control.

Respecto a la detección de otros agentes que se realizó en este trabajo de Tesis, el ácaro *Varroa destructor* se detectó en el 80,2% de las muestras analizadas, y en una provincia el porcentaje de infestación fue superior al 3%. Como se ha mencionado en el capítulo 2, hay pocos trabajos que describen el impacto de este parásito sobre la producción de material vivo. Respecto a *Nosema apis*, se detectó en el 86,8% de las muestras analizadas, y mostrando un recuento promedio de esporas mayor a 1 millón en dos apiarios de las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires.

Finalmente, se encontró que la presencia de virus y la presencia de nosema tendían a incrementarse con la humedad relativa. También, se encontraron asociaciones entre la presencia de varroa y la presencia de nosema.

#### **4.2 Caracterización molecular y análisis filogenéticos**

Respecto al segundo ítem del objetivo específico 1, y dado que había poca o nula información publicada sobre secuencias de aislados argentinos de virus de abejas, se secuenciaron fragmentos génicos que codifican para la proteína VP1 de BQCV y ABPV y se realizaron análisis filogenéticos con secuencias de virus de otros países para evaluar cuán relacionados estaban. Los análisis realizados, mostraron que las secuencias de ABPV de Argentina, Brasil, Uruguay y Chile están estrechamente relacionadas en un grupo sudamericano. En cambio, el análisis de las secuencias de BQCV no mostró agrupación geográfica, y se observó que la secuencia argentina se agrupa más cerca de las secuencias de China y EE. UU.

#### **4.3 Experimentos de infección**

Los experimentos de infección se realizaron para conocer la cinética de infección de los virus, es decir, como es la curva de replicación viral, en qué momento ocurre su pico de replicación, cuantos días se extiende y que tipo de signos clínicos produce; ya que hay pocos trabajos sobre estos aspectos de la biología de estos virus (Desai et al., 2012; Doublet et al., 2015; Thaduri et al., 2019)

En el experimento de ABPV, se observó un aumento exponencial en las cargas virales en el grupo de concentración  $10^4$  cg/ $\mu$ l al 3er día post infección, lo que produjo una disminución marcada al día siguiente del pico de replicación viral, esta situación de mortalidad marcada 1 día luego del pico de replicación viral también se observó en el trabajo de Thaduri y colaboradores (Thaduri et al., 2019).

En el experimento de BQCV las dosis evaluadas de BQCV fueron subóptimas por lo que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos infectados y el control. Resultados similares a los descritos por Doublet y colaboradores, quienes no

encontraron diferencias significativas entre el grupo de abejas infectadas y el control (Doublet et al., 2015).

#### **4.5 Experimentos de silenciamiento**

Se han reportado estudios que demuestran que es posible controlar infecciones virales en abejas mediante la ingestión de ARNdc específico para DWV (Desai et al., 2012). También, se ha demostrado que la administración vía oral de ARNdc confiere resistencia a IAPV (Maori et al., 2009) y SBV (Liu et al., 2010) en abejas melíferas. Además, se ha realizado un experimento a gran escala donde se evaluó la administración de ARNi para controlar infecciones causadas por IAPV (Hunter et al., 2010).

En este trabajo de Tesis se logró disminuir la curva de replicación viral de ABPV lo cual determinó una disminución significativa en la mortalidad de abejas adultas producida por este virus, este es el primer reporte de silenciamiento de ABPV en todo el mundo. Respecto a BQCV, la dosis utilizada fue subóptima, y no se logró evaluar si el ARNdc producía silenciamiento génico, se necesitan realizar experimentos con dosis más altas para lograr evaluar de manera satisfactoria el silenciamiento génico.

#### **CONCLUSIONES GENERALES**

En este trabajo de Tesis se realizó el primer relevamiento de virus de abeja en cabañas apícolas de la Argentina, que proveen de material vivo a los demás apiarios tanto de producción de miel como los que realizan servicio de polinización, siendo estas cabañas el primer eslabón de una gran cadena de comercialización. Respecto al objetivo específico 1, los virus más prevalentes fueron ABPV, BQCV y DWV; además, dos de estos virus (BQCV y ABPV) se detectaron en cabañas con grandes pérdidas en la producción de celdas reales. Gracias a estas detecciones se realizaron las recomendaciones correspondientes para poder controlar las infecciones virales y poder seguir adelante con la producción. Con estos resultados se acepta la hipótesis 1 la cual postula que en los apiarios productores de material vivo pueden detectarse diferentes agentes virales en formas de infecciones simples o múltiples.

Por otro lado, para obtener virus en grandes concentraciones para luego purificarlo y utilizarlo en los bioensayos tanto de infección viral como de silenciamiento, se amplificaron los virus detectados mediante técnicas *in vivo*, y se purificaron para incorporarlos también al cepario del Instituto de Virología (INTA).

Además, se caracterizaron las muestras positivas a BQCV y ABPV de pupas de reinas con signos de infección viral provenientes de la cabaña apícola con pérdidas en la producción; sumado a esto, en los análisis filogenéticos realizados se encontró que ABPV está estrechamente relacionado con Brasil, Uruguay y Chile. En cambio, BQCV se encuentra agrupado con EEUU y China. Es relevante obtener secuencias de virus de otras provincias y de otros genes para ampliar la información respecto a las relaciones filogenéticas de los aislamientos de Argentina con los de otros países.

Por otro lado, se realizó la producción *in vivo* e *in vitro* de ARNdc específico de dos genes de ABPV y dos genes de BQCV para utilizarlo como metodología de control de virus. En los experimentos de silenciamiento viral se realizó la producción *in vitro*, para poder concluir con los experimentos, pero es importante destacar que una producción *in vivo* permitiría producirlo a gran escala y a bajo costo. Se necesitan más estudios para lograr una producción *in vivo* y posterior purificación que permita obtener un producto comercial a bajo costo.

Respecto al objetivo específico 2, y uno de los aspectos más valiosos de esta Tesis, es que utilizando ARNdc de solo dos genes, se logró disminuir de manera significativa la mortalidad provocada por ABPV por primera vez. Debido a esto, se acepta la hipótesis 2 la cual postula que la presencia de agentes virales en abejas puede reducirse mediante el uso de ARN interferente. Estos resultados son muy prometedores ya que el ARNdc tiene muchos posibles usos, puede ser administrado en los momentos más susceptibles a infecciones virales durante el proceso de producción de reinas o en la época que estacionalmente se sabe que las cargas virales aumentan, puede también administrarse previo al transporte de reinas para la exportación (momento de estrés en el cual suele ocurrir mortandad, quizás por el incremento de una abundancia basal de virus), utilizarse para obtener colmenas libres de virus para realizar experimentos de laboratorio, o utilizarse como inhibidor de replicación viral en los cultivos *in vitro* en desarrollo, en los que el

principal problema es la presencia basal de virus. Es relevante seguir desarrollando metodologías de control de virus, con el fin de disminuir pérdidas en la producción de material vivo y comercializar productos con la mayor sanidad posible.

Esta Tesis aporta conocimiento sobre la presencia viral en cabañas apícolas y presenta una potencial metodología de control de los mismos mediante silenciamiento génico. Los resultados obtenidos mostraron que las cabañas productoras de material vivo son igualmente susceptibles a infecciones virales que las colonias de abejas productoras de miel o las que ofrecen servicio de polinización. Debido a la importancia que la cría de reinas tiene en la producción apícola, las estrategias tendientes a reducir cualquier efecto adverso sobre las mismas son de suma importancia. La metodología antiviral evaluada en este trabajo es prometedora y podría convertirse en una herramienta de utilidad para reducir la circulación de agentes virales. Futuros estudios permitirán establecer las dosis óptimas de ARNdc y la evaluación de nuevos blancos de silenciamiento permitirán incrementar el potencial de esta estrategia. Además, resulta de interés estudiar si el efecto del ARNdc puede ser tanto preventivo como terapéutico, pudiendo en este último caso combatir posibles brotes de enfermedades causadas por virus.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Shaara, H., Al-Ghamdi, A., & Mohamed, A. A. (2012). Tolerance of two honey bee races to various temperature and relative humidity gradients. *Environmental and Experimental Biology*, *10*, 133-138.
- Allen, M., & Ball, B. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, *77*(3), 141-162. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1996.11099306>
- Amiri, E., Strand, M., Rueppell, O., & Tarpay, D. (2017). Queen Quality and the Impact of Honey Bee Diseases on Queen Health: Potential for Interactions between Two Major Threats to Colony Health. *Insects*, *8*(2), 48. <https://doi.org/10.3390/insects8020048>
- Anguiano-Baez, R., Guzman-Novoa, E., Md. Hamiduzzaman, M., Espinosa-Montaña, L. G., & Correa-Benítez, A. (2016). *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) Parasitism and Climate Differentially Influence the Prevalence, Levels, and Overt Infections of Deformed Wing Virus in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Science*, *16*(1), 44. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew029>
- Aubert, M. (2008). Impact of virus infection in honey bees. *Virology and the honey bee. European Communities, Luxembourg*, 233-253.
- Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J.-N., Michaud, B., Odoux, J.-F., & Pham-Delègue, M.-H. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, *58*, 107-111.
- Bacandritsos, N., Roinioti, E., & Papanastasiou, I. (2012). The important honey bee viruses: A short descriptive review enhanced with recent data. *Bees: Biology, Threats and Colonies*, 169-188.

- Bailey, L., Ball, B. V., & Perry, J. N. (1983). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology*, *103*(1), 13-20. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1983.tb02735.x>
- Bailey, L., Gibbs, A. J., & Woods, R. D. (1964). Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* linnaeus). *Virology*, *23*(3), 425-429. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(64\)90266-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(64)90266-1)
- Bailey, L., & Woods, R. D. (1977). Two More Small RNA Viruses from Honey Bees and Further Observations on Sacbrood and Acute Bee-Paralysis Viruses. *Journal of General Virology*, *37*(1), 175-182. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-37-1-175>
- Bakonyi, T., Grabensteiner, E., Kolodziejek, J., Rusvai, M., Topolska, G., Ritter, W., & Nowotny, N. (2002). Phylogenetic Analysis of Acute Bee Paralysis Virus Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 6446-6450. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6446-6450.2002>
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smaghe, G., Yañez, O., De Miranda, J. R., & Dalmon, A. (2020). Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects*, *11*(4), 239. <https://doi.org/10.3390/insects11040239>
- Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M., & Davison, S. (2001). Detection of Acute Bee Paralysis Virus and Black Queen Cell Virus from Honeybees by Reverse Transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(5), 2384-2387. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2384-2387.2001>
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., & Nowotny, N. (2006). Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 72(4), 2414-2420.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2414-2420.2006>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.606-611.2006>
- Chen, Y. P., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. En *Advances in Virus Research* (Vol. 70, pp. 33-80). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(07\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7)
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S. K., Simons, J. F., ... Lipkin, W. I. (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*, 318(5848), 283-287.  
<https://doi.org/10.1126/science.1146498>
- Dalmon, A., Peruzzi, M., Le Conte, Y., Alaux, C., & Pioz, M. (2019). Temperature-driven changes in viral loads in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 160, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.12.005>
- de Miranda, J. R., Bailey, L., Ball, B. V., Blanchard, P., Budge, G. E., Chejanovsky, N., Chen, Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D. C., Ribière, M., Ryabov, E., De Smet, L., & van der Steen, J. J. M. (2013). Standard methods for virus research

- in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-56.  
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>
- de Miranda, J. R., Cordoni, G., & Budge, G. (2010). The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S30-S47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014>
- Deng, Y., Jiang, X., Zhao, H., Yang, S., Gao, J., Wu, Y., Diao, Q., & Hou, C. (2021). Microplastic Polystyrene Ingestion Promotes the Susceptibility of Honeybee to Viral Infection. *Environmental Science & Technology*, 55(17), 11680-11692. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01619>
- Desai, S. D., Eu, Y.-J., Whyard, S., & Currie, R. W. (2012). Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion: Reduction in DWV in honey bees using RNAi. *Insect Molecular Biology*, 21(4), 446-455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2012.01150.x>
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H. F., Evans, J. D., & Chen, Y. (2011). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, 92(1), 151-155. <https://doi.org/10.1099/vir.0.023853-0>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., & Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-54. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>

- Ding, G., Fondevila, N., Palacio, M. A., Merke, J., Martinez, A., Camacho, B., Aignasse, A., Figini, E., Rodriguez, G., Lv, L., Liu, Z., & Shi, W. (2016). Prevalence of honeybee viruses in different regions of China and Argentina: -EN- -FR- Prévalence des virus des abeilles mellifères dans plusieurs régions de Chine et d'Argentine -ES- Prevalencia de virus de la abeja melífera en diferentes regiones de China y la Argentina. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 35(3), 825-833. <https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2572>
- Dittes, J., Schäfer, M. O., Aupperle-Lellbach, H., Mülling, C. K. W., & Emmerich, I. U. (2020). Overt Infection with Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) in Two Honey Bee Colonies. *Veterinary Sciences*, 7(3), 142. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030142>
- Doublet, V., Labarussias, M., De Miranda, J. R., Moritz, R. F. A., & Paxton, R. J. (2015). Bees under stress: Sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle: Pesticide-pathogen interactions in honey bees. *Environmental Microbiology*, 17(4), 969-983. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12426>
- Doull, K. M. (1976). THE EFFECTS OF DIFFERENT HUMIDITIES ON THE HATCHING OF THE EGGS OF HONEYBEES. *Apidologie*, 7(1), 61.
- Francis, R. M., Nielsen, S. L., & Kryger, P. (2013). Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS ONE*, 8(3), e57540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057540>
- Galbraith, D. A., Fuller, Z. L., Ray, A. M., Brockmann, A., Frazier, M., Gikungu, M. W., Martinez, J. F. I., Kapheim, K. M., Kerby, J. T., Kocher, S. D., Losyev, O., Muli, E., Patch, H. M., Rosa, C., Sakamoto, J. M., Stanley, S., Vaudo, A. D., & Grozinger, C. M. (2018). Investigating the viral ecology of global bee communities

- with high-throughput metagenomics. *Scientific Reports*, 8(1), 8879.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27164-z>
- Gammon, D. B., & Mello, C. C. (2015). RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 111-120.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.006>
- Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., & Bergoin, M. (2007). Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*, 38(5), 426-435.  
<https://doi.org/10.1051/apido:2007026>
- Genersch, E., & Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41(6), 54.  
<https://doi.org/10.1051/vetres/2010027>
- Giacobino, A., Molineri, A. I., Pacini, A., Fondevila, N., Pietronave, H., Rodríguez, G., Palacio, A., Bulacio Cagnolo, N., Orellano, E., Salto, C. E., Signorini, M. L., & Merke, J. (2016). *Varroa destructor* and viruses association in honey bee colonies under different climatic conditions: Effect of climate on honey bee diseases association. *Environmental Microbiology Reports*, 8(3), 407-412.  
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12410>
- Gregorc, A., & Bakonyi, T. (2012). Viral infections in queen bees (*Apis mellifera carnica*) from rearing apiaries. *Acta Veterinaria Brno*, 81(1), 15-19.  
<https://doi.org/10.2754/avb201281010015>
- Gumusova, S., Albayrak, H., Kurt, M., & Yazici, Z. (2010). Prevalence of three honey bee viruses in Turkey. *Veterinarski Arhiv*, 80, 779-785.

- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P. G., & Correa-Benítez, A. (2010). *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, *41*(4), 443-450. <https://doi.org/10.1051/apido/2009076>
- Hartmann, U., Forsgren, E., Charrière, J.-D., Neumann, P., & Gauthier, L. (2015). Dynamics of *Apis mellifera* Filamentous Virus (AmFV) Infections in Honey Bees and Relationships with Other Parasites. *Viruses*, *7*(5), 2654-2667. <https://doi.org/10.3390/v7052654>
- Hou, C., Li, B., Deng, S., Chu, Y., & Diao, Q. (2017). Diagnosis and distribution of the *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) in honey bees (*Apis mellifera*) in China. *Insectes Sociaux*, *64*(4), 597-603. <https://doi.org/10.1007/s00040-017-0569-4>
- Hou, C., Rivkin, H., Slabezki, Y., & Chejanovsky, N. (2014). Dynamics of the Presence of Israeli Acute Paralysis Virus in Honey Bee Colonies with Colony Collapse Disorder. *Viruses*, *6*(5), 2012-2027. <https://doi.org/10.3390/v6052012>
- Human, H., Nicolson, S. W., & Dietemann, V. (2006). Do honeybees, *Apis mellifera* scutellata, regulate humidity in their nest? *Naturwissenschaften*, *93*(8), 397-401. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0117-y>
- Hunter, W., Ellis, J., vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Westervelt, D., Glick, E., Williams, M., Sela, I., Maori, E., Pettis, J., Cox-Foster, D., & Paldi, N. (2010). Large-Scale Field Application of RNAi Technology Reducing Israeli Acute Paralysis Virus Disease in Honey Bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathogens*, *6*(12), e1001160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001160>

- Kaftanoglu, O., Linksvayer, T. A., & Page, R. E. (2011). Rearing Honey Bees, *Apis mellifera*, *in vitro* 1: Effects of Sugar Concentrations on Survival and Development. *Journal of Insect Science*, *11*(96), 1-10. <https://doi.org/10.1673/031.011.9601>
- Kang, Y. B., Kim, D. S., & Jang, D. H. (1976). Experimental Studies on Pathogenicities and Developmental Stages of *Nosema apis*(Zander, 1909). *Korean Journal of Veterinary Research*, *16*(1), 11-25.
- Kevill, J., Highfield, A., Mordecai, G., Martin, S., & Schroeder, D. (2017). ABC Assay: Method Development and Application to Quantify the Role of Three DWV Master Variants in Overwinter Colony Losses of European Honey Bees. *Viruses*, *9*(11), 314. <https://doi.org/10.3390/v9110314>
- Kevill, J. L., De Souza, F. S., Sharples, C., Oliver, R., Schroeder, D. C., & Martin, S. J. (2019). DWV-A Lethal to Honey Bees (*Apis mellifera*): A Colony Level Survey of DWV Variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 States across the US. *Viruses*, *11*(5), 426. <https://doi.org/10.3390/v11050426>
- Kleinhenz, M., Bujok, B., Fuchs, S., & Tautz, J. (2003). Hot bees in empty broodnest cells: Heating from within. *Journal of Experimental Biology*, *206*(23), 4217-4231. <https://doi.org/10.1242/jeb.00680>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lannutti, L., Gonzales, F. N., Dus Santos, M. J., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2022). Molecular Detection and Differentiation of Arthropod, Fungal, Protozoan, Bacterial and Viral Pathogens of Honeybees. *Veterinary Sciences*, *9*(5), 221. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050221>

- Larsen, A., Reynaldi, F. J., & Guzmán-Novoa, E. (2019). Bases del sistema inmune de la abeja melífera (*Apis mellifera*). Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *10*(3), 705-728. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>
- Le Conte, Y., Ellis, M., & Ritter, W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health: Can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, *41*(3), 353-363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>
- Li, Z., Huang, Z. Y., Sharma, D. B., Xue, Y., Wang, Z., & Ren, B. (2016). Drone and Worker Brood Microclimates Are Regulated Differentially in Honey Bees, *Apis mellifera*. *PLOS ONE*, *11*(2), e0148740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148740>
- Liu, X., Zhang, Y., Yan, X., & Han, R. (2010). Prevention of Chinese Sacbrood Virus Infection in *Apis cerana* using RNA Interference. *Current Microbiology*, *61*(5), 422-428. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9633-2>
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., & de Miranda, J. R. (2012). Acaricide Treatment Affects Viral Dynamics in *Varroa destructor*-Infested Honey Bee Colonies via both Host Physiology and Mite Control. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(1), 227-235. <https://doi.org/10.1128/AEM.06094-11>
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., & Sela, I. (2007). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: Evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, *88*(12), 3428-3438. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83284-0>
- Maori, E., Paldi, N., Shafir, S., Kalev, H., Tsur, E., Glick, E., & Sela, I. (2009). IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by

- dsRNA ingestion. *Insect Molecular Biology*, 18(1), 55-60.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00847.x>
- Martin, S. J. (2001). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: A modelling approach: *Collapse of Varroa -infested honeybee colonies. Journal of Applied Ecology*, 38(5), 1082-1093. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x>
- McMenamin, A., Daughenbaugh, K., Parekh, F., Pizzorno, M., & Flenniken, M. (2018). Honey Bee and Bumble Bee Antiviral Defense. *Viruses*, 10(8), 395.  
<https://doi.org/10.3390/v10080395>
- Ministerio de Economía Argentina. Argentina y el mercado mundial de productos apícolas.  
[https://magyp.gob.ar/apicultura/mercado\\_mundial.php](https://magyp.gob.ar/apicultura/mercado_mundial.php)
- Ministerio de Hacienda, Presidencia de la Nación Argentina. (2018). Informe de cadenas de valor Apícola. Secretaría de Política Económica, Subsecretaría de Programación Microeconómica, Ministerio de Hacienda.  
[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro\\_cadenas\\_de\\_valor\\_apicola.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_apicola.pdf)
- Molineri, A., Giacobino, A., Pacini, A., Bulacio Cagnolo, N., Fondevila, N., Ferrufino, C., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciángelo, G., Pietronave, H., & Signorini, M. (2017). Risk factors for the presence of Deformed wing virus and Acute bee paralysis virus under temperate and subtropical climate in Argentinian bee colonies. *Preventive Veterinary Medicine*, 140, 106-115.  
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.019>
- Nazzi, F., Brown, S. P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E., & Pennacchio, F. (2012). Synergistic

- Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. *PLoS Pathogens*, 8(6), e1002735. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002735>
- Nazzi, F., & Le Conte, Y. (2016). Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, 61(1), 417-432. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023731>
- Palacios, G., Hui, J., Quan, P. L., Kalkstein, A., Honkavuori, K. S., Bussetti, A. V., Conlan, S., Evans, J., Chen, Y. P., vanEngelsdorp, D., Efrat, H., Pettis, J., Cox-Foster, D., Holmes, E. C., Briese, T., & Lipkin, W. I. (2008). Genetic Analysis of Israel Acute Paralysis Virus: Distinct Clusters Are Circulating in the United States. *Journal of Virology*, 82(13), 6209-6217. <https://doi.org/10.1128/JVI.00251-08>
- Pega, J., Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Schammas, J. M., Malacari, D., Capozzo, A. V., Arzt, J., Pérez-Beascochea, C., Maradei, E., Rodríguez, L. L., Borca, M. V., & Pérez-Filgueira, M. (2013). Early Adaptive Immune Responses in the Respiratory Tract of Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected Cattle. *Journal of Virology*, 87(5), 2489-2495. <https://doi.org/10.1128/JVI.02879-12>
- Posada-Florez, F., Sonenshine, D. E., Egekwu, N. I., Rice, C., Lupitsky, R., & Cook, S. C. (2019). Insights into the metabolism and behaviour of *Varroa destructor* mites from analysis of their waste excretions. *Parasitology*, 146(4), 527-532. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001762>
- Prodělalová, J., Moutelíková, R., & Titěra, D. (2019). Multiple Virus Infections in Western Honeybee (*Apis mellifera* L.) Ejaculate Used for Instrumental Insemination. *Viruses*, 11(4), 306. <https://doi.org/10.3390/v11040306>

- Quintana, S., Brasesco, C., Porrini, L. P., Di Gerónimo, V., Eguaras, M. J., & Maggi, M. (2021). First molecular detection of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) in honey bees (*Apis mellifera*) in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 60(1), 111-114. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1690100>
- 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., & van Engelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(5), 1792–1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>.
- Ravoet, J., De Smet, L., Wenseleers, T., & De Graaf, D. C. (2015). Vertical transmission of honey bee viruses in a Belgian queen breeding program. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0386-9>
- Reynaldi, F. J., Sguazza, G. H., Pecoraro, M. R., Tizzano, M. A., & Galosi, C. M. (2010). First report of viral infections that affect argentine honeybees: Viral infections in argentine honeybees. *Environmental Microbiology Reports*, 2(6), 749-751. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00173.x>
- Reynaldi, F. J., Sguazza, G. H., Tizzano, M. A., Fuentealba, N., Galosi, C. M., & Pecoraro, M. (2011). *First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina*. 43, 84-86.
- Rodríguez, M., Vargas, M., Antúnez, K., Gerding, M., Ovídio Castro, F., & Zapata, N. (2014). Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biobío Region of Chile and their association with other honey bee pathogens. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(2), 170-177. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000200007>

- Rusert, L. M., Pettis, J. S., & Tarpy, D. R. (2021). Introduction of *Varroa destructor* has not altered honey bee queen mating success in the Hawaiian archipelago. *Scientific Reports*, *11*(1), 1366. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80525-5>
- Salina, M. D., Garcia, M. L. G., Bais, B., Bravi, M. E., Brasesco, C., Maggi, M., Pecoraro, M., Larsen, A., Sguazza, H. G., & Reynaldi, F. J. (2021). Viruses that affect Argentinian honey bees (*Apis mellifera*). *Archives of Virology*, *166*(6), 1533-1545. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05000-6>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Número libro 1). Cold Spring Harbor Laboratory. <https://books.google.com.ar/books?id=8WViPwAACAAJ>
- Sanpa, S., & Chantawannakul, P. (2009). Survey of six bee viruses using RT-PCR in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*, *100*(2), 116-119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.010>
- SENASA, 2020. Enfermedades de las abejas. Manual de Procedimientos. <https://www.senasa.gob.ar>
- SENASA, 2013. Resolución N° 278/2013. Programa nacional de sanidad apícola – creación. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-278-2013-216720>
- SENASA, 2010. Situación actual de la varroosis en la república argentina. <https://www.senasa.gob.ar>
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., & Cox-Foster, D. (2005). Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology*, *86*(8), 2281-2289. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80824-0>

- Silva, I. C., Message, D., Cruz, C. D., Campos, L. A. O., & Sousa-Majer, M. J. (2009). Rearing Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) brood under laboratory conditions. *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 623-629. <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr018>
- Soroker, V., Hetzroni, A., Yakobson, B., David, D., David, A., Voet, H., Slabezki, Y., Efrat, H., Levski, S., Kamer, Y., Klinberg, E., Zioni, N., Inbar, S., & Chejanovsky, N. (2011). Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*, 42(2), 192-199. <https://doi.org/10.1051/apido/2010047>
- Sumpter, D. J. T., & Martin, S. J. (2004). The dynamics of virus epidemics in *Varroa* - infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 73(1), 51-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2004.00776.x>
- Tantillo, G., Bottaro, M., Di Pinto, A., Martella, V., Di Pinto, P., & Terio, V. (2015). Virus infections of honeybees *Apis Mellifera*. *Italian Journal of Food Safety*, 4(3). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5364>
- Tapasztai, Z., Forgách, P., Kóvágó, C., Topolska, G., Nowotny, N., Rusvai, M., & Bakonyi, T. (2009). Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black queen cell virus genotypes. *Veterinary Microbiology*, 139(3-4), 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.002>
- Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J., & Evans, J. D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(1), 117-119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.014>
- Thaduri, S., Stephan, J. G., De Miranda, J. R., & Locke, B. (2019). Disentangling host-parasite-pathogen interactions in a varroa-resistant honeybee population reveals

- virus tolerance as an independent, naturally adapted survival mechanism. *Scientific Reports*, 9(1), 6221. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42741-6>
- Thompson, J. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Tsevegmid, K., Neumann, P., & Yañez, O. (2016). The Honey Bee Pathosphere of Mongolia: European Viruses in Central Asia. *PLOS ONE*, 11(3), e0151164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151164>
- Zander, E. (1909). En *Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene*, *Münchener Bienenzeitung* (Vol. 31, pp. 196-204).
- Žvokelj, L., Bakonyi, T., Korošec, T., & Gregorc, A. (2020). Appearance of acute bee paralysis virus, black queen cell virus and deformed wing virus in Carnolian honey bee (*Apis mellifera carnica*) queen rearing. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 53-58. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1681115>

## APÉNDICE

*Cuadro 1: Condiciones de ciclado de PCR para el fragmento del gen VP1 de ABPV.*

Ciclado de PCR de ABPV VP1			
	Proceso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
	Desnaturalización inicial	2	95
35 ciclos	Desnaturalización	0.5	95
	Hibridación	1	54
	Extensión	1	72
	Extensión final	7	72

*Cuadro 2: Condiciones de ciclado de PCR para el fragmento del gen Replicasa de ABPV.*

Ciclado de PCR de ABPV Replicasa			
	Proceso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
	Desnaturalización inicial	2	95
35 ciclos	Desnaturalización	0.5	95
	Hibridación	0.5	58
	Extensión	1	72
	Extensión final	7	72

*Cuadro 3: Condiciones de ciclado de PCR para el fragmento del gen VP1 de BQCV.*

Ciclado de PCR de BQCV VP1			
	Proceso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
	Desnaturalización inicial	2	95
35 ciclos	Desnaturalización	0.5	95
	Hibridación	1	54
	Extensión	1	72
	Extensión final	7	72

*Cuadro 4: Condiciones de ciclado de PCR para el fragmento del gen Helicasa de BQCV.*

Ciclado de PCR de BQCV Helicasa			
	Proceso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
	Desnaturalización inicial	5	95
35 ciclos	Desnaturalización	0.5	95
	Hibridación	0.75	58
	Extensión	0.75	72
	Extensión final	7	72

*Cuadro 5: Descripción de las condiciones meteorológicas (Temperatura media, Porcentaje de Humedad relativa promedio y Precipitación) en cada año y provincia durante los muestreos realizados*

<b>Provincia</b>	<b>Año</b>	<b>Temp. Media (°C)</b>	<b>HR promedio (%)</b>	<b>Precipitación (mm)</b>
<b>Córdoba</b>	2015	17,1	76,25	0,8
<b>Entre Ríos</b>	2015	21,4	63	0
<b>Entre Ríos</b>	2016	26,6	60	0
<b>Entre Ríos</b>	2017	20,3	47	2,2
<b>Mendoza</b>	2015	9,4	62,1	0
<b>Mendoza</b>	2016	25,5	64	0
<b>Mendoza</b>	2017	10,6	49	0
<b>Santa Fe</b>	2016	16,3	70	0
<b>Santa Fe</b>	2017	20,3	64	0
<b>Tucumán</b>	2015	13,7	91	0
<b>Tucumán</b>	2017	19,3	51	0
<b>Buenos Aires</b>	2017	20,1	67	0

Cuadro 6: Medidas resumen de la variable logaritmo de la concentración de ABPV (copias génicas/ul) para cada uno de los tratamientos y tiempos.

<b>Medidas resumen</b>						
<b>Tiempo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>Var(n-1)</b>
0	A	LOG10 Concentración	4	1,54	0,00	0,00
0	B	LOG10 Concentración	4	1,54	0,00	0,00
0	C	LOG10 Concentración	4	1,54	0,00	0,00
0	D	LOG10 Concentración	4	1,54	0,00	0,00
0	E	LOG10 Concentración	4	1,54	0,00	0,00
2	A	LOG10 Concentración	4	2,61	0,40	0,16
2	B	LOG10 Concentración	4	2,83	0,15	0,02
2	C	LOG10 Concentración	4	2,41	0,13	0,02
2	D	LOG10 Concentración	4	2,99	0,57	0,33
2	E	LOG10 Concentración	4	2,36	0,52	0,28
4	A	LOG10 Concentración	4	3,13	0,24	0,06
4	B	LOG10 Concentración	4	6,37	0,30	0,09
4	C	LOG10 Concentración	4	9,06	1,75	3,06
4	D	LOG10 Concentración	4	3,85	0,41	0,17
4	E	LOG10 Concentración	4	8,20	1,75	3,06
6	A	LOG10 Concentración	4	4,47	0,23	0,05
6	B	LOG10 Concentración	4	7,14	0,23	0,05
6	C	LOG10 Concentración	4	10,06	0,30	0,09
6	D	LOG10 Concentración	4	5,51	0,45	0,20
6	E	LOG10 Concentración	4	8,69	1,85	3,42
8	A	LOG10 Concentración	4	5,36	0,31	0,10
8	B	LOG10 Concentración	4	8,62	1,83	3,36
8	C	LOG10 Concentración	3	7,62	0,91	0,82
8	D	LOG10 Concentración	4	4,56	0,16	0,03
8	E	LOG10 Concentración	2	7,59	0,10	0,01
10	A	LOG10 Concentración	4	6,55	0,32	0,10
10	B	LOG10 Concentración	4	9,02	1,60	2,55
10	C	LOG10 Concentración	4	8,21	1,50	2,26
10	D	LOG10 Concentración	4	5,74	0,24	0,06
10	E	LOG10 Concentración	3	7,60	0,13	0,02

Cuadro 7: Medidas resumen de la variable número de abejas vivas para cada tratamiento en los diferentes tiempos correspondiente al experimento de silenciamiento de ABPV.

Medidas resumen						
Tiempo	Tratamiento	Variable	n	Min	Máx	Mediana
0	A	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
0	B	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
0	C	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
0	D	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
0	E	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
<hr/>						
1	A	Vivas	4	29,00	30,00	30,00
1	B	Vivas	4	28,00	30,00	29,00
1	C	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
1	D	Vivas	4	29,00	30,00	29,50
1	E	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
<hr/>						
2	A	Vivas	4	28,00	29,00	29,00
2	B	Vivas	4	26,00	28,00	28,00
2	C	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
2	D	Vivas	4	29,00	30,00	29,00
2	E	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
<hr/>						
3	A	Vivas	4	27,00	29,00	28,00
3	B	Vivas	4	26,00	28,00	27,50
3	C	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
3	D	Vivas	4	29,00	30,00	29,00
3	E	Vivas	4	28,00	30,00	30,00
<hr/>						
4	A	Vivas	4	27,00	28,00	27,50
4	B	Vivas	4	25,00	28,00	27,00
4	C	Vivas	4	28,00	30,00	29,00
4	D	Vivas	4	26,00	30,00	29,00
4	E	Vivas	4	26,00	29,00	28,00
<hr/>						
5	A	Vivas	4	27,00	28,00	27,50
5	B	Vivas	4	25,00	27,00	26,00
5	C	Vivas	4	12,00	28,00	19,00
5	D	Vivas	4	26,00	30,00	27,50
5	E	Vivas	4	8,00	26,00	14,50
<hr/>						
6	A	Vivas	4	27,00	28,00	27,50
6	B	Vivas	4	23,00	25,00	24,00
6	C	Vivas	4	10,00	26,00	14,00
6	D	Vivas	4	26,00	30,00	27,50
6	E	Vivas	4	3,00	20,00	9,50
<hr/>						
7	A	Vivas	4	24,00	28,00	27,00
7	B	Vivas	4	18,00	25,00	20,50
7	C	Vivas	4	2,00	26,00	10,50
7	D	Vivas	4	25,00	30,00	26,00
7	E	Vivas	4	3,00	19,00	6,50
<hr/>						
8	A	Vivas	4	23,00	28,00	27,00
8	B	Vivas	4	11,00	24,00	19,50
8	C	Vivas	4	2,00	25,00	9,00
8	D	Vivas	4	22,00	30,00	26,00
8	E	Vivas	4	2,00	19,00	6,00
<hr/>						
9	A	Vivas	4	22,00	28,00	27,00
9	B	Vivas	4	11,00	24,00	17,00
9	C	Vivas	4	2,00	25,00	8,50
9	D	Vivas	4	22,00	29,00	26,00
9	E	Vivas	4	1,00	17,00	5,50
<hr/>						
10	A	Vivas	4	22,00	28,00	25,00
10	B	Vivas	4	8,00	23,00	15,50
10	C	Vivas	4	2,00	24,00	7,50
10	D	Vivas	4	22,00	27,00	24,00
10	E	Vivas	4	0,00	16,00	5,00

Cuadro 8: Medidas resumen de la variable logaritmo de la concentración de virus (copias génicas/ $\mu$ l) para cada uno de los tratamientos y tiempos del experimento de silenciamiento de BQCV.

<b>Medidas resumen</b>						
<b>Tiempo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>Var(n-1)</b>
0	A	LOG10 Concentración	4	1,28	0,50	0,25
0	B	LOG10 Concentración	4	1,78	0,50	0,25
0	C	LOG10 Concentración	4	1,28	0,50	0,25
0	D	LOG10 Concentración	4	1,53	0,58	0,33
0	E	LOG10 Concentración	4	1,53	0,58	0,33
2	A	LOG10 Concentración	4	1,79	0,46	0,21
2	B	LOG10 Concentración	4	1,44	0,07	0,03
2	C	LOG10 Concentración	4	2,06	0,57	0,32
2	D	LOG10 Concentración	4	1,96	0,58	0,34
2	E	LOG10 Concentración	4	2,07	0,48	0,23
4	A	LOG10 Concentración	4	1,74	0,29	0,09
4	B	LOG10 Concentración	4	2,21	0,19	0,04
4	C	LOG10 Concentración	4	2,01	0,29	0,08
4	D	LOG10 Concentración	4	2,35	0,47	0,22
4	E	LOG10 Concentración	4	1,32	0,55	0,30
6	A	LOG10 Concentración	4	1,37	0,18	0,03
6	B	LOG10 Concentración	4	2,25	0,64	0,42
6	C	LOG10 Concentración	4	1,25	0,50	0,25
6	D	LOG10 Concentración	3	0,33	0,19	0,03
6	E	LOG10 Concentración	4	1,26	0,48	0,23
8	A	LOG10 Concentración	4	0,50	0,11	0,01
8	B	LOG10 Concentración	4	1,99	0,24	0,06
8	C	LOG10 Concentración	4	1,87	0,47	0,22
8	D	LOG10 Concentración	3	0,71	0,26	0,07
8	E	LOG10 Concentración	4	3,46	0,33	0,11
10	A	LOG10 Concentración	4	1,57	0,31	0,09
10	B	LOG10 Concentración	4	3,57	0,36	0,13
10	C	LOG10 Concentración	4	3,64	0,17	0,03
10	D	LOG10 Concentración	3	1,41	0,18	0,03
10	E	LOG10 Concentración	4	3,42	0,18	0,03

Cuadro 9: Medidas resumen de la variable respuesta  $N^\circ$  de abejas vivas para cada uno de los tratamientos en los diferentes tiempos del experimento de silenciamiento de BQCV.

Medidas resumen						
Tiempo	Tratamiento	Variable	n	Mín	Máx	Mediana
0	A	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
0	B	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
0	C	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
0	D	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
0	E	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
<hr/>						
1	A	Vivas	4	29,00	30,00	30,00
1	B	Vivas	4	29,00	30,00	29,50
1	C	Vivas	4	28,00	30,00	29,50
1	D	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
1	E	Vivas	4	30,00	30,00	30,00
<hr/>						
2	A	Vivas	4	29,00	30,00	30,00
2	B	Vivas	4	28,00	30,00	28,50
2	C	Vivas	4	27,00	30,00	27,50
2	D	Vivas	4	28,00	29,00	29,00
2	E	Vivas	4	26,00	30,00	30,00
<hr/>						
3	A	Vivas	4	28,00	30,00	29,00
3	B	Vivas	4	26,00	29,00	27,50
3	C	Vivas	4	24,00	28,00	27,50
3	D	Vivas	4	27,00	28,00	27,00
3	E	Vivas	4	26,00	30,00	26,50
<hr/>						
4	A	Vivas	4	28,00	29,00	28,50
4	B	Vivas	4	26,00	28,00	27,00
4	C	Vivas	4	24,00	28,00	27,00
4	D	Vivas	4	27,00	28,00	27,00
4	E	Vivas	4	25,00	29,00	26,00
<hr/>						
5	A	Vivas	4	27,00	29,00	28,50
5	B	Vivas	4	26,00	28,00	26,50
5	C	Vivas	4	24,00	27,00	26,00
5	D	Vivas	4	25,00	28,00	26,00
5	E	Vivas	4	25,00	29,00	25,50
<hr/>						
6	A	Vivas	4	27,00	29,00	28,50
6	B	Vivas	4	23,00	28,00	25,00
6	C	Vivas	4	19,00	27,00	25,50
6	D	Vivas	4	24,00	28,00	25,50
6	E	Vivas	4	21,00	25,00	23,50
<hr/>						
7	A	Vivas	4	27,00	29,00	28,50
7	B	Vivas	4	18,00	25,00	21,00
7	C	Vivas	4	12,00	21,00	17,00
7	D	Vivas	4	22,00	27,00	24,50
7	E	Vivas	4	14,00	22,00	18,50
<hr/>						
8	A	Vivas	4	27,00	29,00	28,50
8	B	Vivas	4	14,00	21,00	15,50
8	C	Vivas	4	5,00	13,00	12,00
8	D	Vivas	4	22,00	27,00	24,00
8	E	Vivas	4	9,00	18,00	14,00
<hr/>						
9	A	Vivas	4	27,00	29,00	28,50
9	B	Vivas	4	5,00	19,00	12,50
9	C	Vivas	4	3,00	12,00	10,50
9	D	Vivas	4	21,00	27,00	22,00
9	E	Vivas	4	8,00	18,00	12,50
<hr/>						
10	A	Vivas	4	27,00	29,00	28,00
10	B	Vivas	4	0,00	16,00	12,00
10	C	Vivas	4	1,00	8,00	7,50
10	D	Vivas	4	21,00	26,00	22,00
10	E	Vivas	4	5,00	14,00	10,00